



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

TESIS DOCTORAL
“Actividad de biocidas frente a aislados de
Klebsiella pneumoniae productor de
carbapenemasa”

Trabajo realizado para alcanzar el grado de Doctor por
Dña. Ana Gual de Torrella Bennasar.

Sevilla, julio de 2022



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla y el Dr. D. Felipe Manuel Fernández Cuenca, Facultativo Especialista de Área (Microbiología; Hospital Universitario Virgen Macarena),

CERTIFICAN:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “Actividad de biocidas frente a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasa” ha sido realizada por Dña. Ana Gual de Torrella Bennasar bajo nuestra supervisión, reuniendo todos los requisitos necesarios para su presentación.

Y para que conste donde proceda firmamos el presente certificado en Sevilla a 4 de julio de 2022.

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández Dr. D. Felipe Manuel Fernández Cuenca



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que la tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla que lleva por título “Actividad de biocidas frente a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasa” ha sido realizada por Dña. Ana Gual de Torrella Bennasar bajo mi tutela y es apta para ser presentada.

Y para que conste donde proceda firmo el presente certificado en Sevilla a 4 de julio de 2022.

Dr. D. Álvaro Pascual Hernández

Agradecimientos

De las primeras cosas de las que te advierten cuando te planteas realizar una Tesis Doctoral es que requiere mucho esfuerzo, compromiso y dedicación. Y con razón. A pesar de ello, este proyecto también me ha permitido compartir tiempo y experiencias con muchas personas que me han acompañado, han hecho posible este trabajo y a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, a mis directores de Tesis Doctoral, Álvaro y Felipe. Gracias Álvaro por haber apostado por mí, por haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral con este gran equipo y por haberme animado y apoyado a lo largo de este proceso. A Felipe, por haber depositado tu confianza en mí y por haberme dirigido en el camino, desde el diseño del primer póster hasta la finalización de este proyecto, al que tanto tiempo y esfuerzo hemos dedicado.

Imposible no mencionar a Mercedes, muchas gracias por todo, por ser mi asesora dentro y fuera del laboratorio, por ser una profesional excelente y una inmejorable compañera y amiga. Aunque suene a frase hecha, en este caso es cierto, sin ti no habría sido posible.

Por supuesto, a toda la gente de la cátedra, Lara, Fany, María, Rafa, Carmen, Miriam, Sara... Especialmente a Fran, por enseñarme cómo trabajar con biopelículas y a organizarme en el laboratorio. Sin tu ayuda este proyecto, que ha sido largo, habría sido eterno. A Fernando, por tu ayuda con la estadística y la informática, pero principalmente por tu infinita paciencia. A Carmen Hidalgo, por tu inestimable trabajo en el laboratorio y por resolver todas mis dudas. Y si hablamos de resolver dudas, a Paula, por estar siempre ahí.

A las residentes con las que he tenido la suerte de compartir estos años, os habéis convertido en amigas. A Inés, no se me ocurre una mejor compañera con la que haber coincidido en este camino de dudas, de trabajo y de empeño. A los adjuntos del servicio de Microbiología, que siempre nos apoyan para que podamos compaginar la residencia con la investigación.

A mis amigos y toda la gente que me ha acogido en Sevilla haciéndome sentir en casa. A Quicois y Sofía, gracias por vuestro apoyo y devolverme la serenidad en algunos momentos difíciles.

A mi familia. A mi madre y a mi padre, siempre habéis creído en mí y me habéis apoyado en todas mis decisiones. Casi echaré de menos las preguntas con las que llevamos tiempo empezando nuestras conversaciones, ¿Cómo va la Tesis?, ¿Cuándo terminas la Tesis?, ¿Cuánto queda?... A mis hermanas, por estar siempre pendientes de mis avances y de cómo lo llevo. Sois las personas más increíbles que conozco.

Y, por último, a Mikel, muchas gracias por tu ayuda, tu apoyo y por haber sabido acompañarme tan bien en esta etapa.

Índice de contenidos

Abreviaturas.....	13
Resumen	15
1. Introducción.....	17
1.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	19
1.1.1. Taxonomía.....	19
1.1.2. Características generales.....	21
1.1.3. Epidemiología y problema de salud pública.....	21
1.1.4. Resistencia a betalactámicos en <i>K. pneumoniae</i>	23
1.1.5. Detección de carbapenemasas en el laboratorio.....	29
1.1.6. <i>K. pneumoniae</i> como reservorio de genes de carbapenemasas.....	30
1.1.7. Elementos genéticos móviles implicados en la diseminación de genes que codifican carbapenemasas	31
1.1.8. Papel de los clones epidémicos o de alto riesgo de <i>K. pneumoniae</i> en la diseminación de genes que codifican carbapenemasas.....	32
1.1.9. Antimicrobianos con actividad frente a <i>K. pneumoniae</i> productor de carbapenemasa..	33
1.2. Biocidas	35
1.2.1. Clasificación de los biocidas	37
1.2.2. Regulación del uso de biocidas	37
1.2.3. Composición, aplicaciones, mecanismo de acción y espectro de actividad antimicrobiana de los biocidas.....	38
1.2.4. Métodos de estudio de la actividad <i>in vitro</i> de los biocidas	47
1.2.5. Sensibilidad reducida a biocidas	48
1.2.6. Corresistencia y resistencia cruzada entre biocidas y antimicrobianos	56
1.3. Biopelículas.....	59
1.3.1. Formación de biopelículas	59
1.3.2. Factores de virulencia implicados en la formación de biopelículas en <i>K. pneumoniae</i> ...	61
1.3.3. Matriz extracelular	63
1.3.4. Tolerancia a biocidas y resistencia a antimicrobianos en la biopelícula	64
1.3.5. Estudio de la formación de biopelículas.....	66
2. Hipótesis y objetivos	71
2.1. Hipótesis de trabajo	73
2.2. Objetivos del estudio	74
3. Material y métodos	77
3.1. Material	79
3.1.1. Cepas bacterianas	79

3.1.2.	Productos químicos	80
3.1.3.	Soluciones	80
3.1.4.	Reactivos	80
3.1.5.	Equipos	81
3.1.6.	Medios de cultivo	82
3.1.7.	Biocidas	83
3.1.8.	Herramientas informáticas y servidores en línea.....	83
3.1.9.	Programas informáticos	84
3.1.10.	Cebadores	84
3.2.	Métodos de Microbiología	85
3.2.1.	Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> a carbapenémicos	85
3.2.2.	Estudio de sensibilidad <i>in vitro</i> a biocidas.....	85
3.2.3.	Curvas de crecimiento.....	86
3.2.4.	Tinción de biopelículas con cristal violeta	88
3.2.5.	Supervivencia bacteriana en biopelículas	90
3.2.6.	Microscopía de barrido láser confocal (CLSM).....	91
3.3.	Métodos de Biología Molecular	95
3.3.1.	PCR (Polimerase Chain Reaction)	95
3.3.2.	RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	96
3.3.3.	Secuenciación masiva de genomas	98
3.3.4.	Anotación de genes: tipado molecular, resistoma y anotación de genes.....	104
4.	Resultados	107
4.1.	Caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> productor de carbapenemasa	109
4.1.1.	Tipado molecular, actividad <i>in vitro</i> de carbapenémicos y resistoma	109
4.2.	Capítulo 1	113
4.2.1.	Actividad <i>in vitro</i> de biocidas	113
4.2.2.	Curvas de crecimiento en MHB y M9 a 25 y 37°C.....	118
4.2.3.	Identificación de genes de bombas de expulsión relacionadas con sensibilidad reducida a biocidas. Análisis de la relación entre la presencia de genes de bombas y la actividad <i>in</i> <i>vitro</i> de biocidas.	122
4.3.	Capítulo 2	127
4.3.1.	Capacidad de formación de biopelícula. Diferencias entre aislados pertenecientes a clones epidémicos y aislados pertenecientes a clones no epidémicos.	127
4.3.2.	Viabilidad y dinámica de formación de biopelículas formadas por aislados pertenecientes a clones epidémicos	129

4.3.3.	Prevalencia del operón <i>mrkABCDF</i> y expresión relativa del gen <i>mrkA</i> . Análisis de las diferencias entre aislados de clones epidémicos y aislados de clones no epidémicos. .	134
4.3.4.	Formación de biopelículas y viabilidad de las biopelículas en presencia de biocidas. Dinámica de la formación de biopelículas en presencia de povidona yodada.	137
5.	Discusión	151
	Limitaciones del estudio.....	173
6.	Conclusiones	177
7.	Bibliografía	181
8.	Anexos.....	199
	Anexo 1: Secuencias de referencia de genes que codifican bombas de expulsión y genes del operón <i>mrkABCDF</i>	201
	Anexo 2: producción científica.....	202

Abreviaturas

ABC: *ATP-binding cassette family*

AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios

AER: acil-enoil-CoA reductasa

AFM: microscopía de fuerza atómica

BLEE: betalactamasas de espectro extendido

BZK: cloruro de benzalconio

CEN: Comité Técnico del Comité Europeo de Normalización

CHX: digluconato de clorhexidina

CIM: método de inactivación del carbapenémico

CLSM: microscopía confocal de barrido láser

CMB: concentración mínima bactericida

CMI: concentración mínima inhibitoria

CNM: Centro Nacional de Microbiología

DMBA: desinfectantes de manos con base alcohólica

DO: densidad óptica

eADN: ADN extracelular

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

ECHA: Agencia Química Europea

ECOFF: puntos de corte epidemiológicos (por sus siglas en inglés)

EGM: elementos genéticos móviles

EMA: Agencia Europea del Medicamento (por sus siglas en inglés).

EPS: sustancias poliméricas extracelulares (por sus siglas en inglés).

ET: etanol

EUCAST: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

EuSCAPE: *The European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae*

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés)

HS: hipoclorito de sodio

IMP: carbapenemasa de clase B (metalobetalactamasa)

ITU: infección del tracto urinario

Kphv: *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

Kp-PC: *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasa

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LPS: lipolisacárido

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight*

MATE: *multidrug and toxic compound extrusion family*

MBL: metalobetalactamasa

mCIM: método de inactivación del carbapenémico modificado

MHB: caldo Mueller-Hinton II

MSF: *major facilitator superfamily*

NDM: *New Dehli metallo-beta-lactamase*

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBP: proteínas de unión a penicilina

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)

PIRASOA: Programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos

POV: povidona yodada

QACs: compuestos de amonio cuaternario

qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (por sus siglas en inglés)

RND: *resistance-nodulation-division family*

SARM: *S. aureus* resistente a meticilina

SEM: microscopía electrónica de barrido

SMR: *small multidrug resistance family*

SRB: sensibilidad reducida a biocidas

STE: Sterillium®

TRI: triclosán

UFC: unidades formadoras de colonias

VIM: *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*

WGS: secuenciación del genoma completo (por sus siglas en inglés)

Resumen

La diseminación de clones epidémicos de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasa (Kp-PC) es un problema de salud a nivel mundial, con importantes repercusiones clínicas, terapéuticas y epidemiológicas. El éxito de estos clones epidémicos se relaciona con múltiples factores, como la adquisición de genes de resistencia antimicrobiana, destacando los que codifican carbapenemasas. Por otro lado, factores que intervengan en la capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas, podrían contribuir en mayor o menor medida en su comportamiento epidémico. En este contexto, en este trabajo se ha estudiado la sensibilidad reducida a biocidas (SBR) y la capacidad de formación de biopelícula en aislados de Kp-PC.

Se ha observado que la actividad de los biocidas evaluados frente a Kp-PC (povidona yodada, digluconato de clorhexidina, cloruro de benzalconio, hipoclorito de sodio, etanol, solución hidroalcohólica y triclosán) es independiente del tipo de clon (epidémico o no epidémico), por lo que no se puede relacionar el comportamiento epidémico con la SRB. Tampoco se ha relacionado la presencia de los genes de bombas de expulsión evaluados (*cepA*, *acrAB*, *kpnEF*, *oqxAB*, *smvAR*, *qacEΔ1*, *qacE* y *qacA*) con los valores de CMI de los biocidas estudiados.

Respecto a la capacidad de formación de biopelícula, se ha observado que a temperatura ambiente (25°C), los aislados de clones epidémicos tienen una capacidad de formación de biopelículas superior a la de los aislados de clones no epidémicos. Además, en cuatro aislados epidémicos (ST512/KPC-3, ST258/KPC-3, ST15/OXA-48 y ST11/OXA-48) se ha analizado la viabilidad y dinámica de formación de la biopelícula y se ha observado que a 25°C permanecen viables durante 2 meses. Por otra parte, se ha estudiado el operón que codifica la fimbria de tipo 3 (*mrkABCDF*) y se ha comprobado que está altamente conservado en los aislados de Kp-PC estudiados. Además, se ha observado que la expresión relativa del gen *mrkA* está asociada con la capacidad de formación de biopelícula.

Finalmente, respecto a efecto de los biocidas en la formación de biopelícula se ha observado que los aislados de clones epidémicos analizados son capaces de permanecer viables hasta 2 meses en biopelículas expuestas a las concentraciones subletales de los biocidas estudiados a temperatura ambiente. También, se ha observado que concentraciones subletales de clorhexidina y triclosán pueden favorecer la formación de biopelícula a temperatura ambiente. Por otro lado, povidona yodada es el biocida con mayor efecto en la reducción de la capacidad de formación de biopelículas y de la viabilidad en las mismas.

1. Introducción

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

1.1.1. Taxonomía

El género *Klebsiella* fue descrito por Trevisan en 1885 y debe su nombre al bacteriólogo alemán Theodor Albrecht Edwin Klebs¹. La especie *Klebsiella pneumoniae* fue descrita por Schroeter en 1886 y por Trevisan en 1887, aunque este microorganismo había sido previamente reconocido como patógeno causante de neumonía por Carl Friedlaender en 1882^{2,3}.

El género *Klebsiella*, miembro del orden *Enterobacterales* y de la familia *Enterobacteriaceae*, originalmente se dividió en 3 especies causantes de infección en el ser humano: *K. pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* y *Klebsiella rhinoscleromatis*⁴. Ørskov reclasificó en 1984 *K. ozaenae* y *K. rhinoscleromatis* como subespecies de *K. pneumoniae* (**Tabla 1**)⁵. La introducción continua de nuevas técnicas, principalmente moleculares, ha supuesto cambios importantes en la clasificación bacteriana, por lo que la taxonomía del género *Klebsiella* está en constante revisión, no sin cierta controversia⁵. Ejemplo de ello es la reclasificación realizada por Drancourt y colaboradores en 2001 de *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola* y *Klebsiella ornithinolytica* en un nuevo género denominado *Raoultella* o el reciente cambio de género de *Enterobacter aerogenes* a *Klebsiella aerogenes* propuesto por Tindall y colaboradores en 2017^{6,7}.

Las técnicas de secuenciación masiva de genomas completos (WGS por sus siglas en inglés, whole genome sequencing), han permitido establecer el complejo *K. pneumoniae* como un grupo sin una designación taxonómica formal (**Figura 1**), constituido por 7 especies o subespecies con una identidad de nucleótidos promedio del 95-96% con *K. pneumoniae*: *K. pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* subsp. *variicola*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. variicola* subsp. *tropica*, *Klebsiella quasivariicola* y *Klebsiella africana* (Kp1 a Kp7, respectivamente)³.

Tabla 1. Taxonomía de *K. pneumoniae* obtenida en “List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature”, la cual incluye la nomenclatura citada en “Approved Lists of Bacterial Names” o publicada en “International Journal of Systematic Bacteriology” o “International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology”².

Clasificación taxonómica	
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	<i>Enterobacterales</i>
Familia	<i>Enterobacteriaceae</i>
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>K. pneumoniae</i>
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
Subespecies	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>

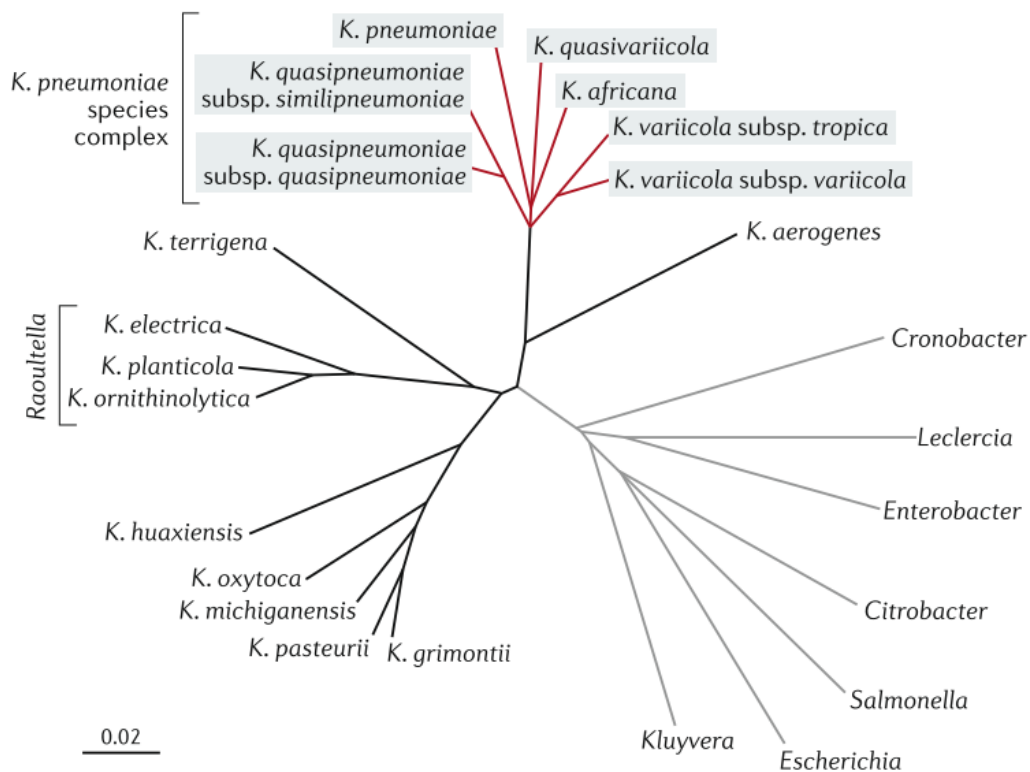


Figura 1. Taxonomía del complejo *K. pneumoniae* por WGS³.

1.1.2. Características generales

K. pneumoniae es una bacteria que se caracteriza desde el punto de vista microbiológico por ser un bacilo Gram negativo, encapsulado, anaerobio facultativo, oxidasa negativo, catalasa positivo, fermentador de lactosa y glucosa, no formador de esporas y no móvil (**Tabla 2**)^{8,9}.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de las subespecies de *K. pneumoniae*.

	<i>K. pneumoniae</i> ^a		
	subsp. <i>pneumoniae</i>	subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	subsp. <i>ozaenae</i>
Indol	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	-
Reacción Voges-Proskauer	+	-	-
Urea	+	-	-
Utilización del malonato	+	+	-
ONPG	+	-	v
Crecimiento a 10°C	-	-	-
Fermentación D-melecitosa	-	-	-

^a Datos obtenidos en las referencias^{5,8,10}. -: reacción negativa, +: reacción positiva, v: reacción variable.

1.1.3. Epidemiología y problema de salud pública

K. pneumoniae se encuentra ampliamente distribuido en plantas, animales y el medio ambiente (agua y suelo). Además, este microorganismo forma parte de la microbiota humana, colonizando principalmente la nasofaringe y el tracto digestivo^{5,9,11}.

K. pneumoniae es también un patógeno oportunista y uno de los principales agentes causantes de infecciones nosocomiales, principalmente en pacientes inmunocomprometidos, con comorbilidades o sometidos a procedimientos invasivos^{12,13}. *K. pneumoniae* forma parte del grupo ESKAPE, junto con *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.¹⁴. Los patógenos de este grupo se caracterizan por ser la principal causa de infecciones nosocomiales a nivel mundial, adquirir con relativa frecuencia determinantes de resistencia antimicrobiana y, la mayoría de ellos, por su virulencia¹⁴⁻¹⁶. La infección adquirida en la comunidad es menos habitual, siendo las más frecuentes las del tracto urinario (ITU) (4,3-7%) y la neumonía^{13,17,18}.

Las infecciones nosocomiales más comunes causadas por *K. pneumoniae* son ITU, neumonía y bacteriemia^{17,19}. Según datos de la red HAI-Net del "European Centre for Disease Prevention and Control" (ECDC), en 2011-2012 *Klebsiella* spp. fue el tercer patógeno por frecuencia causante de ITU e infecciones del tracto respiratorio inferior y neumonía, y el cuarto en bacteriemia relacionada con la asistencia sanitaria²⁰. Según datos de 2016 y 2017 de la misma red, *Klebsiella*

spp. sería el segundo patógeno más frecuentemente aislado en ITU y el tercero en infecciones del tracto respiratorio, en pacientes institucionalizados y que reciben tratamiento antibiótico²¹.

Los principales factores de riesgo para adquirir una infección por *K. pneumoniae*, tanto nosocomial como comunitaria, son las alteraciones del sistema inmune del paciente, causadas por enfermedades subyacentes (p. ej. cáncer, diabetes *mellitus*) o tratamientos que generen neutropenia, ingresos hospitalarios previos y procedimientos médicos invasivos (p. ej. inserción de catéteres, intubación)^{17,19}. El principal reservorio de *K. pneumoniae* es el tracto gastrointestinal de los pacientes colonizados por *K. pneumoniae*, siendo dicha colonización más elevada en pacientes hospitalizados o que han recibido tratamiento antibiótico previo^{12,17,19,22}. Diversos estudios han demostrado que la colonización intestinal se relaciona con un aumento del riesgo de infección por *K. pneumoniae*. En un estudio realizado en un hospital terciario, el riesgo de infección fue del 5,2% en pacientes colonizados y del 1,3% en los no colonizados, mientras que en otro estudio realizado en pacientes de UCI, el riesgo fue del 16% en pacientes colonizados frente a un 3% en los no colonizados^{12,22}. Igualmente, la colonización orofaríngea es un factor de riesgo para la neumonía por *K. pneumoniae* asociada a ventilación mecánica¹⁷. La edad supone un factor de riesgo adicional, siendo los ancianos y los neonatos, particularmente aquellos que son prematuros o se encuentran ingresados en la UCI, los grupos de edad más afectados¹⁷.

Específicamente en el caso de la neumonía, tanto la adquirida en la comunidad como la nosocomial, hay que añadir factores que incrementan el riesgo de aspiración, como la intoxicación por alcohol, la radioterapia y la intubación endotraqueal¹⁷. En el caso de la neumonía adquirida en la comunidad, también hay que incluir procesos que implican alteraciones de las defensas del tracto respiratorio (p. ej. deficiencia en el aclaramiento mucociliar, inmunosupresión), alcoholismo crónico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y diabetes¹⁷. En cuanto a la bacteriemia nosocomial, los principales factores de riesgo incluyen neoplasias, diabetes mellitus, enfermedad hepática crónica, trasplante de órganos sólido y diálisis¹⁷.

Hay que destacar la emergencia de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulentas (Kphv), principalmente en la zona del este de Asia^{23,24}. Estas cepas producen infecciones comunitarias en individuos sanos, siendo el absceso hepático en ausencia de enfermedad del tracto biliar el síndrome clínico característico²³. Se trata de una infección metastásica, por lo que es característico que se produzcan infecciones del sistema nervioso central, neumonía y endoftalmitis²³. La mayoría de las cepas de Kphv pertenecen a ciertos grupos clonales, siendo el

más importante el CG23, que incluye secuenciotipos como ST23, ST26, ST57 y ST633²³. Entre los factores de virulencia que las caracterizan se encuentran el aumento de la producción de cápsula y una elevada frecuencia de los tipos capsulares K1 y K2²³. Estos tipos de cápsula podrían incrementar la supervivencia y diseminación de Kphv, al prevenir la fagocitosis debido a su composición²⁴. La emergencia de cepas de Kphv que además presentan resistencia a múltiples fármacos genera especial preocupación^{23,24}.

1.1.4. Resistencia a betalactámicos en *K. pneumoniae*

El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos es un proceso adaptativo natural en los microorganismos, y fue descrito incluso antes de que el uso de estos fármacos fuese habitual²⁵. En la actualidad, la resistencia a los antimicrobianos se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial²⁵. Se estima que causa unas 700.000 muertes anuales y que, en caso de que no se tomen medidas eficaces, estas muertes podrían incrementarse a 10 millones en 2050²⁵. Según el informe del ECDC de 2022, más de un tercio de los aislados de *K. pneumoniae* en Europa en 2020 fue resistente a al menos uno de los antibióticos bajo vigilancia de rutina (fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación, aminoglucósidos y carbapenémicos)²⁶. Los grupos de antimicrobianos con mayores tasas de resistencia fueron las cefalosporinas de tercera generación (33,9%), las fluoroquinolonas (33,8%), los aminoglucósidos (23,7%) y los carbapenémicos (10,0%)²⁶. La resistencia a más de un grupo de antimicrobianos fue frecuente, siendo la resistencia a fluoroquinolonas, cefalosporinas de tercera generación y aminoglucósidos el fenotipo de resistencia combinada más habitual^{3,26}. Los porcentajes de resistencia son muy variables en función del área geográfica, aunque fueron superiores al 50% para cefalosporinas de tercera generación en un 44% de los países participantes y a carbapenémicos en un 15%²⁶.

Los antibióticos betalactámicos son la familia de antimicrobianos más utilizada como tratamiento de infecciones causadas por *Enterobacterales* de fenotipo salvaje, incluyendo *K. pneumoniae*²⁷. El uso excesivo o no controlado de betalactámicos ha contribuido, junto con otros factores como la ausencia de programas eficaces de control y vigilancia de la resistencia a antimicrobianos, a que las tasas de resistencia a betalactámicos alcancen cifras muy preocupantes²⁸.

Los aislados clínicos de *K. pneumoniae* son intrínsecamente resistentes a las aminopenicilinas (p. ej. ampicilina) debido a la producción de SHV-1, una betalactamasa de clase A codificada por el gen cromosómico *bla*_{SHV-1}^{11,29}. No obstante, *K. pneumoniae* puede desarrollar o adquirir resistencia a otros betalactámicos de mayor espectro como cefalosporinas de tercera y cuarta

generación y carbapenémicos¹⁶. El principal mecanismo de resistencia a betalactámicos, incluidos los de amplio espectro, es la producción de enzimas que hidrolizan estos antimicrobianos, denominadas betalactamasas, entre las que destacan, por su relevancia clínica y epidemiológica, las de espectro extendido (BLEE), las carbapenemasas adquiridas y, en menor medida, las de tipo AmpC plasmídica¹⁷. Además de este mecanismo enzimático, se han descrito otros mecanismos de resistencia a betalactámicos con menor relevancia clínica, como la pérdida de porinas, la sobreexpresión de bombas de expulsión o mutaciones en la diana (PBP), que pueden presentarse solos o asociados a la hiperproducción o la adquisición de betalactamasas^{11,30,31}.

1.1.4.1. Producción de BLEE.

La incidencia de *K. pneumoniae* productor de BLEE ha alcanzado tasas endémicas de hasta el 50% en muchas partes del mundo según la OMS¹⁶. Según datos publicados por el ECDC en 2017, la mayoría (87,8%) de los aislados de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de tercera generación fueron productores de BLEE³². Las principales BLEE descritas en *K. pneumoniae* pertenecen a 3 grupos o familias diferentes (CTX-M, SHV y TEM), siendo las más frecuentes las de tipo CTX-M, y en particular CTX-M-15^{16,33}. En un estudio realizado en *Enterobacteriales* aislados en muestras clínicas entre 2013 y 2017 en Europa, se detectó la presencia de BLEE en el 35,5% de los aislados de *K. pneumoniae* y CTX-M-15 fue la más frecuente (77-90% en función de la región)³⁴.

1.1.4.2. Producción de AmpC plasmídicas.

En *K. pneumoniae* también se han detectado cefalosporinasas de tipo AmpC codificadas en genes plasmídicos (*bla_{CMY}*, *bla_{DHA}*, *bla_{FOX}* y *bla_{MOX}*) o en genes integrados en el cromosoma (*bla_{CMY-2}*)¹⁶. Estas betalactamasas, parece que son menos frecuentes que las BLEE, por lo que suelen tener menor relevancia clínica y epidemiológica que las BLEE³⁵.

1.1.4.3. Producción de carbapenemasas

La diseminación de resistencia a carbapenémicos en Europa merece especial atención por sus repercusiones terapéuticas y epidemiológicas. Los carbapenémicos son antimicrobianos betalactámicos que se utilizan como tratamiento de elección en infecciones producidas por bacterias Gram negativas multirresistentes productoras de BLEE y AmpC³⁶. Ello se debe a que estos antimicrobianos generalmente no son hidrolizados por estas betalactamasas, y a que se asocian con menores tasas de fracaso terapéutico que otras alternativas terapéuticas en las infecciones causadas por productores de BLEE (p. ej. fluoroquinolonas)³⁶. En Europa, en el periodo 2016-2020, la resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* ha ido en aumento (del

8,4% al 10%, datos excluyendo Reino Unido)²⁶. Según datos del ECDC de 2020, el porcentaje de aislados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos fue muy variable en función del área geográfica, desde la ausencia de detección en Estonia, Islandia y Eslovenia a una prevalencia del 48,3% en Rumanía o del 66,3% en Grecia²⁶.

El aumento de la resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* se debe principalmente a la diseminación de clones bacterianos epidémicos, también conocidos como clones de alto riesgo o exitosos (ver más adelante), y a la adquisición de carbapenemasas de origen plasmídico^{16,37}. Las carbapenemasas son las betalactamasas con el espectro de acción más amplio (**Tabla 3**). Estas enzimas hidrolizan la práctica totalidad de los betalactámicos, incluyendo los carbapenémicos, y la mayoría son resistentes a los inhibidores clásicos de betalactamasas (p. ej. ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam)³⁸. En la **Tabla 3** se recogen las características más relevantes de las carbapenemasas. Desde el punto de vista molecular y funcional las carbapenemasas pueden clasificarse en 3 grupos:

- **Clase A (grupo 2f de Bush):** el mecanismo de hidrólisis implica una serina en el sitio activo de la carbapenemasa³⁹. Las carbapenemasas de este grupo pueden hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos de forma variable³⁹. La mayoría son inhibidas por inhibidores clásicos de betalactamasas, como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam³⁹. Incluye enzimas codificadas por genes localizados en el cromosoma (p. ej. IMI-1/Nmc-A, grupo SME, SHV-38, SFC-1) o en plásmidos (p. ej. grupo KPC [*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase], grupo GES e IMI-2)⁴⁰. En el caso de los microorganismo Gram negativos, son más frecuentes las carbapenemasas codificadas por genes plasmídicos, que suelen estar acompañadas de otros genes de resistencia, como los que codifican CTX-M-15, o genes de resistencia a aminoglucósidos, entre otros, lo que da lugar a aislados multiresistentes^{39,41,42}.

Entre las carbapenemasas de clase A hay que destacar las del grupo KPC, particularmente en *K. pneumoniae*, por su amplia diseminación y la elevada tasa de mortalidad de las infecciones causadas por cepas que las producen (40% de media, con variaciones geográficas y en función de las comorbilidades de los pacientes estudiados)^{38,43}. Estas enzimas son muy eficientes en la hidrólisis de cefalotina, cefaloridina, bencilpenicilina, ampicilina y piperacilina³⁸. Además, no son inhibidas por los inhibidores de betalactamasas clásicos como ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam, pero sí por los nuevos inhibidores avibactam y relebactam⁴⁴. Este amplio espectro de acción limita las opciones terapéuticas, siendo

necesario utilizar antimicrobianos con elevada toxicidad, como colistina, o nuevos fármacos, como ceftazidima-avibactam o imipenem-relebactam, entre otros, para los cuales se ha descrito el desarrollo de resistencia durante el tratamiento^{45,46}.

Las carbapenemasas del grupo KPC se describieron por primera vez en 1996 en EEUU⁴⁷. Se han descrito numerosas variantes (más de 44 hasta la fecha), aunque KPC-2 y KPC-3, asociadas a los clones epidémicos de *K. pneumoniae* ST258 y ST512 respectivamente, son las más prevalentes y estudiadas^{40,48,49}. La diseminación de *K. pneumoniae* productor de KPC se debe principalmente a la expansión de clones epidémicos^{16,40}. En Europa y EEUU predomina el clon ST258 mientras que en Asia, principalmente en China y Taiwán, predomina el clon ST11⁴⁰. *K. pneumoniae* productor de KPC es endémica en muchos países (p. ej. Estados Unidos, China, Italia, Polonia, Grecia, Israel, Brasil, Argentina, Colombia, Taiwán) y también se ha descrito su diseminación esporádica en diversos países de Europa, incluyendo España, produciendo brotes nosocomiales^{40,50-52}.

- **Clase B (grupo 3 de Bush) o metalobetalactamasas (MBL):** el mecanismo de acción de este grupo de carbapenemasas difiere del de las de clase A y D en que requieren zinc u otro catión divalente en su centro activo, por lo que son inhibidas por quelantes de cationes divalentes, como el EDTA o el ácido dipicolínico^{38,40,53}.

El espectro de acción es amplio e incluye prácticamente todos los betalactámicos, excepto los monobactámicos, como aztreonam⁴⁰. Con frecuencia se detecta en aislados que también producen BLEE o AmpC, lo que les confiere resistencia a aztreonam, suponiendo un reto terapéutico^{54,55}. Se están evaluando nuevos antimicrobianos como el cefiderocol o combinaciones de aztreonam con betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas (p. ej. ceftazidima-avibactam) como opciones terapéuticas^{55,56}.

Los genes que codifican MBL suelen estar codificados en plásmidos lo que facilita su diseminación⁵⁷. Las MBL se dividen en tres subclases (B1, B2 y B3), siendo la más relevante y frecuente la subclase B1, que incluye las de los grupos VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase), IMP (imipenemasa) y NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase)³¹.

- VIM: frecuente en *P. aeruginosa* (principalmente VIM-2) y aunque su incidencia en *Enterobacteriales* es esporádica (principalmente VIM-1 y VIM-4), se han descrito en todo el mundo y son endémicas en Europa (Grecia, España, Hungría y Italia)⁵⁸⁻⁶¹.

- IMP: asociadas principalmente a *P. aeruginosa* y, en menor grado, a *Enterobacterales* (principalmente *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Enterobacter* spp.), los cuales se detectan principalmente en la zona de Asia-Pacífico⁶².
- NDM: se ha diseminado a nivel mundial aunque su prevalencia es heterogénea⁴⁰. Es endémica en India, Pakistán y Bangladesh, aunque otras regiones se consideran reservorios secundarios como la península balcánica, Oriente Medio y el norte de África^{40,63,64}. Además se ha descrito su diseminación esporádica muchos países como por ejemplo España, Francia, Reino Unido, Italia, Canadá o Colombia^{40,65}.

- **Clase D (grupo 2d de Bush):** al igual que en las carbapenemasas de clase A, el mecanismo de hidrólisis implica una serina en el sitio activo³⁸. También se las conoce como oxacilinasas porque hidrolizan preferentemente la oxacilina frente a las penicilinas clásicas⁶⁶. Este tipo de carbapenemasas hidrolizan de forma eficiente las penicilinas (especialmente amino, carboxi y ureidopenicilinas) y cefalosporinas de espectro reducido (p. ej. cefalotina)³⁰. Tienen actividad limitada frente a cefalosporinas de amplio espectro, especialmente ceftazidima, y su inhibición por la mayoría de inhibidores de betalactamasas como ácido clavulánico o tazobactam es limitada³⁰. En general, la actividad carbapenemasa es débil, y es necesario que el aislado, presente otros mecanismos de resistencia, como la presencia de promotores fuertes corriente arriba del gen de la carbapenemasa que aumenta su expresión, la pérdida de porinas o la presencia de BLEE y/o AmpC plasmídicas, para que se genere resistencia a carbapenémicos de alto grado³⁰.

La primera carbapenemasa del grupo OXA-48 fue descrita en 2001 en Estambul en un aislado de *K. pneumoniae* y se diseminó de forma muy eficaz, produciendo un brote durante los años 2006 y 2007^{67,68}. Las carbapenemasas del grupo OXA-48 son las más prevalentes en ciertas regiones del mundo y están emergiendo en aquellas zonas donde no son endémicas³⁰. *K. pneumoniae* es el patógeno nosocomial productor de OXA-48 más frecuente³⁰. Según datos del ECDC, los *Enterobacterales* productores de carbapenemasa del grupo OXA-48 se consideran de "diseminación interregional" en España, Francia, Bélgica y Rumania⁶⁹. Fuera de Europa, se han descrito en Oriente Medio, África, Asia y Sudamérica y son infrecuentes en EEUU⁷⁰. Hay que tener en cuenta que la prevalencia puede ser mayor a la descrita dado que su detección por métodos fenotípicos es complicada^{30,71}. La diseminación global de *bla*_{OXA-48} está asociada principalmente a la transmisión horizontal mediante plásmidos altamente transmisibles IncL/M, aunque la diseminación clonal también juega un papel en clones epidémicos de *K. pneumoniae* (ST147, ST307, ST15 y ST14) o de *E. coli* (ST38 y ST410)³⁰.

Tabla 3. Perfil de hidrólisis y principales características de las carbapenemasas. +: hidrólisis fuerte, ±: hidrólisis débil, -: hidrólisis no descrita. Adaptado de Queenan, Aghamali y Giske y colaboradores^{38,72,73}.

Clase ¹	Grupo funcional ²	Sitio activo	Sinergia con meropenem	Enzima	Perfil de hidrólisis				
					P	CE	CEE	AZ	CP
A	2f	Serina	Ácido clavulánico y ácido fenilborónico	NMC	+	+	+	+	+
				IMI	+	+	+	+	+
				SME	+	+	±	+	+
				KPC	+	+	+	+	+
				GES	+	+	+	-	±
B1	3	Zinc	EDTA y ácido dipicolínico	IMP	+	+	+	-	+
				VIM	+	+	+	-	+
				GIM	+	+	+	-	+
D	2d	Serina	-	SPM	+	+	+	-	+
				OXA	+	+	±	-	±

¹ Clasificación de Ambler, basado en el tamaño molecular y homología entre los aminoácidos del sitio activo. Existen 4 clases moleculares (A, B, C y D) con subclases.

² Clasificación de Bush y Jacoby basado en el espectro de acción y respuesta a los inhibidores.

P: penicilinas, CE: cefalosporinas, CEE: cefalosporinas de espectro extendido, AZ: aztreonam, CP: carbapenémicos.

Según datos del ECDC de 2018, *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa (Kp-PC) era endémico en Grecia, Italia, Malta y Turquía (**Figura 2**)⁷⁴. En un estudio longitudinal realizado entre 2013 y 2017 con aislados clínicos de *Enterobacterales*, se observó que la mayoría de los genes de carbapenemasas (85,8%) se detectaron en *K. pneumoniae*, siendo los genes que codifican carbapenemasas del grupo KPC (51,8%), OXA-48 (38,8%) y del grupo NDM (8,3%) los más frecuentes en esta especie. Además, se observó que la presencia de genes que codifican carbapenemasas del grupo KPC se mantuvo relativamente constante mientras que se detectó un incremento notable de los que codifican carbapenemasas de los grupos OXA-48 y NDM durante el periodo de estudio³⁴. En España, en el periodo 2016-2020, la resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* se ha incrementado de forma significativa (2,1-4,7%)²⁶. Según datos del estudio EuSCAPE 2015, las carbapenemasas más frecuentes en *K. pneumoniae* eran las del grupo OXA-48, seguidas de las del grupo VIM³⁷. La posterior diseminación de genes que codifican carbapenemasas de los grupos KPC y NDM hacen necesario la realización de estudios de prevalencia a nivel nacional más actualizados³⁷. En Andalucía, los datos obtenidos por el programa PIRASOA (Programa integral de prevención y control de las infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria y uso apropiado de los antimicrobianos) en el periodo

2014-2018, indican que *K. pneumoniae* fue la especie productora de carbapenemasa más frecuente y que KPC-3 y OXA-48 fueron las carbapenemasas detectadas con mayor frecuencia⁷⁵. Además, en 2018 se observó un incremento en las MBL asociado a varios brotes⁷⁵.

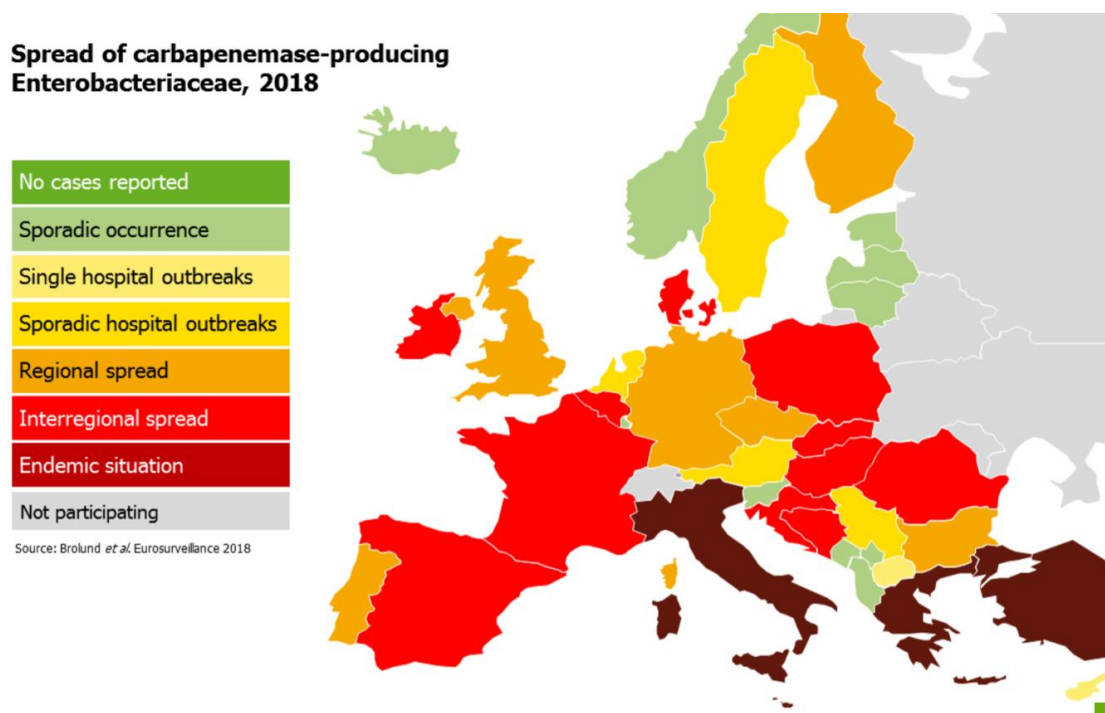


Figura 2. Epidemiología de Kp-PC en Europa en (datos hasta Julio 2018)⁷⁴.

1.1.5. Detección de carbapenemasas en el laboratorio

La detección de carbapenemasas en el laboratorio de Microbiología Clínica puede realizarse por métodos fenotípicos, proteómicos, inmunológicos o moleculares. Entre los métodos fenotípicos destacan el cribado con medios selectivos cromogénicos (p. ej. Brilliance™ CRE [Oxoid], ChromID® CARBA SMART [bioMérieux]), la difusión con discos combinados, pruebas colorimétricas (p. ej. β Carba test™ [Bio Rad], Rapidec® Carba NP [bioMérieux]) y métodos de inactivación del carbapenémico (p. ej. CIM, mCIM, zCIM)⁷⁶. La espectrometría de masas (MALDI-TOF) es el método proteómico más utilizado y la inmunocromatografía de flujo laminar (p. ej. NG-Test Carba 5™ [NG Biotech]) el método inmunológico más utilizado⁷⁶. Entre los métodos moleculares destacan métodos de PCR múltiple (p. ej. Xpert Carba-R® [Cepheid]), microarrays (p. ej. algunos paneles de Biofire® Filmarray® [bioMérieux]), y secuenciación del genoma completo⁷⁶.

La detección fenotípica de carbapenemasas puede resultar compleja, especialmente las del grupo OXA-48. Algunas variantes (p. ej. OXA-163, OXA-232, OXA-405) tienen una baja eficacia catalítica frente a carbapenémicos o una expresión reducida o moderada de la enzima, por lo

que suelen ser sensibles *in vitro*, con valores de CMI a carbapenémicos inferiores a 0,25 mg/L⁷¹. Para su detección es necesario recurrir a técnicas inmunocromatográficas o moleculares⁷¹. Por otro lado, en la resistencia a carbapenémicos pueden estar implicados otros mecanismos de resistencia, como por ejemplo alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mediada por la ausencia o disminución de la expresión de porinas, o incluso otras betalactamasas (p. ej. BLEE, AmpC plasmídica)⁷³.

1.1.6. *K. pneumoniae* como reservorio de genes de carbapenemasas

K. pneumoniae se caracteriza por presentar una gran capacidad para capturar plásmidos que contienen genes de resistencia antimicrobiana y por tener una amplia distribución en diferentes entornos (p. ej. hospitalario, comunitario, industria alimentaria, medio ambiente) y huéspedes (humano, animales, plantas)¹¹. Estas características permiten que este microorganismo pueda actuar como reservorio de genes de carbapenemasas, así como de otros genes de resistencia antimicrobiana, y participar en su diseminación entre diferentes nichos ecológicos¹¹. Por ello, el control de la diseminación de Kp-PC requiere un enfoque “*One Health*”, es decir, un abordaje multidisciplinar, que tenga en cuenta la interacción entre personas, animales domésticos y salvajes, plantas y el medio ambiente.⁷⁷.

Como se ha comentado previamente, el principal reservorio de *K. pneumoniae* en el entorno hospitalario es la colonización gastrointestinal de los pacientes hospitalizados, aunque también se han descrito reservorios ambientales (p. ej. superficies, desagües, dispositivos médicos) que pueden contribuir en su diseminación facilitando la aparición de brotes^{22,78–82}. El aislamiento de pacientes portadores, la higiene de manos del personal sanitario y la limpieza y desinfección del entorno son esenciales en el control de infección nosocomial⁸³.

Los animales también pueden suponer un reservorio de Kp-PC, lo que supone un riesgo potencial de transmisión al ser humano⁸⁴. Se ha aislado Kp-PC en animales de compañía, animales destinados a la producción de alimentos y animales salvajes⁸⁴. Los animales domésticos como perros, gatos, pájaros o caballos, pueden ser portadores o tener infecciones causadas por Kp-PC (p. ej. productores de OXA-48, KPC-2, VIM-1), generalmente adquiridas de sus dueños o tras entrar en contacto con clínicas veterinarias^{77,84}. También se ha descrito Kp-PC en diferentes muestras de animales procedentes de la industria alimentaria como *K. pneumoniae* productor de NDM-5 en muestras de heces procedentes de vacas de la industria láctea en China, o *K. pneumoniae* productor de diferentes tipos de carbapenemasas (p. ej. del grupo OXA-48, KPC, NDM) en carne de pollo en trabajos realizados en Egipto⁸⁴. También se ha descrito Kp-PC (p. ej. productor de carbapenemasas del grupo OXA-48, NDM-, KPC-2, KPC-3, IMP-4) en muestras de

heces de animales salvajes como aves migratorias en Europa y Australia o de jabalíes en un trabajo realizado en Algeria^{84,85}. En la Unión Europea, el uso de carbapenémicos en animales destinados a consumo humano no está permitido y en animales de compañía está muy limitado⁸⁶. Por otra parte, se ha descrito la presencia de Kp-PC en vegetales para consumo humano (p. ej. productor de OXA-48 en diferentes vegetales en Algeria o productor de KPC-2 en pepinos en China) y en aguas residuales o tratadas, lo que resulta preocupante por el potencial riesgo de contaminación de suelos y alimentos mediante el riego⁸⁷⁻⁸⁹.

Finalmente, son necesarias estrategias a nivel mundial para el control de la diseminación de Kp-PC. La introducción de una carbapenemasa en una región puede deberse a la importación desde un área endémica, favorecida por la globalización y las diferencias en las normativas entre países¹⁶. Por ejemplo, la primera NDM-1 fue descrita en 2008 en aislados de *K. pneumoniae* y *E. coli* de un paciente originario de Suecia que había viajado a la India⁹⁰. Inicialmente esta carbapenemasa estaba asociada a hospitalizaciones en ese continente y ha alcanzado una distribución mundial^{53,90}.

1.1.7. Elementos genéticos móviles implicados en la diseminación de genes que codifican carbapenemasas

Los genes que codifican carbapenemasas pueden localizarse en el cromosoma bacteriano y/o en plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad (p. ej. IncFII, IncI2, IncL/M, IncN, IncA/C, IncR, IncX, y ColE1)^{79,91}. Las plataformas o elementos genéticos móviles (EGM) implicados en la diseminación de carbapenemasas incluyen transposones (p. ej. Tn1999, Tn4401), integrones (p. ej. integrones de clase I) y secuencias de inserción (p. ej. ISAb125, ISEcp1) y pueden estar asociados a determinantes de resistencia a otros antimicrobianos como aminoglucósidos o quinolonas⁹¹.

Las carbapenemasas de clase A codificadas por genes plasmídicos (p. ej. KPC, GES, FRI-1), son frecuentes y suelen estar asociados a EGM eficientes³⁹. Los genes *bla*_{KPC} están localizados en plásmidos conjugativos de gran tamaño (p. ej. IncFIIK1, IncN, IncX3, IncR, IncHI1, IncI2, ColE1), con varios replicones que permiten su diseminación entre especies bacterianas diferentes^{16,39,42}. Generalmente están asociadas al transposón Tn4401, que presenta una elevada frecuencia de movilización y suele contener otros genes de resistencia a betalactámicos (p. ej. *bla*_{CTX-M-15}), así como genes de resistencia otros grupos de antimicrobianos, como aminoglucósidos (p. ej. *aac(6')-Ib*) o quinolonas (p. ej. *qnrA*, *qnrB*)^{16,39,42,92}.

Los genes que codifican MBL suelen estar localizados en plásmidos o transposones, lo que facilita su diseminación⁵⁷. Estos EGM generalmente contienen determinantes de resistencia a

otros grupos de antimicrobianos por lo que los aislados que los portan suelen ser multiresistentes^{57,93}. Los genes que codifican carbapenemasas de tipo IMP y VIM generalmente se localizan en integrones de clase I^{57,94}. Estos integrones suelen contener determinantes de resistencia a otros antimicrobianos como a aminoglucósidos (p. ej. *aacA4*, *aadA1*, *aadB*), betalactamasas de clase D p. ej. (*bla_{OXA}*), cloranfenicol (p. ej. *catB*), o incluso resistencia a antisépticos (p. ej. *qacΔG*), por lo que sus portadores suelen ser aislados multiresistentes⁵⁷. Generalmente, los genes que codifican IMP están asociados a plásmidos IncL/M e IncA/C y los de VIM a plásmidos IncN en *K. pneumoniae* o IncFI/II en *E. coli*⁶¹. Por el contrario, los genes que codifican carbapenemasas del grupo NDM se ha localizado en diferentes contextos genéticos, en múltiples tipos de plásmidos (p. ej. IncX3, IncFII, IncC, IncA/C) y suele estar asociado a la secuencia de inserción IS*Aba125*^{57,94}. El gen *bla_{NDM-1}* suelen estar codificado en plásmidos que contienen determinantes de resistencia a betalactámicos de tipo *bla_{CMY}*, *bla_{TEM}*, o *bla_{OXA}*, aminoglucósidos (p. ej. *rmtA*, *rmtC*) o quinolonas (p. ej. *qnrA*), dando lugar a aislados multiresistentes⁶⁴.

Los genes que codifican carbapenemasas del grupo OXA-48 generalmente están codificados en plásmidos, aunque se ha descrito su integración en el genoma³⁰. El gen que codifica OXA-48, *bla_{OXA-48}*, está asociado al transposón compuesto Tn1999 o sus variantes (p. ej. Tn1999.2 y Tn1999.3) y se localiza principalmente en el plásmido *pOXA-48a-like* del tipo IncL (IncL/M)³⁰. Estos plásmidos son conjugativos, altamente transmisibles, pueden diseminarse entre diferente especies de *Enterobacteriales* (p. ej. *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*) y no suelen contener otros genes de resistencia antimicrobiana³⁰. Otros genes de carbapenemasas de este grupo están asociadas a otros EGM y plásmidos. *bla_{OXA-181}* está asociada a la secuencia de inserción IS*Ecp1* y el transposón Tn2013 insertados en plásmidos IncX3, IncN1, IncT o ColE2, *bla_{OXA-232}* a la secuencia de inserción IS*Ecp1* y al transposón Tn2013 localizados en plásmidos ColKP3-type y *bla_{OXA-204}* al transposón Tn2016 insertados en plásmidos IncA/C³⁰.

1.1.8. Papel de los clones epidémicos o de alto riesgo de *K. pneumoniae* en la diseminación de genes que codifican carbapenemasas

La ausencia de una definición estándar de clon epidémico supone un inconveniente a la hora de diferenciar un clon epidémico de un clon no epidémico o esporádico⁹⁵. A pesar de ello, existe cierto consenso en las características que debe reunir un aislado para ser considerado epidémico o de alto riesgo. Las características principales son tener gran capacidad de diseminación y distribución global, capacidad para la adquisición y acumulación de determinantes de patogenicidad, supervivencia y resistencia antimicrobiana, capacidad para colonizar, persistir y transmitirse de forma eficiente entre hospedadores, poseer una elevada patogenicidad y *fitness*

y tener capacidad para causar infecciones graves y/o recurrentes^{16,37,95-97}. Hay cierta controversia sobre si el fenotipo multirresistente es una característica intrínseca de los clones epidémicos, ya que la epidemiología y virulencia de los aislados con fenotipo salvaje están menos estudiadas⁹⁵.

La diseminación de *K. pneumoniae* productor de BLEE, principalmente CTX-M-15, se debe principalmente a la diseminación de diferentes plásmidos exitosos que codifican múltiples determinantes de resistencia, aunque también se ha descrito la diseminación de clones epidémicos a nivel local (p. ej. ST11, ST15 y ST147 en Hungría o ST490 en Oxfordshire, Reino Unido)^{98,99}. Por el contrario, la diseminación mundial de *K. pneumoniae* no sensible a carbapenémicos se debe principalmente a la diseminación de clones epidémicos como los pertenecientes al complejo clonal 258 productor de carbapenemasas del grupo KPC, los secuenciotipos ST147, ST307, ST14 y ST15 principalmente productores de OXA-48 y los secuenciotipos ST11, ST15, ST14, ST147, ST395 y ST405 productores de carbapenemasas del grupo NDM^{30,59,100}. En Europa, la expansión de la resistencia a carbapenémicos está causada principalmente por transmisión nosocomial a partir de la expansión de clones exitosos portadores de carbapenemasa³⁷. Según datos del estudio EuSCAPE, primer estudio sistemático de la incidencia y epidemiología de *K. pneumoniae* no sensible a carbapenémicos que incluye aislados de 2013-2014, casi el 70% de los aislados de Kp-PC pertenecen a los secuenciotipos ST11, 15, 101, 258/512 o sus derivados, portadores de las carbapenemasas más prevalentes a nivel mundial (grupo KPC, grupo OXA-48, grupo NDM, grupo VIM y grupo IMP)³⁷. Según el trabajo de Wyres y colaboradores la distribución los secuenciotipos en *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos varía en función de la región, mientras que en el norte y oeste de Europa la distribución es variada, en el sur predomina el CC258/512 y en el este ST101 seguido de ST11 y ST15³. En España *K. pneumoniae* es la principal especie productora de carbapenemasas siendo los clones más frecuentes ST15, ST11 y ST405 seguido de ST147 y ST258 y las carbapenemasas más frecuentes las de los grupos OXA-48 y VIM seguidas del grupo KPC^{37,50,101-103}.

1.1.9. Antimicrobianos con actividad frente a *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa

La diseminación de carbapenemasas en *K. pneumoniae* tiene importantes repercusiones terapéuticas, debido a las escasas opciones de tratamiento disponibles, especialmente en aislados resistentes a otros grupos de antimicrobianos^{54,64}. En la **Tabla 4** se resume la actividad de algunas de las opciones terapéuticas en infecciones producidas por *Enterobacterales* productores de carbapenemasas y su indicación^{104,105}. Ceftolozano-tazobactam no presenta

actividad frente a *Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos pero sí frente a *P. aeruginosa* resistente a carbapenémicos^{104,105}.

Tabla 4. Actividad e indicaciones de diferentes opciones terapéuticas frente a *Enterobacterales* productores de carbapenemasa.

	Actividad frente a carbapenemasas de			Indicación (FDA/EMA)	Comentarios
	Clase A	Clase B	Clase D		
Fosfomicina	Sí	Sí	Sí	ITUc/PN	
Ceftazidima-avibactam	Sí	No	Sí	ITUc/PN, IIAC, NH/NVM	Combinado con aztreonam frente a NDM
Ceftolozano-tazobactam	No	No	No	ITUc/PN, IIAC, NN	Activo frente a <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos
Meropenem-vaborbactam	Sí	No	No	ITUc/PN, IIAC, NH/NVM	
Imipenem-relebactam	Sí	No	No	ITUc/PN, IIAC (FDA); NH/NVM y bacteriemia (EMA)	
Cefiderocol	Sí	Sí	Sí	ITUc/PN, NH/NVM (FDA); IGNR (EMA)	

EMA: Agencia Europea del Medicamento (por sus siglas en inglés), FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés), IGNR: infecciones producidas por Gram negativos resistentes, IIAC: infección intraabdominal complicada, ITUc: ITU complicada, NH: neumonía adquirida en el hospital, NN: neumonía nosocomial, NVM: neumonía asociada a ventilación mecánica, PN: pielonefritis. Adaptado de Doi y colaboradores y Tompkins y Van Duin^{104,105}.

1.2. Biocidas

Los biocidas, según la Directiva 98/9/CE del Parlamento Europeo, son sustancias activas o preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos¹⁰⁶. Un biocida debe ser suficientemente efectivo sin producir efectos no deseados directa o indirectamente sobre los organismos diana (p. ej. tolerancia o resistencia cruzada), en la salud humana o animal o sobre el medio ambiente, por sí mismo o por sus residuos¹⁰⁶. Los biocidas, tanto los desinfectantes como los antisépticos, son ampliamente utilizados en el entorno sanitario, la industria alimentaria y agrícola y en el ámbito doméstico¹⁰⁷.

La limpieza y el uso de desinfectantes sobre superficies tiene un papel importante en el control de la infección nosocomial^{9,108}. La desinfección implica la reducción de la cantidad de microorganismos viables a un nivel previamente especificado como apropiado⁹. Entre los desinfectantes de superficies y dispositivos médicos más utilizados encontramos alcoholes, cloro y compuestos de cloro, peróxido de hidrógeno, yodóforos, compuestos fenólicos y compuestos de amonio cuaternario⁹. La limpieza y desinfección del entorno sanitario se ha demostrado esencial en la prevención de infecciones en el entorno hospitalario causadas por algunos patógenos Gram positivos como *S. aureus* resistente a meticilina (SARM), enterococo resistente a vancomicina y *Clostridioides difficile*, aunque son necesarios más estudios para determinar su impacto sobre la prevención de infecciones causadas por *Enterobacteriales*^{78,109,110}. El entorno inmediato de un paciente colonizado por *Enterobacteriales* multirresistentes se contamina con el mismo genotipo durante períodos prolongados y, aunque la limpieza del entorno del paciente puede ayudar a reducir la transmisión potencial, se desconoce el impacto de esta medida por sí sola^{78,111-113}.

Los antisépticos destruyen o inhiben el crecimiento de microorganismos sobre tejidos vivos¹¹⁴. Estos productos se utilizan sobre la piel o mucosas para la higiene de rutina, el tratamiento previo a una intervención quirúrgica y el tratamiento de infecciones o impregnando materiales (p. ej. catéteres, gasas)¹¹⁵. Estos productos deben tener un amplio espectro de actividad biocida, presentar una acción rápida, baja absorción y causar poco o ningún daño, irritación o toxicidad en el tejido¹¹⁵. Entre los antisépticos más utilizados encontramos los alcoholes, la clorhexidina y la povidona yodada¹¹⁵. Aunque existe cierta controversia sobre la eficacia de la antisepsia de la piel en estrategias preventivas, la higiene de manos del personal sanitario, que puede ser realizada con productos que contienen biocidas, es la principal medida de control de infección

nosocomial¹¹⁶⁻¹¹⁸. Asimismo, la descolonización nasal de SARM previa a ciertas intervenciones quirúrgicas (p. ej. cirugía cardíaca, artroplastia de rodilla o cadera) y la antisepsia de la piel es una práctica habitual que está asociada a la prevención de infecciones¹¹⁹⁻¹²². Por el contrario, la descolonización de la piel por *Enterobacterales* y otros microorganismos Gram negativos multirresistentes es más controvertido. En algunos estudios esta práctica se asocia a la prevención de infecciones mientras que en otros no se encuentra relación y se advierte de la potencial aparición de infecciones causadas por la contaminación de estos productos y la posible selección de microorganismos resistentes^{110,116,123-125}. Estas cuestiones justifican la necesidad de estudios más exhaustivos sobre su utilización que permitan realizar recomendaciones adecuadas en las guías de prevención de infecciones.

En el caso de *K. pneumoniae*, es necesario un abordaje multidisciplinar en el control y vigilancia de infecciones y brotes. Los desinfectantes y antisépticos se utilizan en algunas de las estrategias como la optimización de la limpieza y descontaminación del entorno, el control de los reservorios ambientales y la higiene de manos del personal sanitario⁸³. Aunque el principal reservorio de *K. pneumoniae* es la colonización gastrointestinal de los pacientes, se han descrito reservorios ambientales en los que este microorganismo es capaz de sobrevivir durante largos periodos de tiempo^{22,78-80}. Cuando estos reservorios persistentes se forman en el entorno hospitalario o en dispositivos médicos invasivos (p. ej. endoscopios, catéteres), pueden tener un papel relevante en la diseminación o transmisión de *K. pneumoniae*^{22,78}. Los desagües de los lavabos, donde se forman biopelículas bacterianas, tienen especial importancia, por su posible papel en el mantenimiento de brotes que pueden durar meses o años y porque constituyen un medio idóneo para la transmisión de determinantes de resistencia antimicrobiana entre bacterias de la misma especie o de diferentes especies bacterianas^{78,82}. La eliminación de estos reservorios no es sencilla, y generalmente, este tipo de brotes se controlan mediante la utilización adecuada de los lavabos y el reemplazamiento de los sumideros, sifones y desagües sospechosos^{78,82}. Las manos del personal sanitario así como los guantes y las batas también pueden tener un papel importante en la transmisión de *K. pneumoniae* a partir de reservorios ambientales o entre pacientes¹²⁶⁻¹²⁹.

1.2.1. Clasificación de los biocidas

En la **Tabla 5** se indican los principales biocidas de uso hospitalario, algunas de las presentaciones más habituales y los usos más comunes.

Tabla 5. Principales biocidas de uso hospitalario, presentación más habitual y usos más comunes^{114,130}.

Grupo	Principales biocidas	Presentación	Uso
Alcohol	Etanol, Isopropanol	Soluciones de higiene de manos (Sterillium®), alcohol de 96º	Desinfectantes, antisépticos y conservantes
Halógenos	Compuestos clorados, Lejía	Productos de desinfección y limpieza de superficies	Desinfectantes y productos de limpieza
	Povidona yodada	Antisépticos de la piel	Antisépticos
Peroxígenos	Peróxido de hidrogeno	Solución (agua oxigenada)	Desinfectantes y antisépticos
Biguanidas	Digluconato de clorhexidina	Cremas y soluciones antisépticas	Desinfectantes, antisépticos y conservantes
Compuestos amonio cuaternario	de Cloruro de benzalconio, cetrimida	Cremas antisépticas y productos de desinfección de superficies	Desinfectantes, antisépticos, conservantes y productos de limpieza
Aldehídos	Glutaraldehído, formaldehído	Soluciones o en vapor	Desinfectantes, conservantes y esterilización
Fenoles	Fenol y sus derivados, triclosán	Soluciones, jabones, cremas.	Desinfectantes y conservantes

1.2.2. Regulación del uso de biocidas

La regulación de los desinfectantes y antisépticos es compleja y está sujeta a múltiples normativas en función del uso previsto para el producto¹³¹.

Las sustancias activas autorizadas en Europa para su uso como biocida están recogidas en una lista única publicada por la Agencia Química Europea (ECHA, por sus siglas en inglés)¹³². La comercialización y el uso de los biocidas en Europa está regulado por el Reglamento (UE) N° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de mayo de 2012¹³³. En España además, los desinfectantes que se utilizan en superficies y en el ambiente sanitario deben ser aprobados por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) y mostrar en el etiquetado el número de autorización según la Directiva Europea (RD 1054/2002), regulado por el Real Decreto 1054/2002¹³¹. Los desinfectantes de productos sanitarios, tanto los de uso invasivo (p. ej. endoscopios) como no invasivo (p. ej. camillas, monitores) están regulados por el Real Decreto 1591/2009 y deben tener el marcado CE¹³¹. Actualmente la normativa española no

ha sido actualizada según la última modificación de la normativa europea por lo que no todos los desinfectantes de productos sanitarios aprobados cumplen los mismos requisitos¹³¹.

1.2.3. Composición, aplicaciones, mecanismo de acción y espectro de actividad antimicrobiana de los biocidas

En la **Tabla 6** se describen algunas de las características más relevantes algunos de los biocidas que se utilizan con mayor frecuencia, y en la **Figura 3** se muestran sus estructuras químicas.

Tabla 6. Biocidas estudiados en este trabajo, grupo al que pertenecen, concentraciones de uso más frecuentes y efecto de la materia orgánica en su actividad^{130,134-144}.

Biocida	Grupo	Concentración de uso más frecuente en ámbito hospitalario	Inactivación por materia orgánica
Povidona yodada	Halógeno	5-10%	Leve-moderado
Hipoclorito de sodio	Halógeno	Desinfectante: 0,05-0,5%	Elevado
Digluconato de clorhexidina	Biguanida	Antiséptico: 0,05-4% Desinfectante: 0,05-0,5%	Elevado
Cloruro de benzalconio	Compuesto de amonio cuaternario	Desinfectante: 0,25-0,5% Antiséptico: 0,01-0,1%	Elevado
Etanol	Alcohol	Antiséptico y desinfectante: 60-90% DMBS: 70-95%	Elevado
Triclosán	Compuesto fenólico	Vetado. Únicamente permitido $\leq 0,3\%$ en productos cosméticos (jabones, desodorantes) y $\leq 0,2\%$ en enjuague bucal	No descrito

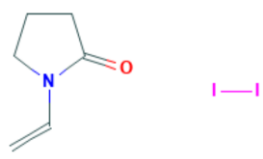


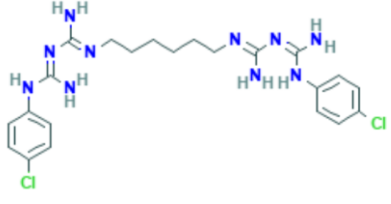
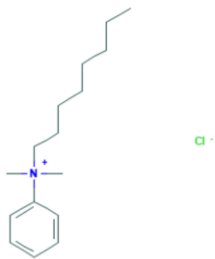
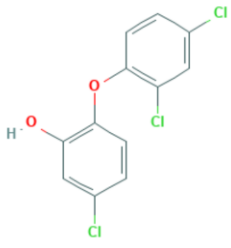
Povidona yodada	Hipoclorito de sodio	Alcohol (Etanol)
		
Digluconato de clorhexidina	Cloruro de benzalconio	Triclosán
		

Figura 3. Estructura química de povidona yodada, hipoclorito de sodio, etanol, cloruro de benzalconio, digluconato de clorhexidina y triclosán¹⁴⁵.

- Soluciones yodadas y yodóforos (povidona yodada).** Las soluciones yodadas se obtienen al disolver yodo, yoduro de potasio o yoduro de sodio en agua o alcohol, mientras que los yodóforos consisten en la unión de polímeros neutros de alto peso molecular al yodo molecular¹¹⁴. Estos compuestos presentan múltiples ventajas, son inodoros, solubles en agua, presentan mayor estabilidad y requieren una menor concentración de yodo para tener actividad antimicrobiana que las soluciones yodadas, lo que reduce los riesgos asociados con la toxicidad, decoloración e irritación¹¹⁴. El más utilizado es la povidona yodada, un complejo formado con el polímero poli(N-vinil-2-pirrolidona), con el que se producen soluciones con base acuosa (agua) u orgánica (p. ej. alcohol) que contienen un 9-12% de yodo disponible calculado en base seca^{114,130}.

Las soluciones yodadas han sido ampliamente utilizadas como antiséptico en antisepsia preoperatoria y para el tratamiento de heridas y quemaduras y, aunque siguen utilizándose, pueden ser irritantes, sobre todo si se producen aplicaciones repetidas¹¹⁴. Los yodóforos han permitido la ampliación de sus aplicaciones como desinfectantes para lavado de manos del personal sanitario y de quirófano, preparaciones preoperatorias, champús, limpiadores de heridas y mordeduras y productos para la higiene bucal^{114,130,141}. También se utilizan en la desinfección de superficies en aplicaciones agrícolas, alimentarias y veterinarias, y pueden usarse para la desinfección de aguas potables, aguas residuales y en el tratamiento de piscinas, aunque suele utilizarse únicamente en situaciones de emergencia¹¹⁴. No suelen utilizarse en la desinfección de dispositivos médicos ya que puede ser incompatible con

algunos materiales especialmente metálicos o plásticos, causando corrosión o manchas marrones¹¹⁴. Las soluciones de yodo son venenosas a altas concentraciones (>5%) y pueden irritar la piel no intacta y las mucosas, aunque estos efectos nocivos se ven reducidos en el caso de los yodóforos¹¹⁴. La povidona yodada, se considera un biocida seguro, aunque su uso prolongado puede producir disfunción tiroidea por lo que se debe monitorizar a los pacientes que requieran un tratamiento prolongado¹⁴⁶.

Se desconoce el mecanismo de acción exacto del yodo aunque, al igual que de otros halógenos, se sabe que es un agente oxidante de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos¹¹⁴. Tiene múltiples efectos sobre la pared celular, membrana celular y citoplasma, lo que provoca la pérdida de la función celular y la muerte¹¹⁴. En el caso de los virus, es probable que el yodo afecte a las proteínas de la superficie de los virus envueltos y que desestabilice los ácidos grasos de la membrana¹¹⁴.

Las soluciones yodadas, son biocidas de amplio espectro con una potente actividad frente a bacterias, hongos, micobacterias y virus¹¹⁴. Por el contrario, los yodóforos se consideran menos activos contra ciertos hongos y esporas, aunque presentan cierta actividad antimicrobiana residual, es decir que su actividad se mantiene en el tiempo¹¹⁴. La actividad antimicrobiana de estos productos varía según la formulación y las condiciones, por ejemplo las soluciones acuosas son más activas a pH ácido mientras que los yodóforos pueden formularse en un rango de pH más amplio¹¹⁴.

Concretamente frente a *K. pneumoniae* se ha descrito su actividad bactericida a diferentes tiempos de exposición y concentraciones, como 15 segundos al 0,07% o 5 minutos al 10%^{130,147}. Además, hay que destacar que la povidona yodada tiene una buena actividad frente a biopelículas de diversos microorganismos como *K. pneumoniae*, *S. aureus* o *P. aeruginosa*¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

- **Compuestos clorados e hipoclorito de sodio o lejía (NaClO).** Los hipocloritos son los desinfectantes de cloro más utilizados y están disponibles en forma líquida (hipoclorito de sodio) o sólida (hipoclorito de calcio)⁹. El uso de hipoclorito de sodio como desinfectante de superficies está muy extendido en el ámbito doméstico, sanitario e industrial^{114,130}. Otras aplicaciones importantes son la cloración de aguas y el blanqueamiento de tejidos¹⁵⁰. En el ámbito sanitario, el hipoclorito de sodio se utiliza como desinfectante de superficies y de material sanitario (0,0125–0,05%)¹³⁰. Las principales ventajas son que no deja residuos tóxicos, es económico y de acción rápida, no se ve afectado por la dureza del agua y elimina biopelículas de las superficies⁹. Históricamente el hipoclorito de sodio fue

ampliamente utilizado como antiséptico para heridas, pero ha caído en desuso por su toxicidad y la irritación que causan en comparación con otros biocidas^{151,152}. A pesar de ello, continua teniendo algunas aplicaciones antisépticas como la irrigación endodóntica (0,5-6%) o como componente de soluciones para el tratamiento de heridas^{153,154}.

El hipoclorito de sodio en soluciones acuosas libera compuestos clorados activos que incluyen el cloro elemental (Cl_2), el ion hipoclorito (OCl^-) y el ácido hipocloroso (HOCl)¹⁵⁰. La actividad antimicrobiana se debe principalmente a este último, aunque resulta de una combinación de los tres compuestos¹⁵⁰. La estabilidad del cloro libre disponible en solución depende de varios factores, especialmente de la concentración de cloro, el pH, la presencia de materia orgánica y la exposición a la luz¹⁴². Como otros compuestos halógenos, el mecanismo de acción del hipoclorito de sodio se basa en la oxidación de proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos¹⁵⁰. Se cree que el modo de acción primario es la oxidación de proteínas estructurales y funcionales¹⁵⁰. Además, estos compuestos alteran la pared, la membrana celular y las actividades enzimáticas asociadas a la membrana¹⁵⁰.

El cloro disponible está bien establecido como un biocida de amplio espectro, es altamente eficaz a concentraciones muy bajas de cloro (0,1-0,3 mg/litro) frente a bacterias y se ha demostrado su actividad frente a *K. pneumoniae* a diferentes concentraciones y tiempos de exposición (p. ej. 0,01% durante 5 minutos, 10% durante 5 o 60 minutos) y en la erradicación de biopelículas formadas por este microorganismo (a partir de 2.000 $\mu\text{g/litro}$)^{150,155,156}. También es eficaz frente a micobacterias, hongos, virus envueltos y no envueltos y esporas bacterianas, pero se requieren concentraciones más elevadas¹⁵⁰.

- **Clorhexidina, digluconato de clorhexidina.** La clorhexidina es un biocida del grupo de las biguanidas, que son compuestos que contienen el ligando $\text{C}_2\text{H}_7\text{N}_5$ ¹¹⁴. La clorhexidina es insoluble en agua por lo que se presenta en forma de sales, de las cuales el digluconato de clorhexidina es la más utilizada, aunque existen otras presentaciones como el diacetato de clorhexidina y el dihidrobromuro de clorhexidina¹¹⁴.

La clorhexidina se encuentra en muchos productos de uso doméstico como jabones antimicrobianos, enjuagues bucales, como conservante de soluciones de lentes de contacto y en productos de desinfección de suelos¹¹⁴. También se utiliza en productos sanitarios profesionales (a concentración 0,5-4%) como antisépticos para el lavado de manos del personal sanitario incluyendo al de quirófano, productos para el tratamiento de heridas y quemaduras, en la desinfección de instrumental médico y en la descolonización de la piel^{114,130}. La clorhexidina es muy eficaz en el control de la transmisión nosocomial de

patógenos como SARM y tiene actividad residual, por lo que continua teniendo actividad bacteriostática tras el lavado de la piel¹¹⁴. El uso generalizado de la clorhexidina se debe a su mínima irritación de la piel y las mucosas y a su amplia actividad bactericida¹¹⁴.

Las biguanidas, incluyendo la clorhexidina, actúan principalmente sobre las membranas celulares, causando su pérdida de estructura y de función¹¹⁴. En el caso de las bacterias Gram negativas se ha propuesto la siguiente secuencia en el mecanismo de acción¹¹⁴. Inicialmente son atraídos por la carga negativa de la superficie bacteriana y se unen fuerte y específicamente a los compuestos que contienen fosfato¹¹⁴. Esto hace que la membrana externa pierda integridad y que las biguanidas penetren hacia la membrana interna, donde se unen a los fosfolípidos, lo que aumenta la permeabilidad de la membrana y produce un efecto bacteriostático¹¹⁴. Finalmente provoca una pérdida completa de la función de la membrana y la precipitación de los componentes intracelulares produciendo un efecto bactericida¹¹⁴.

En general, las biguanidas son biocidas de amplio espectro y su actividad puede potenciarse con la combinación de otros biocidas como alcoholes o compuestos de amonio cuaternario (QACs)¹¹⁴. Digluconato de clorhexidina, presenta muy buena actividad frente a bacterias Gram positivas y virus envueltos, aunque también es un biocida eficaz frente a bacterias Gram negativas^{9,114}. Frente a *K. pneumoniae* es efectivo en diferentes presentaciones (p. ej. preparaciones para la higiene de manos o para la preparación preoperatoria de la piel), concentraciones y tiempos de exposición (p. ej. 0,005% durante 15 minutos, 0,5% durante 5 minutos) y es eficaz en la reducción de las biopelículas (1/2 de la CMI del aislado plantónico durante 24 horas)^{130,147,157,158}. Por el contrario, su actividad frente a hongos y micobacterias es limitada y no tiene actividad esporicida por sí sola, aunque sí en combinación con otros biocidas o a elevadas temperaturas^{9,114}. Polihexanida-betaína, es un biocida que contiene una biguanida y que tiene actividad bactericida frente a aislados de *S. aureus*, *E. faecium*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*, incluyendo clones de alto riesgo y aislados multirresistentes¹⁵⁹. Además, presenta mayor actividad que la clorhexidina frente a biopelículas¹⁶⁰.

- **Compuestos de amonio cuaternario, cloruro de benzalconio.** Los QACs son agentes tensioactivos catiónicos que tienen una estructura NR_4^+ , donde R representa a grupos que contienen carbono e hidrógeno, en los que al menos uno debe tener una longitud de cadena de entre 8 y 12 carbonos para tener actividad antiséptica y desinfectante^{141,142,161}. Los QACs más utilizados son el cloruro de benzalconio, bromuro de cetiltrimetilamonio y cloruro de cetilpiridinio, aunque muchos productos se basan en mezclas de homólogos¹⁴².

El cloruro de benzalconio tiene múltiples aplicaciones en diferentes ámbitos, incluyendo el doméstico, agrícola, industrial y clínico¹⁶¹. Entre las aplicaciones domésticas se puede destacar su presencia en suavizantes de tejidos, productos de higiene personal (p. ej. champús, acondicionadores y lociones corporales) o soluciones oftálmicas¹⁶¹. En el ámbito clínico, el cloruro de benzalconio se utiliza para la desinfección preoperatoria de la piel, la desinfección de mucosas y en soluciones para la irrigación de vejiga y uretra¹⁴².

El mecanismo de acción de los QACs es desconocido, pero se ha atribuido a la alteración de la membrana celular, la inactivación de las enzimas productoras de energía y la desnaturalización de las proteínas celulares esenciales¹⁴².

Los QACs son biocidas con propiedades antimicrobianas de amplio espectro contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y virus envueltos^{142,161}. Entre las bacterias Gram negativas, se ha observado una mayor tolerancia en *P. aeruginosa*¹⁴². Los QAC tienen actividad antifúngica, aunque su efecto es fungistático más que fungicida¹⁴². En general no presentan actividad esporicida, ni frente a micobacterias o a virus no envueltos¹⁴². Es importante tener en cuenta que la eficacia de los QACs se ve afectada en gran medida por la presencia de materia orgánica, lo que puede limitar su utilidad¹⁴². En el caso de *K. pneumoniae*, el cloruro de benzalconio es bactericida (al 0,5% durante 60 minutos, al 7% durante 5 y 60 minutos) y tiene actividad frente a biopelículas (CMI del asilado plantónico durante 24 horas)^{130,157,158}.

- **Alcoholes, etanol al 70% (C₂H₆O).** Los alcoholes son compuestos orgánicos en los que al menos un grupo hidroxilo (–OH) está unido a un átomo de carbono saturado¹⁶².

El alcohol tiene múltiples aplicaciones en higiene humana, desinfección, conservación de productos y se utilizan como combustibles o anticongelantes¹⁶³. En el entorno sanitario, los usos más frecuentes son la desinfección de manos del personal, la desinfección de la piel del paciente, la desinfección de superficies o el enjuague de los canales de los endoscopios tras su procesamiento manual^{114,130}. El etanol está catalogado por la OMS como antiséptico al 70% y como desinfectante en soluciones para la higiene de manos al 80% (DMBA)¹⁶⁴.

El mecanismo de acción específico de los alcoholes es desconocido, pero parece ser que tienen múltiples efectos tóxicos sobre la estructura y el metabolismo de los microorganismos, principalmente debido a la desnaturalización y coagulación de las proteínas¹¹⁴. Además, los alcoholes interfieren directamente con la producción de metabolitos y causan la pérdida de integridad de la pared celular o la envuelta viral, lo que conduce a la lisis¹¹⁴. Soluciones del 60-80% de alcohol serían las más efectivas, ya que a

mayores concentraciones se cree que coagula las proteínas de la pared celular, impidiendo la entrada del alcohol dentro de la bacteria¹¹⁴.

Los alcoholes tienen una actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a bacterias (30 segundos con etanol al 70%) y micobacterias, siendo rápidamente bactericida¹¹⁴. La eficacia contra hongos y virus es variable y más lenta (2 minutos con etanol al 70%), y tiene mayor actividad frente a los virus envueltos que frente a los no envueltos¹¹⁴. Aunque, inhiben la esporulación y la germinación de las esporas, este efecto es reversible, por lo que no son esporicidas¹¹⁴. La actividad bactericida de diversas concentraciones de etanol frente a diversos microorganismos es efectiva (ej. en 1 minuto frente a *K. pneumoniae* al 70% y en 10 segundos frente a *P. aeruginosa* al 30-100%, frente a *Serratia marcescens*, *E. coli* y *Salmonella enterica* serovar Typhi al 40-100% y frente a *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes* al 60-95%)⁹⁷. En general, la capacidad de los alcoholes para eliminar las biopelículas es escasa, aunque se ha descrito su eficacia al 70% frente biopelículas formadas durante 16 o 40 horas por *K. pneumoniae* o *P. aeruginosa* en diferentes periodos de exposición (1 a 24 horas)^{130,157,165}. También se ha descrito que la exposición a etanol (40-95%) puede favorecer la formación de biopelícula en *Staphylococcus epidermidis* y *S. aureus*¹³⁰.

- **Desinfectantes de manos con base alcohólica (DMBA).** Los DMBA son antisépticos de acción rápida, que causan mínima irritación y están diseñados para uso frecuente en la piel, particularmente para la reducción de microorganismos transitorios¹¹⁴. La base de su composición es un alcohol, que puede ser el etanol, propan-1-ol, propan-2-ol o combinaciones de estos alcoholes, en diferentes concentraciones (70-95%)¹³⁰. Además suele contener emolientes u otros excipientes para reducir la sequedad que producen en la piel y disminuir la velocidad de evaporación^{114,166}. Algunos de estos productos contienen agentes biocidas no volátiles adicionales como el cloruro de benzalconio, digluconato de clorhexidina o triclosán¹³⁰.

Los DMBA se utilizan en el entorno sanitario, veterinario y en el procesamiento y fabricación de alimentos¹³⁰. El uso doméstico de estos productos está cada vez más extendido y se ha generalizado debido a la pandemia causada por SARS-CoV-2^{130,167}. En el ámbito sanitario tiene dos aplicaciones principales, la desinfección higiénica de manos y la desinfección de manos del personal sanitario previa a procedimientos quirúrgicos¹³⁰.

El principio activo de los DMBA es el alcohol (etanol o propanol), por lo que el mecanismo de acción es el explicado en el apartado anterior. Los DMBA tienen actividad frente a bacterias, micobacterias, levaduras y virus envueltos¹¹⁴. Además, los que contienen etanol al 95%

también tienen actividad frente a virus no envueltos¹¹⁴. Los DMBA que contienen etanol al 85% son bactericidas en 15 segundos frente múltiples microorganismos como *Enterobacterales* (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *S. marcescens*), bacilos Gram negativos no fermentadores (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*), Gram positivos (*E. faecalis*, *E. faecium*, *S. pyogenes*, *S. aureus*) y anaerobios (*C. difficile*, *Bacteroides fragilis*)¹⁶⁸.

- **Compuestos fenólicos, bisfenoles y triclosán.** Los compuestos fenólicos son compuestos de alcohol con uno o más grupos hidroxilo (-OH) unidos a un anillo de hidrocarburo aromático del grupo de los bisfenoles¹¹⁴. Estos compuestos son insolubles en agua, por lo que se suelen presentar como jabones o detergentes¹¹⁴.

Los compuestos fenólicos se utilizan en el ámbito sanitario, veterinario e industrial y además, a bajas concentraciones se utilizan como conservantes¹¹⁴. Sus aplicaciones más comunes son la antisepsia de la piel y los productos de higiene personal (p. ej. pastas dentales, enjuagues bucales, jabones o desodorantes)¹¹⁴. Los más utilizados en el ámbito sanitario, industrial y doméstico son el triclosán (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter; Irgasán DP 300) y el hexaclorofeno¹¹⁴. El uso de triclosán, principalmente en el ámbito doméstico, ha sido objeto de debate debido a su seguridad y elevada estabilidad¹¹⁴. En términos de seguridad, se ha planteado que pueda alterar ciclos hormonales (particularmente las hormonas tiroideas) e incluso se ha relacionado con cáncer de piel en animales tras la exposición a largo plazo, aunque los efectos en humanos siguen siendo objeto de discusión¹¹⁴. Por otra parte, la bioacumulación debida a su elevada estabilidad incrementa las preocupaciones sobre los riesgos que tiene para la salud y el desarrollo de tolerancia y resistencia cruzada a una amplia gama de antibióticos¹¹⁴. Todo ello ha supuesto una tendencia generalizada a reducir su uso en aplicaciones no esenciales¹¹⁴. En la Unión Europea desde 2010 es necesario demostrar que su adición a un producto supone un beneficio para la salud y en Estados Unidos la FDA lo clasificó en 2019 como biocida no admisible en productos desinfectantes de manos de uso doméstico^{169,170}.

El mecanismo de acción de triclosán y otros bisfenoles similares, se basa en la interrupción de procesos metabólicos esenciales, como la biosíntesis de lípidos¹¹⁴. Triclosán a bajas concentraciones, interacciona de forma específica con la enzima acil-enoil-CoA reductasa (AER) y sus cofactores (NADH, NADPH o FADH₂)^{114,171}. Esta enzima está involucrada en la síntesis de ácidos grasos tipo II y su función consiste en la adición cíclica de dos unidades de carbono a una cadena de ácidos grasos en crecimiento¹¹⁴. Triclosán interactúa específicamente con el sitio de unión de la enzima al sustrato y con el anillo de nicotinamida

del cofactor, produciéndose una unión fuerte e irreversible con el biocida¹¹⁴. Triclosán a elevadas concentraciones tiene un modo de acción más general que incluye múltiples efectos sobre la pared celular, los componentes citoplasmáticos y la membrana celular^{114,172}. En este caso, se integra en la región externa de la membrana mediante su grupo hidroxilo, provocando la disrupción y la pérdida de función e integridad de la misma¹¹⁴. En el caso de los virus, el mecanismo ha sido menos estudiado aunque se ha observado que tiene efecto sobre las proteínas de la cápside y se sospecha que en los virus envueltos provoca alteración de la envuelta lipídica¹¹⁴.

Los compuestos fenólicos son desinfectantes de amplio espectro para la desinfección general de superficies¹¹⁴. La mayoría de los compuestos fenólicos son eficaces y tienen una actividad rápida contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos, virus y micobacterias¹¹⁴. En general, estos compuestos son más efectivos contra las bacterias Gram positivas que las Gram negativas aunque la actividad frente estas últimas puede potenciarse mediante la adición de EDTA u otros agentes quelantes que aumentan su permeabilidad a través de la pared celular^{114,142}. La mayoría de las formulaciones contienen dos o más compuestos fenólicos, que generalmente proporcionan un rango de actividad más amplio¹¹⁴. Es bactericida frente a *K. pneumoniae* (tras 1 hora de exposición a <0,01%) y es eficaz (10 g/litro) en la prevención de formación de biopelículas de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* y *S. aureus* pero no de *P. aeruginosa*, *S. marcescens* o *Morganella morganii*¹⁷³. Los compuestos fenólicos son esporostáticos pero presentan poca o nula actividad esporicida¹¹⁴.

En la **Figura 4** se resumen las dianas de algunos de los biocidas más importantes.

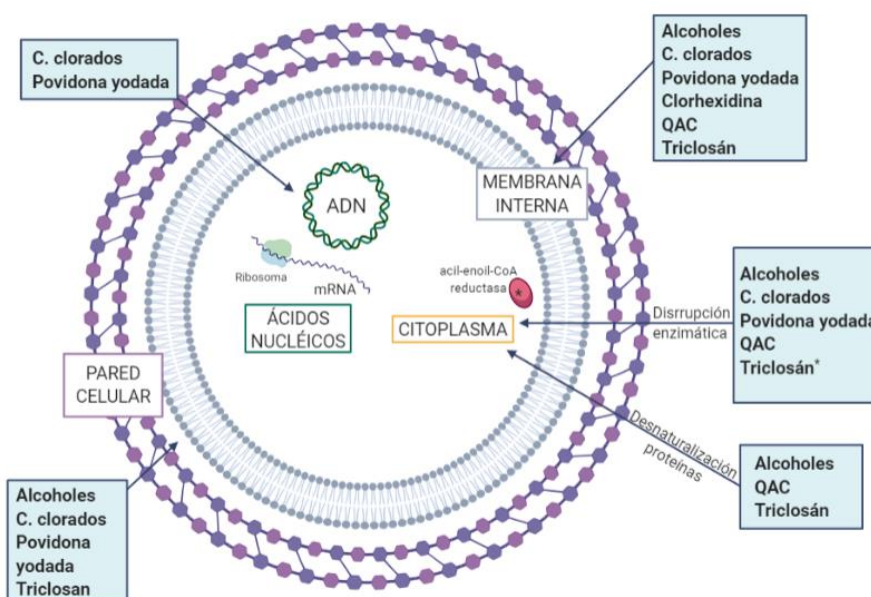


Figura 4. Dianas de los biocidas en esquema de célula bacteriana. C. clorados: compuestos clorados. QAC: compuestos de amonio cuaternario.

1.2.4. Métodos de estudio de la actividad *in vitro* de los biocidas

El estudio de la actividad *in vitro* de los biocidas incluye diferentes metodologías en función del objetivo. Mientras que para probar su eficacia para que puedan ser aprobados para su comercialización existen métodos relativamente estandarizados, en los estudios científicos se utiliza una metodología más heterogénea (p. ej. análisis de la eficacia de estos productos frente a bacterias multirresistentes, en condiciones extremas o en concentraciones diferentes a las de uso recomendado)^{159,174-177}.

En el caso de la evaluación de la eficacia de los desinfectantes para su autorización, la norma europea EN14885, describe los diversos estándares disponibles y proporciona orientación para la elección del más adecuado¹⁷⁴. Existen 2 enfoques para la realización de esta evaluación, el escalonado y el uso de métodos estándar¹⁷⁴.

El enfoque escalonado, es el más recomendado y consta de tres fases¹⁷⁴. En la primera fase se debe demostrar que el producto que se evalúa tiene una actividad antimicrobiana adecuada, en la segunda etapa se analiza su actividad utilizando métodos que simulan las condiciones en las que va a ser utilizado y en la tercera fase se evalúa el producto en condiciones reales de uso¹⁷⁴. Por otra parte, existen métodos estandarizados reconocidos internacional o nacionalmente¹⁷⁴. En el caso de la Unión Europea, se recomienda utilizar los métodos normalizados del Comité Europeo de Normalización (CEN) siempre que sean aplicables al producto a estudiar¹⁷⁴. Estos métodos incluyen pruebas en suspensión y algunas pruebas de uso simulado como por ejemplo pruebas sobre superficies¹⁷⁴. En caso de que los estándares CEN no estén disponibles, se podrían utilizar los métodos de prueba de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE), siempre que evalúen el producto según su uso previsto¹⁷⁴. En caso de que no haya un estándar internacional disponible para estudiar la actividad del producto para una aplicación específica pueden utilizarse métodos de prueba diseñados por organismos cualificados (p. ej. Organización Nacional Francesa de Normalización, Sociedad Alemana de Medicina Veterinaria) o diseñarse protocolos propios, que deben ser analizados y acordados con la autoridad competente antes de ser realizados¹⁷⁴.

Por otra parte, el amplio uso de los biocidas ha supuesto un aumento en la preocupación sobre los efectos que pueden tener en la salud humana, el medio ambiente, la selección de microorganismos multirresistentes y el desarrollo de corresistencia o resistencia cruzada, por lo que la actividad *in vitro* de estos productos se ha analizado en diversos trabajos científicos¹⁷⁵. La mayoría estos estudios evalúan la actividad *in vitro* de los biocidas, y se basan en el estudio de los valores de CMI y/o concentración mínima bactericida (CMB), obtenidos utilizando métodos

diseñados para el estudio de antimicrobianos. Generalmente, en estos trabajos se comparan aislados de tipo salvaje con aislados con mutaciones o genes adquiridos, y consideran un incremento de los valores de CMI o CBM en este último grupo como un indicador de resistencia^{159,175-177}. En algunos estudios, se utilizan las metodologías descritas anteriormente para la aprobación de la comercialización de los biocidas^{159,178}.

1.2.5. Sensibilidad reducida a biocidas

Aunque la sensibilidad reducida a biocidas (SRB) no está tan bien estudiada como la de los antimicrobianos, existen evidencias que sugieren que la SRB cada vez es más frecuente y que puede suponer un problema de salud pública^{130,179}. La adaptación de microorganismos a los agentes biocidas fue descrita en 1887 por Kossiakoff, al demostrar el desarrollo de tolerancia o resistencia al ácido bórico o cloruro de mercurio tras exponer ciertos patógenos a concentraciones crecientes de los mismos¹³⁰. En *K. pneumoniae*, en el trabajo de Wand y colaboradores en el que se compararon cepas aisladas previa y posteriormente a la introducción generalizada de muchos biocidas, se observó que las cepas más modernas presentaban valores de CMI más elevados a algunos de ellos (p. ej. triclosán, cloruro de benzalconio)¹⁸⁰.

Los microorganismos son capaces de sobrevivir a la exposición a antimicrobianos por diversos mecanismos que incluyen la resistencia, la tolerancia y la persistencia¹⁸¹. Estos términos pueden resultar confusos ya que, en ocasiones se utilizan de forma ambigua en la literatura¹⁸¹. La resistencia hace referencia a mecanismos que permiten al microorganismo crecer en presencia de altas concentraciones del mismo durante largos periodos de tiempo, que modifican el valor de su CMI y que son heredables¹⁸¹. Por el contrario, la tolerancia antimicrobiana implica mecanismos que permiten el crecimiento del microorganismo en presencia de altas concentraciones del antimicrobiano de forma transitoria sin variación del valor de la CMI, sean o no heredables^{130,181}. Finalmente, la persistencia es la capacidad no heredable de una subpoblación (<1%) para sobrevivir a la exposición a altas concentraciones de un antimicrobiano, mediante la entrada en un estado no replicativo y la detención de su crecimiento por interrupción de su metabolismo, dando lugar a una respuesta bifásica en las curvas de tiempo-muerte y a ciertos niveles transitorios de tolerancia^{181,182}.

La terminología resulta más compleja en el caso de los biocidas, ya que no existen definiciones estándar ni puntos de corte que permitan clasificar los aislados en las categorías sensible o resistente¹⁷⁵. Morrisey y colaboradores, propusieron en 2017, puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) basándose en los valores de CMI y CMB de aislados clínicos y comunitarios de diferentes orígenes geográficos¹⁷⁵. En este estudio se establecen los ECOFF para *S. aureus*, *Salmonella* spp.,

E. coli, *Candida albicans*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. faecium* y *E. faecalis* para clorhexidina, cloruro de benzalconio, hipoclorito sódico y triclosán¹⁷⁵. Recientemente, Weber y colaboradores, han propuesto definir como bacterias resistentes a los biocidas a aquellas que sobreviven a un proceso de desinfección a concentraciones de uso y como bacterias con sensibilidad reducida o tolerancia aumentada a las que presentan valores de CMI elevados¹⁸³. En este trabajo se utilizará el término SRB en referencia a los diversos mecanismos que permiten la supervivencia del microorganismo a la exposición de biocidas.

La SRB puede ser innata o adquirida¹⁷⁹. Algunas especies bacterianas tienen la capacidad innata de resistir a la actividad de un determinado agente biocida gracias a características estructurales o funcionales inherentes a su especie¹⁷⁹. Estas características incluyen la incapacidad del biocida para acceder a la célula bacteriana, la expulsión activa del biocida por bombas de expulsión codificadas en el cromosoma bacteriano, la capacidad de formar biopelícula, la producción de enzimas que inactivan el biocida o la falta de afinidad del biocida por la diana bacteriana, aunque estas dos últimas son poco frecuentes (**Tabla 7**)^{179,183}. Hay que destacar que las bacterias Gram negativas, como *K. pneumoniae*, son más resistentes a los biocidas que las bacterias Gram positivas, debido a la composición de su membrana externa (**Figura 5**)¹⁸⁴. En el caso de la SRB adquirida, existen diversas estrategias que incluyen la mutación de genes existentes, cambios en la expresión génica o la adquisición horizontal de nuevos determinantes (**Tabla 7**)¹⁷⁹.

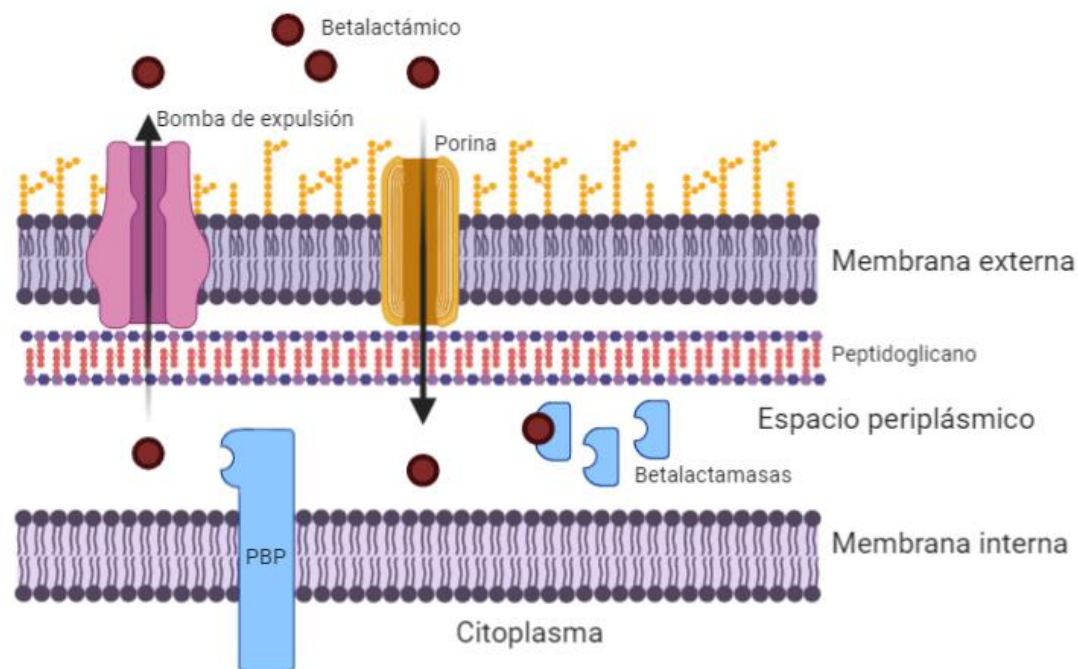


Figura 5. Esquema de la estructura de la envoltura celular de las bacterias Gram negativas. Adaptado de Blair y colaboradores¹⁸⁵.

Tabla 7. Principales mecanismos de SRB^{179,183}.

SRB innata	SRB adquirida
<ul style="list-style-type: none">• Impermeabilidad de membrana• Bombas de expulsión• Formación de biopelícula• Inactivación enzimática de los biocidas• Reducción o ausencia de afinidad por la diana.	<ul style="list-style-type: none">• Mutaciones (p. ej. <i>fabI</i>)• Adquisición horizontal de genes (p. ej. genes que codifican bombas de expulsión como <i>qacE</i> o <i>qacEΔ1</i>)• Cambios en expresión génica (p. ej. metabolismo de ácidos grasos, bombas de expulsión)

A continuación, se desarrollan los principales mecanismos de SRB.

1.2.5.1. Impermeabilidad de membrana

La reducción de la permeabilidad de la membrana puede disminuir o impedir la entrada de los biocidas al interior de la bacteria¹⁸⁶. Los principales mecanismos de SRB en bacterias Gram negativas que implican cambios en la permeabilidad de la membrana externa, son la pérdida de porinas y modificaciones en el lipopolisacárido (LPS)^{179,187}.

Respecto a la SRB adaptativa atribuida a la reducción o falta de expresión de genes que codifican porinas, Kim y colaboradores, observaron que la reducción en la expresión del gen de la porina OprG en *P. aeruginosa* evita la adsorción y penetración de de QACs de la familia del cloruro de benzalconio¹⁸⁸. Además, Fernández Cuenca y colaboradores observaron una reducción en la expresión de los genes que codifican las porinas OmpA y CarO en *A. baumannii* tras la exposición a triclosan¹⁸⁹. Otros trabajos han descrito la reducción en la expresión de genes que codifican las porinas OmpA, OmpF, OmpT en *E. coli* y OmpC, OmpF y OmpA en *S. enterica* tras la exposición de esta bacteria a concentraciones subletales de QACs^{190,191}. En *K. pneumoniae*, la porina KpnO se ha asociado la sensibilidad reducida a digluconato de clorhexidina y cloruro de benzalconio¹⁹².

Respecto a la modificación del LPS, otro trabajo de Kim y colaboradores demostró que la exposición de *P. aeruginosa* a concentraciones crecientes de QACs de la familia del cloruro de benzalconio selecciona aislados con mutaciones en el gen *pmrB*¹⁹³. Este gen forma parte del sistema *pmrAB*, el cual está implicado en la reducción de las cargas negativas de la membrana externa mediante la modificación del lípido A del LPS¹⁹³. Mutaciones en *pmrB* activan constitutivamente el sistema, incrementando la tolerancia a agentes catiónicos como cloruro de benzalconio o la polimixina B¹⁹³. En *K. pneumoniae*, Bleriot y colaboradores observaron un incremento en la expresión de los genes *pmrD* y *pmrK* (genes relacionados con la modificación

del LPS) y su asociación con la resistencia a colistina tras la exposición de un aislado a concentraciones crecientes de clorhexidina¹⁸².

1.2.5.2. Bombas de expulsión

Las bombas de expulsión suponen un mecanismo de SRB tanto intrínseco como adquirido¹¹⁴. La SRB adquirida puede deberse a mutaciones que impliquen la sobreexpresión de los genes que codifican las bombas de expulsión o a la transmisión horizontal de estos genes a través de plásmidos o transposones conjugativos (**Tabla 8**)^{114,183}. Además, como generalmente las bombas de expulsión pueden utilizar diferentes biocidas y antimicrobianos como sustrato, podrían estar implicadas en la resistencia cruzada a otros biocidas o antibióticos^{179,194}.

Las bombas de expulsión se pueden clasificar en cinco familias principales denominadas por sus siglas en inglés, RND (resistance-nodulation-division family), MSF (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance family), ABC (ATP-binding cassette family) y MATE (multidrug and toxic compound extrusion family) (**Figura 6**)¹⁸⁶. Todas estas bombas utilizan un gradiente de H^+ o Na^+ como fuente de energía para el transporte de sustancias, a excepción de las de la familia ABC que utilizan ATP¹⁷⁹. Las bombas de expulsión más relevantes en las bacterias Gram negativas son las de la familia RND mientras que en las Gram positivas los son las de la familia MFS¹⁸⁶.

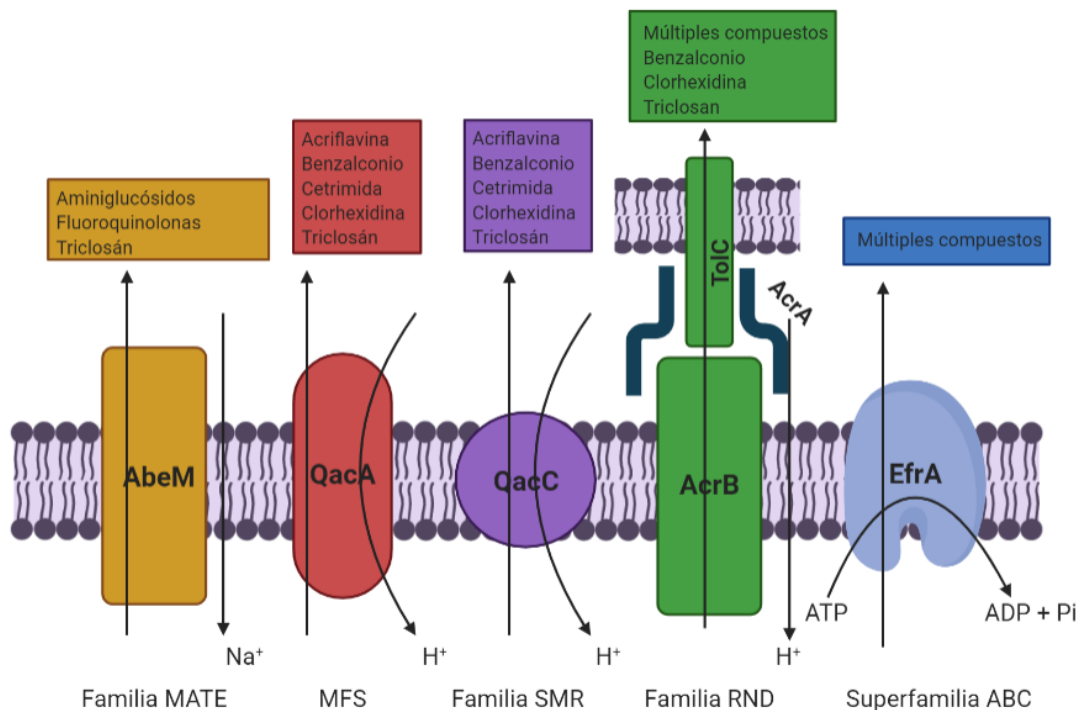


Figura 6. Representación esquemática de las cinco familias de bombas de expulsión. Adaptada de Piddock, Hurst y Fernando y colaboradores^{179,195,196}.

Tabla 8. Genes codificantes y clasificación de bombas de expulsión relacionadas con SRB en diferentes especies bacterianas.

Gen	Relacionado con SRB			
	Superfamilia (Familia)	Digluconato de clorhexidina	Cloruro de benzalconio	Triclosán
<i>acrAB</i>	RND (MFP)	-	-	Sí*
<i>cepA</i>	RND (CDF)	V*	-	-
<i>kpnEF</i>	(SMR)	Sí*	Sí*	Sí*
<i>oqxAB</i>	RND (MFP)	Sí*	Sí*	Sí*
<i>qacA</i>	MFS	V	V	-
<i>qacE</i>	(SMR)	V*	Sí*	-
<i>qacEΔ1</i>	(SMR)	Sí*	Sí*	-
<i>smvAR</i>	MFS (TCR/tet)	Sí*	-	-

-: No descrito, V: variable en función del estudio, *: asociación descrita en *K. pneumoniae*. Adaptado de Morrissey, Vijayakumar, Abuzaid, McMurry, Srinivasan, Hansen, Wand, Furi, Li y Cuirao y colaboradores 175,184,197–205

Las principales bombas de expulsión de la familia RND relacionadas con SRB están codificadas por los operones *acrAB*, *oqxAB* y el gen *cepA*. La expresión aumentada del operón *acrAB*, así como algunos de sus reguladores (p. ej. *marA*, *rara*), está relacionada en aislados de *S. enterica* serovar Typhimurium, *E. coli* y *K. pneumoniae* con la disminución de sensibilidad bacteriana a triclosán^{205–207}. La bomba de expulsión OqxAB, descrita en aislados clínicos de *Enterobacterales*, incluyendo *K. pneumoniae*, confiere sensibilidad reducida a diversos biocidas como clorhexidina, triclosán y cloruro de benzalconio, y resistencia de nivel bajo a intermedio a quinolonas, tigeciclina y nitrofurantoína^{201,204}. Respecto la bomba CepA, existe controversia sobre la correlación entre la presencia del gen que la codifica (*cepA*) y la sensibilidad reducida a clorhexidina en aislados de *K. pneumoniae* puesto que se han publicado resultados discordantes^{197,198}.

Otras bombas relevantes en la SRB de la familia RND son las de tipo Mex y TriABC-OpmH presentes en *P. aeruginosa*. La SRB de alto nivel a triclosán en *P. aeruginosa*, puede estar producida por la sobreexpresión de las bombas de expulsión MexAB-OprM o por otras menos activas como MexEF-OprN, MexJK y MexCD-OprJ²⁰⁸. Esta última además, está implicada en la sensibilidad reducida a clorhexidina¹¹⁴. También en *P. aeruginosa* se ha descrito la bomba de expulsión TriABC-OpmH, la cual al sobreexpresarse confiere sensibilidad reducida de alto nivel a triclosán y a dodecilsulfato sódico²⁰⁹. En *Acinetobacter* spp., dos bombas de la familia RND están relacionadas con la SRB, la bomba de expulsión AdeB media la sensibilidad reducida a cloruro de benzalconio y clorhexidina y la bomba AdeIJK a triclosán y clorhexidina^{189,195,210}. Además, esta última está implicada en la expulsión de antimicrobianos como ciertos

betalactámicos (p. ej. ticarcilina, cefalosporinas, aztreonam), fluoroquinolonas, tetraciclinas, tigeciclina, lincosamidas, rifampicina, cloranfenicol, cotrimoxazol, novobiocina y ácido fusídico²¹¹. En *Stenotrophomonas maltophilia*, la bomba SmeDEF, juega un papel importante en la tolerancia al triclosán y a múltiples antimicrobianos incluyendo quinolonas, tetraciclinas, macrólidos, cloranfenicol y novobiocina²¹². En *S. marcescens*, la bomba de expulsión SdeXY está implicada en tolerancia a cloruro de benzalconio y triclosán y contribuye a la reducción de sensibilidad de ciertos antimicrobianos como eritromicina, norfloxacin y tetraciclina²¹³.

Entre las bombas de expulsión de la familia MSF relacionadas con SRB se encuentra la bomba SmvA²⁰². El incremento en la expresión de esta bomba a causa de la pérdida del regulador *smvR*, permite la adaptación de ciertos *Enterobacteriales*, incluyendo *K. pneumoniae*, a concentraciones crecientes de clorhexidina²⁰². Otra bomba que pertenece a esta familia y está relacionada con SRB es NorA, la cual fue descrita en *S. aureus* y está codificada en el cromosoma²⁰³. La presencia de mutaciones en la región promotora del gen *norA* puede aumentar su expresión, incrementando la resistencia a biocidas como cloruro de benzalconio y a antimicrobianos como norfloxacin y ciprofloxacino²⁰³. En *A. baumannii*, Fernández Cuenca y colaboradores observaron un incremento en la expresión del gen *amvA*, que codifica una bomba relacionada con SRB (p. ej. cloruro de benzalconio, clorhexidina), tras la exposición a clorhexidina^{189,214}. Finalmente, en la familia MSF destaca la bomba QacA/B, la cual puede ser cromosómica o plasmídica, y media la sensibilidad reducida a cloruro de benzalconio y clorhexidina entre otros biocidas en diferentes especies bacterianas (p. ej. *S. aureus*, *E. faecalis*)^{130,179}. En *K. pneumoniae*, no se ha descrito asociación entre la presencia del gen *qacA* y sensibilidad reducida a cloruro de benzalconio, digluconato de clorhexidina, pero sí a mayores valores de CMI de otros biocidas como el etanol al 75% o un biocida yodóforo al 1%^{197,215}.

Otros genes del grupo QAC (*qacC/D*, *qacE*, *qacEΔ1*, *qacG*, *qacH*, y *qacJ*), están asociados con elementos móviles y codifican bombas de expulsión que pertenecen a la familia SMR¹⁷⁹. Estos genes pueden mediar resistencia a clorhexidina y los QACs, aunque su papel es controvertido, ya que no siempre se observa correlación entre la SRB y su presencia^{179,198,216}. Los genes que codifican estas bombas, se han descrito tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas, con la excepción de *qacC/E* que solo se ha detectado en Gram positivos y el gen *qacE* que fue descrito en *E. coli* y posteriormente en otras especies de Gram negativas como *K. pneumoniae*, *A. baumannii* y *P. aeruginosa*²¹⁷. El gen *qacEΔ1* es una variante de delección funcional de *qacE*, relativamente frecuente, que puede encontrarse tanto en Gram positivos como en Gram negativos²¹⁷. El gen *qacEΔ1* se ha descrito en *K. pneumoniae*, asociado a

sensibilidad reducida a biocidas (p. ej. etanol al 75 %, cloruro de benzalconio, digluconato de clorhexidina)^{198,215}. También forma parte de la familia SMR, la bomba de expulsión KpnEF presente en *K. pneumoniae* y que utiliza como sustrato algunos biocidas como cloruro de benzalconio, clorhexidina y triclosán y también algunos antibióticos como cefepime, ceftriaxona, colistina, eritromicina, rifampicina, tetraciclina y estreptomina²⁰⁰.

Un ejemplo de bomba de la familia MATE relacionada con SRB es la bomba AbeM descrita en *A. baumannii*, la cual está implicada en el incremento de la CMI de múltiples biocidas como por ejemplo el triclosán y de antibióticos como norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacino y gentamicina²¹⁸. Finalmente, un ejemplo de bomba de expulsión de la familia ABC relacionada con SRB es EfrAB, presente en *Enterococcus* spp. y que está relacionada con sensibilidad reducida a biocidas y a antimicrobianos (p. ej. acriflavina, norfloxacin, ciprofloxacino, doxiciclina).

Debido a la gran diversidad de bombas de expulsión relacionadas con SRB este trabajo se limitará a estudiar la presencia de las bombas de expulsión reflejadas en la **Tabla 8**. En *K. pneumoniae*, se ha descrito la asociación entre SRB y la presencia de la mayoría de los genes que las codifican (**Tabla 8**).

1.2.5.3. Formación de biopelícula

Como se comenta en el siguiente apartado, las bacterias que forman parte de una biopelícula son generalmente más resistentes a antimicrobianos y biocidas que las bacterias planctónicas. Esto puede deberse a múltiples factores, como la sinergia entre las especies que la forman, la presencia de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés) que reduce la penetración de estos compuestos en la estructura y la alteración del crecimiento y del metabolismo de las bacterias que la forman^{109,179}.

1.2.5.4. Inactivación enzimática de los biocidas

Diversas especies bacterianas producen enzimas que degradan y utilizan como fuente de carbono compuestos tóxicos y biocidas, por lo que son utilizadas en la industria para la biodegradación¹¹⁴. Ejemplo de ello es la degradación del fenol y del cresol por *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas pickettii*, del triclosán por *P. putida* y *Alcaligenes xylosoxidans* o de los alcoholes por *E. coli*¹¹⁴. En aislados de *K. pneumoniae* recuperados en ambientes contaminados, se ha descrito su capacidad para degradar diversos compuestos contaminantes como colorantes azoicos, aminas aromáticas o petróleo^{219,220}.

Algunas enzimas, como la catalasa y peroxidasa, son producidas por los microorganismos en respuesta a la acción de los biocidas y funcionan como neutralizantes de los mismos, mientras que otras como las endonucleasas, exonucleasas y proteasas reparan el daño celular¹¹⁴. Finalmente, los antioxidantes como los carotenoides y flavonoides y los citocromos pueden reducir o neutralizar la presencia de niveles bajos de agentes oxidantes¹¹⁴.

1.2.5.5. Reducción o ausencia de afinidad por la diana

En algunos casos, los biocidas pueden tener una diana específica, por lo que la falta de afinidad del biocida por la misma puede causar SRB, tanto innata como adquirida¹⁷⁹. Como se ha comentado previamente, la enzima AER es una diana del triclosán a bajas concentraciones. Esta enzima, está implicada en la síntesis de ácidos grasos tipo II y está codificada por el gen *fabI*, descrito en *E. coli* e identificado en muchas otras especies bacterianas incluyendo *K. pneumoniae*^{205,221}.

Se han descrito cinco isoenzimas (*FabI*, *FabL*, *FabL2*, *FabV* y *FabK*) que comparten baja similitud de secuencia (15% a 30%)^{221,222}. En *P. aeruginosa* la sensibilidad reducida a triclosán se asocia a la producción adicional (además de *FabI*) de la isoenzima *FabV*, la cual no se ve inhibida en presencia de este biocida²²². Además, ciertas mutaciones en *fabI*, como las descritas en *E. coli* (G93V, Y146F, M158T, F203L, R204E y K205E) o en *A. baumannii* (G95S), reducen la interacción con triclosán y producen sensibilidad reducida a este biocida^{223,224}.

1.2.5.6. Cambios en la expresión génica

La SRB puede ser resultado de cambios en la expresión de genes diferentes a los que codifican bombas de expulsión¹⁷⁹. Diversos estudios de expresión génica y proteómica han analizado la expresión diferencial entre cepas mutantes tolerantes a triclosán y sus parentales. Fernando y colaboradores, demostraron un incremento de expresión de genes y proteínas implicados en resistencia antibiótica (p. ej. genes que codifican bombas de expulsión) y en el metabolismo de los ácidos grasos (p. ej. *FadD*, subunidad beta de *FadA*) y los aminoácidos (p. ej. permeasa de sulfato putativa) en un aislado de *A. baumannii* tolerante a triclosán respecto al parental²²⁵. En el estudio de Webber, realizado en aislados de *S. enterica* serovar Typhimurium, se observó la expresión alterada de un conjunto de proteínas implicadas en la producción de piruvato y de ácidos grasos en todos los mutantes²²⁶. Además, Sheridan y colaboradores, observaron un aumento de expresión en la proteína diana (*FabI*), proteínas de la membrana externa (*OmpA*, *OmpX*) y una proteína estructural del flagelos (*FliC*) en mutantes de *E. coli*²²⁷.

1.2.6. Corresistencia y resistencia cruzada entre biocidas y antimicrobianos

Los términos corresistencia y resistencia cruzada se suelen utilizar de forma indistinta, a pesar de que existen diferencias en los mecanismos subyacentes¹²⁷. La corresistencia implica la presencia de varios determinantes genéticos de resistencia en un mismo EGM (p. ej. integrones, transposones o plásmidos), que pueden seleccionarse, transferirse y expresarse conjuntamente en el nuevo huésped^{228,229}. Ejemplo de ello es la corresistencia a compuestos de amonio cuaternario y sulfonamidas, debido a la presencia de los genes *qacEA1* y *sul1* en integrones de tipo 1 localizados en plásmidos de resistencia²³⁰. Por el contrario, la resistencia cruzada supone que un único mecanismo de resistencia genere resistencia a múltiples compuestos no relacionados. La resistencia cruzada generalmente está causada por modificaciones en la permeabilidad de la membrana, la expresión de bombas de expulsión con múltiples substratos y la formación de biopelícula^{229,231–233}.

En la **Tabla 9** se recogen diversos estudios en los que se ha observado corresistencia o resistencia cruzada entre biocidas (p. ej. hipoclorito de sodio, clorhexidina, cloruro de benzalconio o triclosán) y antibióticos en diferentes microorganismos. Aunque los mecanismos responsables no fueron analizados en todos los estudios, los más habituales son la expresión de bombas de expulsión o la modificación de la permeabilidad de membrana. En el caso de etanol y povidona yodada no se ha descrito corresistencia o resistencia cruzada con antimicrobianos^{130,147}. En *K. pneumoniae* se ha descrito resistencia a colistina tras la adaptación a digluconato de clorhexidina, mediada por mutaciones en los genes *pmrD* y *pmrK* que causan un aumento de la expresión del operón, lo que resulta en una reducción de la carga negativa del lípido A e impide la unión de colistina a su diana^{182,234,235}.

También se ha descrito resistencia cruzada entre diferentes tipos de biocidas¹³⁰. Gadea y colaboradores, describieron que la tolerancia adaptativa a triclosán en diversas especies bacterianas, incluyendo *K. oxytoca*, *Enterobacter* spp. y *Salmonella* spp., puede generar tolerancia a otros biocidas como clorhexidina y cloruro de benzalconio¹³⁰.

Tabla 9. Resistencia cruzada conocida en los biocidas analizados y microorganismo en el que fueron descritas.

Biocida	Corresistencia o resistencia cruzada a:	Microorganismo en el que se ha descrito
Hipoclorito de sodio	Ampicilina, gentamicina, polimixina, ciprofloxacino, rifampicina, claritromicina y tetraciclina	Aislados de <i>E. coli</i> viables pero no cultivables tras exposición a 0,5 mg/l de hipoclorito de sodio ²³⁶ .
	Ampicilina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, gentamicina, tobramicina, amikacina, ciprofloxacino, ácido nalidíxico	<i>S. enterica</i> (cepa dependiente) tras adaptación a hipoclorito de sodio ²³⁷ .
Clorhexidina	Cefotaxima, vancomicina, gentamicina, cefuroxima y oxacilina	<i>S. aureus</i> tras exposición a concentraciones residuales de clorhexidina ²³⁸ .
	Colistina	<i>K. pneumoniae</i> tras adaptación a clorhexidina ^{182,234, 235} .
	Ampicilina, amoxicilina clavulánico, cefpodoxima y cefalotina.	<i>E. coli</i> tras exposición a concentraciones subletales de clorhexidina ²³⁹ .
Cloruro de benzalconio	Cotrimoxazol	<i>E. coli</i> (detección simultanea de ambos fenotipos de resistencia) ²⁴⁰ .
	Ampicilina, amoxicilina, eritromicina y trimetoprim	<i>Pseudomonas spp.</i> (detección simultanea de ambos fenotipos de resistencia) ^{130,241} .
	Cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina, acriflavina	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium tras adaptación a cloruro de benzalconio ²⁴² .
	Ampicilina, sulfametoxazol y cefotaxima	Múltiples especies (<i>Bacillus spp.</i> , <i>Enterobacterales...</i>) tras adaptación a cloruro de benzalconio ²⁴³ .
Triclosán	Ampicilina, cloranfenicol y tetraciclina	<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium tras adaptación a triclosán ¹³⁰ .
	Cloranfenicol, eritromicina, imipenem, tetraciclina y cotrimoxazol	<i>E. coli</i> tras adaptación a triclosán ²⁴⁴ .
	Betalactámicos, cloranfenicol, eritromicina, gentamicina, imipenem, tetraciclina, cotrimoxazol, ciprofloxacino...	<i>E. coli</i> tras adaptación a triclosán ²⁴⁵ .

1.3. Biopelículas

Las biopelículas se han definido como agregados de microorganismos, generalmente embebidos en una matriz autoproducida de EPS, en la que los microorganismos se adhieren entre sí y/o a una superficie y que presentan propiedades que no son predecibles a partir del estudio de las bacterias en estado platónico²⁴⁶. La biopelícula proporciona un entorno estable, favorece la acumulación de nutrientes y enzimas en su interior y protege a las bacterias de las condiciones ambientales adversas, del sistema inmune del hospedador y del efecto de moléculas con actividad antibacteriana, como antimicrobianos, biocidas u otros compuestos tóxicos^{246,247}. Además, la biopelícula favorece las interacciones entre las bacterias que la forman y facilita el intercambio de determinantes genéticos de resistencia^{246,247}.

Las biopelículas son una de las formas de vida más exitosas y frecuentes de la tierra, pudiendo ser el estado natural y predominante de las bacterias²⁴⁷. Todos los organismos superiores, incluyendo el ser humano, están colonizados por biopelículas bacterianas^{246,247}. Las bacterias que las forman causan más del 65% de las infecciones, siendo particularmente frecuentes en infecciones relacionadas con dispositivos médicos, infecciones producidas en las superficies del cuerpo (p. ej. piel y tejidos blandos, pulmón, vejiga) y en infecciones crónicas²⁴⁸.

K. pneumoniae es capaz de formar biopelículas, pero esta capacidad depende de la cepa y puede presentar diferentes cinéticas de formación²⁴⁹. La elevada capacidad de algunas cepas de *K. pneumoniae* para formar biopelículas es un factor que contribuye a que este patógeno sea uno de los principales causantes de infecciones nosocomiales, ya que le permite colonizar tanto las mucosas y la piel de los pacientes, reservorios inertes como los dispositivos médicos (p. ej. catéteres urinarios o tubos endotraqueales), o diversos ecosistemas ambientales, como los sifones de las duchas o las aguas residuales hospitalarias²⁵⁰⁻²⁵². La formación de biopelículas aumenta la supervivencia de *K. pneumoniae* en el medio ambiente, facilitando la formación de reservorios ambientales nosocomiales, que dificultan el control de los brotes, incrementa la tolerancia antimicrobiana y favorece la transmisión de determinantes de resistencia^{82,253,254}.

1.3.1. Formación de biopelículas

La formación de biopelículas es un proceso secuencial que implica cinco etapas: adhesión reversible, adhesión irreversible, crecimiento de microcolonias, maduración y dispersión (**Figura 7**)²⁵⁵.

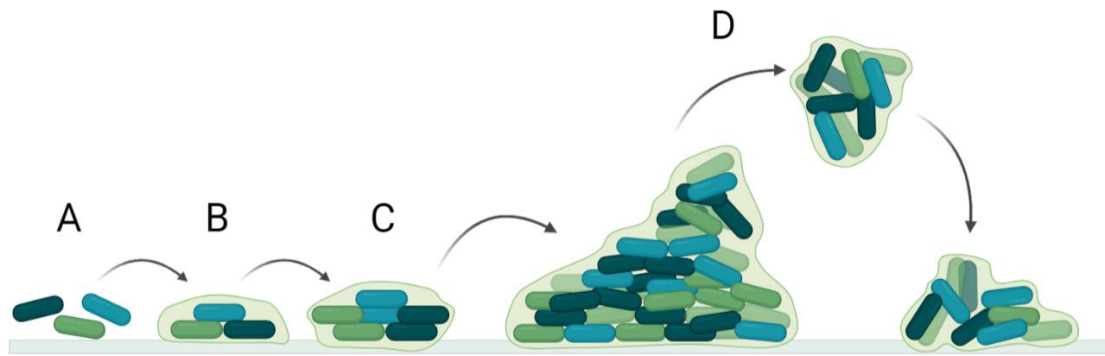


Figura 7. Esquema de formación de las biopelículas, adaptado de Flemming y Wingender²⁵⁶. (A) Adhesión reversible, (B) adhesión irreversible, (C) crecimiento de microcolonias, (D) maduración y dispersión.

Las primeras etapas permiten la adhesión de las bacterias a la superficie²⁵⁵. Inicialmente las bacterias utilizan diversos orgánulos y proteínas extracelulares (p. ej. flagelos, fimbrias) para detectar y adherirse de forma reversible a las superficies²⁵⁷. A continuación, la secreción de EPS permite que esta unión sea irreversible²⁵⁷. Posteriormente, las bacterias se multiplican y forman microcolonias (10-100s μm de diámetro) que continúan produciendo EPS y se encapsulan, lo que forma una barrera física frente al entorno extracelular²⁵⁷. En la cuarta etapa, la comunidad bacteriana y la cantidad de EPS aumenta y se forma una estructura tridimensional (**Figura 8**)²⁵⁷. El incremento del número de bacterias puede deberse al reclutamiento de bacterias plantónicas o a crecimiento clonal, este último mecanismo es el que utiliza *K. pneumoniae* en la maduración de la biopelícula^{247,257,258}. Finalmente, en la última etapa, algunas células se desprenden y se dispersan²⁵⁷. Esta etapa es esencial en el ciclo de la biopelícula ya que le permite responder a factores externos y formar nuevas biopelículas²⁵⁷.

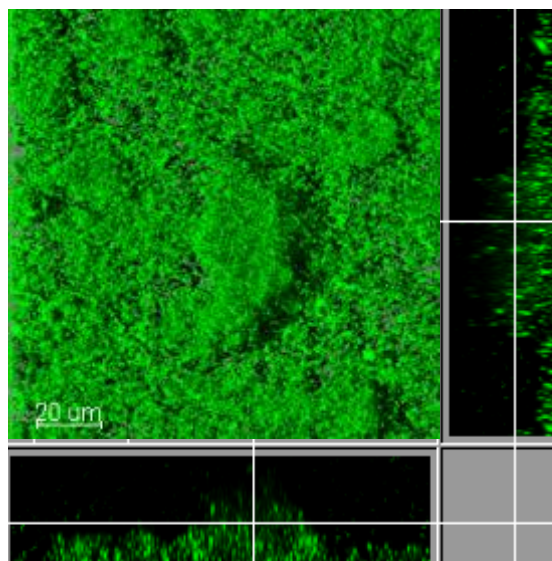


Figura 8. Imagen de biopelícula formada por aislado ST15/OXA-48 de Kp-PC obtenida mediante microscopia láser confocal de barrido (CLSM) y el software Imaris.

La formación de biopelícula está regulada mediante sistemas de comunicación entre bacterias o *quorum sensing*, a través de pequeñas moléculas difusibles producidas por las bacterias llamadas autoinductores²⁵⁹. A medida que la población bacteriana aumenta, estas moléculas se acumulan en su entorno, pueden unirse a sus receptores y activar la expresión de genes relacionados con la formación de biopelícula²⁵⁹. Estos sistemas son muy complejos y varían entre especies bacterianas. En *K. pneumoniae*, la formación de biopelícula está regulada principalmente por el autoinductor AI-2, codificado por *luxS*, N-octanoil homoserina lactona y N-3-dodecanoil-L-homoserina lactona²⁶⁰.

1.3.2. Factores de virulencia implicados en la formación de biopelículas en *K. pneumoniae*

Diversos factores de virulencia contribuyen a la formación de biopelículas en *K. pneumoniae*, como las fimbrias y los polisacáridos capsulares²⁵⁴.

Las fimbrias son estructuras muy frecuentes entre las bacterias Gram negativas y permiten la adhesión a superficies tanto bióticas como abióticas^{254,261}. *K. pneumoniae* produce dos fimbrias principales conocidas como fimbrias de tipo 1 y tipo 3, asociadas con la adhesión celular y formación de biopelículas, tanto en las etapas iniciales como en la etapa de maduración^{250,262}.

Las fimbrias de tipo 1, codificadas por el operón *fimAICDFGH*, están compuestas por subunidades repetidas de FimA que se organizan en una estructura helicoidal conectada a la adhesina de la punta (FimH) mediante FimF y FimG^{263,264} (**Figura 9**). La adhesina FimH, permite la unión a glicoconjugados que contienen manosa, incluyendo las células del tracto urinario y respiratorio²⁶²⁻²⁶⁶. El ensamblado de la fimbria utiliza la ruta “chaperona/usher” la cual requiere una chaperona periplásmica (FimC) y una plataforma de ensamblaje de membrana externa denominada “usher” (FimD)^{263,267}. La chaperona media el plegamiento de la subunidades estructurales, evita su polimerización en el periplasma y dirige su paso al “usher”^{261,267}. Finalmente, el gen *fimI* es necesario para la formación de la fimbria pero su función es desconocida^{263,268}. Este tipo de fimbria es muy frecuente en *Enterobacteriales* y se ha demostrado que está implicada en la patogénesis de *E. coli* y *K. pneumoniae* en las infecciones del tracto urinario humano²⁶². En *K. pneumoniae* el entorno del huésped influye en la regulación de la expresión de la fimbria de tipo 1 mediante un “interruptor” (elemento genético invertible que contiene el promotor del gen *fimA*), que se encontraría infraexpresado en la colonización gastrointestinal y sobreexpresado en infección del tracto urinario, donde le permite formar biopelículas intracelulares^{258,266}.

La fimbria de tipo 3, codificada por el operón *mrkABCDF*, es una fimbria compuesta por la subunidad estructural principal MrkA y la adhesina de la punta MrkD (**Figura 10**)^{262,269}. La adhesina MrkD, media la unión de *K. pneumoniae* a receptores tisulares como el colágeno, pero no parece ser necesaria para la formación rápida y eficiente de biopelícula^{262,270}. Por el contrario, la subunidad estructural MrkA, es suficiente para facilitar las interacciones para la formación eficiente de biopelículas sobre superficies abióticas, por lo que es posible que existan adhesinas diferentes a MrkD aún no descritas^{262,271}. Al igual que la fimbria de tipo 1, se ensambla con una ruta “chaperona/usher”, mediante la chaperona MrkB y la proteína “usher” MrkC²⁶⁹. Finalmente, MrkF parece dar estabilidad a la estructura y participar el ensamblado²⁶⁹. Estas fimbrias median la unión de *Klebsiella* spp. a diversos tipos de células, como las endoteliales y epiteliales del tracto urinario y respiratorio, y facilitan la adherencia y la formación de biopelículas en superficies inertes^{262,265,270,272}.

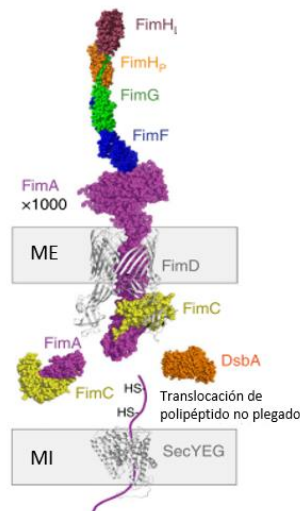


Figura 9. Estructura de fimbria de tipo 1. FimH_P y FimH_L: subdomínios de FimH, pilina y lectina respectivamente. ME: membrana externa; MI: membrana interna. DsbA: oxidoreductasa que induce la formación del enlace disulfuro en FimA lo que permite que sea reconocida por la chaperona FimC. SECYEG: poro transmembrana que permite la translocación las subunidades que forman la fimbria del citoplasma al periplasma. Adaptada de Alonso-Caballero y colaboradores²⁶⁴.

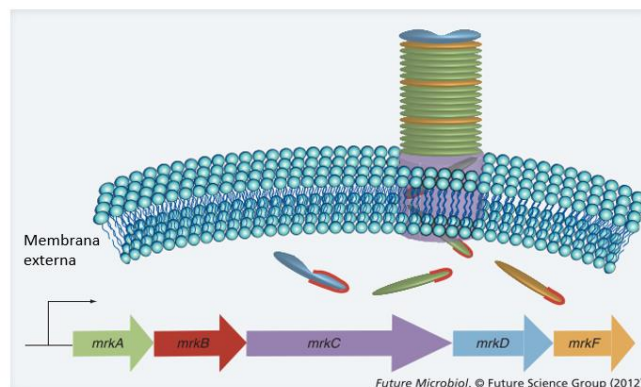


Figura 10. Estructura de fimbria de tipo 3. Adaptada de Murphy y colaboradores²⁷³.

La cápsula, presente en la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae*, es una matriz de polisacárido extracelular que recubre la superficie de la bacteria²⁷⁴. Esta estructura protege a la bacteria frente al sistema inmune del huésped, reduciendo la fagocitosis, la respuesta inflamatoria temprana e inhibiendo la maduración de las células dendríticas a la vez que proporciona protección frente a péptidos antimicrobianos^{17,274,275}.

El papel de la cápsula en la formación de la biopelícula en *K. pneumoniae* es controvertido. Por un lado, se ha descrito que la cápsula actúa como una barrera física para las fimbrias, reduciendo la formación de biopelícula²⁷⁶. Por el contrario, Balestrino y colaboradores sugieren que la cápsula contribuye a la formación de la biopelícula en superficies abióticas, tanto en etapas iniciales, evitando la adhesión entre las bacterias plantónicas y permitiendo una distribución regular en la superficie a la que se adhieren, como durante la maduración de la biopelícula²⁷⁷. Estos autores estudiaron mutantes defectivos de *K. pneumoniae* y observaron que en ausencia de cápsula las bacterias se unieron entre sí y a la superficie de forma irregular sin que se formara la estructura tridimensional clásica de la biopelícula²⁷⁷. Estos datos parecen indicar que la formación de biopelícula depende de la coordinación entre la expresión de fimbrias y la producción de cápsula, lo que sugiere que la comunicación intercelular o *quorum sensing* entre las bacterias es esencial en este proceso²⁵⁴.

1.3.3. Matriz extracelular

La matriz de la biopelícula es el material extracelular producido por la población bacteriana de la biopelícula²⁵⁶. La composición de la matriz varía por factores ambientales y en función de las bacterias que forman la biopelícula²⁷⁸. Está principalmente formada por agua (>97%), la cual contiene el resto de los elementos funcionales y estructurales como polisacáridos, proteínas, ADN extracelular y lípidos^{246,256}. Los polisacáridos son uno de los componentes mayoritarios, con función estructural y de adhesión, aunque su composición y propiedades son muy variables en función de las especies bacterianas que forman la biopelícula^{256,279}. Por otra parte, las proteínas incluyen tanto enzimas (p. ej. digestivas, enzimas que degradan EPS) como proteínas estructurales que estabilizan la matriz²⁵⁶. El ADN extracelular facilita la adhesión interactuando con receptores de la superficie y es capaz de actuar como sustancia quelante de cationes metálicos y antibióticos cargados positivamente²⁴⁷. Finalmente, la matriz de la biopelícula puede contener lípidos implicados en la adhesión a superficies o con propiedades antifúngicas (p. ej. biosurfactantes)²⁵⁶.

El estudio de la composición de la matriz es complejo ya que están formadas por componentes fuertemente adheridos a las bacterias y que requieren diferentes métodos de extracción para

su análisis²⁵⁶. En el caso de *K. pneumoniae*, el estudio de Singh y colaboradores, en el que se analiza la composición de la matriz de 257 aislados clínicos de *K. pneumoniae* por diversas técnicas reveló una composición química muy heterogénea entre los aislados²⁷⁸.

La matriz participa en la adhesión a superficies, aporta estabilidad mecánica y cohesión a la biopelícula y le proporciona numerosas de sus principales propiedades²⁵⁶. La matriz favorece la captación eficaz de nutrientes y la retención de las enzimas producidas por las bacterias que forman la biopelícula, a diferencia de las producidas por bacterias plantónicas que difunden en el ambiente^{246,256}. Estas enzimas optimizan la digestión de macromoléculas favoreciendo la adquisición de nutrientes y actúan como factores de virulencia^{246,256}. La matriz también aporta protección frente a los agentes externos, protegiendo a las bacterias frente a la desecación y actuando como barrera física frente a antimicrobianos, biocidas y sustancias tóxicas y protegiendo a las bacterias del sistema inmune del hospedador^{247,256}. Además, la matriz incrementa la proximidad entre las bacterias que forman la biopelícula, sean o no de la misma especie, lo que facilita la interacción entre ellas¹⁹⁴. Estas interacciones pueden ser de cooperación (p. ej. secreción de quelantes de nutrientes, enzimas digestivas, adhesinas superficiales, agentes humectantes, polímeros estructurales y moléculas de señalización) o de competencia (p. ej. secreción de antibióticos o inyección de toxinas en células adyacentes) y aportan nuevas capacidades a la biopelícula¹⁹⁴.

1.3.4. Tolerancia a biocidas y resistencia a antimicrobianos en la biopelícula

La biopelícula presenta mecanismos, además de la barrera física proporcionada por la matriz, que le proporcionan una mayor tolerancia que las bacterias plantónicas a antimicrobianos y biocidas^{246,280,281}. Por un lado, las biopelículas contienen células en fase estacionaria a causa de la disminución de nutrientes y oxígeno disponibles, cuyo número aumenta a medida que la biopelícula madura, y que presentan tolerancia fisiológica a los antimicrobianos que dependen del metabolismo bacteriano para ejercer su actividad^{246,280}. Por otro lado, la regulación de la expresión génica, como la sobreexpresión de bombas o betalactamasas, puede verse afectada por la exposición a antimicrobianos dentro de la biopelícula dando lugar a tolerancia adaptativa²⁸⁰.

En el caso de *K. pneumoniae* las biopelículas a menudo son más resistentes a los antimicrobianos que las células plantónicas²⁵⁴. Diversos estudios han analizado la actividad *in vitro* de antimicrobianos frente a biopelículas de *K. pneumoniae*, observándose que son menos sensibles a ampicilina, piperacilina, ciprofloxacino y amikacina que las bacterias plantónicas^{282,283}. Los

principales mecanismos de resistencia frente a antimicrobianos en biopelículas de *K. pneumoniae* son la barrera física de la matriz en las biopelículas maduras, el crecimiento lento por limitación de nutrientes y oxígeno en el interior de la biopelícula y la inactivación de los antimicrobianos como la ampicilina por betalactamasas secretadas²⁵⁴. En el caso de los biocidas, parece que la reducción de sensibilidad se debe generalmente a la tolerancia mediada por adaptación fisiológica a causa de la reducción en la tasa de crecimiento, el estrés nutricional y la exposición a concentraciones subletales de desinfectantes²⁸¹. Este fenotipo generalmente es transitorio y se pierde en el estado plantónico²⁸¹.

Además, la biopelícula es una estructura que puede actuar como reservorio de determinantes de resistencia a antimicrobianos y a biocidas y favorecer su transferencia²⁸⁴. Los principales factores que favorecen la adquisición de resistencia en la biopelícula son el incremento de la tasa de mutación, la frecuente exposición a concentraciones subletales de estos compuestos, la generación de un entorno idóneo para la transferencia de EGMs y la presencia de eDNA^{246,280,284-286}.

En las biopelículas la tasa de mutación es mayor que en células plantónicas, ya que la respuesta bacteriana al estrés producido por los diferentes gradientes presentes en la biopelícula (p. ej. nutrientes, oxígeno, pH) incrementa la probabilidad de que se produzcan mutaciones que generen resistencia a antimicrobianos y biocidas^{280,281,287}. Además, las biopelículas pueden verse expuestas de forma constante a concentraciones subinhibitorias de antimicrobianos, metales pesados, tóxicos o biocidas, ya sea por una mayor captación de los mismos, contaminación ambiental o los tratamientos prolongados necesarios para su erradicación^{246,284,285}. Esta exposición continua puede estimular la aparición y selección de la resistencia a antimicrobianos²⁴⁶.

Las biopelículas constituyen un entorno ideal para la adquisición y transferencia de EGMs que movilicen genes de resistencia^{246,284}. La acumulación de EGMs puede deberse a la presencia de un entorno físico estable y el aumento de transferencia de EGMs puede deberse a la alta densidad celular que favorece la proximidad entre las bacterias donadoras y receptoras^{246,284}. Uno de los mecanismos más frecuentes de transferencia de EGMs en las biopelículas es la conjugación, aunque parece ser que la biopelícula solo favorece la transferencia de plásmidos en las etapas iniciales mientras que en las biopelículas maduras se ve limitada por distancia entre las bacterias donantes y receptoras y por factores estresantes como la ausencia de nutrientes^{246,288-291}. En *K. pneumoniae*, se ha demostrado una mayor transferencia de plásmidos portadores de determinantes de resistencia (p. ej. *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-48}) en biopelículas

respecto a células platónicas^{289,292-294}. En un trabajo publicado por nuestro grupo se estudió la frecuencia de conjugación de plásmidos Incl portadores de genes que codifican carbapenemasas del grupo OXA-48 desde aislados de *K. pneumoniae* a un aislado de *E. coli* en biopelículas mixtas, y se observó una mayor frecuencia de conjugación en biopelículas formadas por aislados pertenecientes a clones epidémicos que en estado planctónico²⁹⁴. Finalmente, otro mecanismo que podría estar implicado en la transferencia de determinantes de resistencia en biopelículas es la transformación del eADN presente en la matriz, tal como describen algunos estudios *in vitro* en *Streptococcus* spp., *Acinetobacter* spp. y *Neisseria gonorrhoeae*^{286,295-297}.

1.3.5. Estudio de la formación de biopelículas

El estudio de la formación de biopelículas *in vitro* es complejo y no existe un método estándar, por lo que se debe valorar qué dispositivos y qué metodología son los más adecuados en cada caso²⁹⁸.

La biopelícula puede estudiarse desde diferentes aproximaciones que implican diferentes dispositivos y técnicas²⁹⁸. En la **Tabla 10** se resumen las principales ventajas e inconvenientes de los dispositivos más utilizados mientras que en las **Tablas 11 y 12** se resumen las principales ventajas e inconvenientes de las técnicas indirectas y directas más utilizadas, respectivamente.

Tabla 10. Dispositivos comúnmente utilizados para el estudio de biopelículas²⁹⁸.

Dispositivo	Descripción	Principales ventajas	Principales inconvenientes
Placas de micropocillos	Inoculación de una suspensión bacteriana en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano.	<ul style="list-style-type: none"> - Es el método más utilizado - Económico - No requiere equipos avanzados - Alto rendimiento - Obtención de imágenes no invasivas - Determinación de biomasa y la viabilidad bacteriana (tras sonicación) 	<ul style="list-style-type: none"> - No aporte continuo de nutrientes - Incapacidad para distinguir las bacterias sedimentadas de las que forman la biopelícula - Medición únicamente del punto final - Baja reproducibilidad (en ocasiones) - La sonicación puede afectar la fisiología bacteriana - La biopelícula puede desprenderse
Dispositivo de Calgary	Inoculación de suspensión bacteriana en placas de poliestireno cubiertas. La biopelícula se forma sobre unas púas que sobresalen de la tapa que cubre los pocillos.	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la modificación de las condiciones de cultivo - Menor sensibilidad a la sedimentación que el método anterior - Determinación de biomasa y viabilidad bacteriana (tras sonicación) 	<ul style="list-style-type: none"> - No aporte continuo de nutrientes - Relativamente caro - Medición únicamente del punto final - La sonicación puede afectar la fisiología bacteriana o no conseguir desprender todas las bacterias - La biopelícula puede desprenderse durante los lavados
Dispositivo de Robbins y dispositivo modificado de Robbins	Sistema con flujo continuo, con diversos puertos de muestreo en los que se disponen las superficies donde se va a formar la biopelícula. En el dispositivo modificado el canal es cuadrado y los puertos están alineados para evitar la alteración del flujo.	<ul style="list-style-type: none"> - Aporte continuo de nutrientes - Experimentos de largo plazo - Análisis de diferentes materiales como sustrato - Muestreo independiente de las superficies analizadas 	<ul style="list-style-type: none"> - Caro - Rendimiento bajo o medio - Equipamiento específico: bombas o sistemas de flujo - No permite la inspección a tiempo real
Biorreactores rotantes	Dispositivos compuestos por dos cilindros concéntricos, el externo es estático y el interno es giratorio y contiene las superficies donde se forma la biopelícula.	<ul style="list-style-type: none"> - Aporte continuo de nutrientes - Condiciones relativamente constantes - Análisis de diferentes materiales como sustrato 	<ul style="list-style-type: none"> - Bajo rendimiento - Caro
Cámaras de flujo laminar o "Flow cells"	Dispositivos formados por una cámara transparente de paredes planas con canales a través de los cuales circula medio de cultivo líquido.	<ul style="list-style-type: none"> - Aporte continuo de nutrientes - Observación directa y no destructiva: estudio dinámico 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipamiento especializado: cámara de flujo, dispositivos que atrapen las burbujas y bombas peristálticas - Estudio simultáneo de un número reducido de biopelículas - Caro

Tabla 11. Técnicas indirectas comúnmente utilizadas para el estudio de biopelículas²⁹⁸.

Técnica	Descripción	Principales ventajas	Principales inconvenientes
Tinción con cristal violeta	Estudio de la biomasa por tinción con cristal violeta y mediación de la densidad óptica.	<ul style="list-style-type: none"> - Es el método más utilizado - Versátil - Independiente de viabilidad bacteriana o sonicación - Evaluación simultánea de diferentes condiciones 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapacidad para distinguir bacterias viables de no viables, bacterias de los componentes de la matriz extracelular y distinguir diferentes especies bacterianas en biopelículas mixtas - Baja reproducibilidad - Baja sensibilidad - Ausencia de un protocolo estándar
Peso de la biopelícula	Estudio de la biomasa por medición de su peso.	<ul style="list-style-type: none"> - Sencillo - Económico 	<ul style="list-style-type: none"> - Laborioso, el proceso requiere mucho tiempo - Baja sensibilidad - Baja precisión
Recuento de UFC	Estudio de la viabilidad de las bacterias mediante el recuento en placa de UFC/ml.	<ul style="list-style-type: none"> - Sencillo - Económico - Disponible en la mayoría de laboratorios 	<ul style="list-style-type: none"> - Incapacidad de detección de bacterias viables, pero no cultivables - Laborioso, el proceso requiere mucho tiempo - Únicamente aplicable a bacterias que crecen en placas de agar sólido.
Citometría de flujo	Estudio de la viabilidad mediante el uso de fluoróforos.	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido y preciso - Distinción entre bacterias no viables y viables no cultivables 	<ul style="list-style-type: none"> - Caro
PCR cuantitativa	Estudio de la biomasa mediante amplificación de ADN diana mediante qPCR.	<ul style="list-style-type: none"> - Rápido - Permite la cuantificación de diferentes especies dentro de la misma muestra 	<ul style="list-style-type: none"> - Caro - Sobrestimación debido a eDNA y ADN derivado de las bacterias no viables.
Métodos colorimétricos de estudio del metabolismo celular	Estudio de viabilidad basado en cambios de color producidos por la actividad metabólica bacteriana.	<ul style="list-style-type: none"> - Versátil (aplicable a una amplia gama de microorganismos) - Alto rendimiento - Técnica conservadora, no requiere la destrucción de la biopelícula. 	<ul style="list-style-type: none"> - Límite de detección alto (>10³-10⁸ UFC/biopelícula) - Difícil de usar en biopelículas polimicrobianas (diferentes tasas metabólicas)

Tabla 12. Técnicas directas comúnmente utilizadas para el estudio de biopelículas^{298,299}.

Técnica	Descripción	Principales ventajas	Principales inconvenientes
Microscopía óptica	Microscopía clásica tras tinción (p.ej. hematoxilina-eosina, PAS).	<ul style="list-style-type: none"> - Económico - Sencillo - Permite captar imágenes de regiones grandes de la muestra 	<ul style="list-style-type: none"> - Baja resolución - Requiere tinción - Difícil diferenciación de morfotipos bacterianos
Microscopía Láser Confocal de Barrido (CLSM)	Detección de señales fluorescentes de un mismo plano focal. Combinación de señales de diferentes planos que permite la reconstrucción de una imagen tridimensional de la muestra y extracción de parámetros estructurales cuantitativos (p. ej. volumen, espesor, rugosidad).	<ul style="list-style-type: none"> - Permite la reconstrucción de imágenes tridimensionales. - Distingue las bacterias viables de las no viables - Permite el estudio del efecto de antimicrobianos 	<ul style="list-style-type: none"> - Generalmente requiere el uso de fluoróforos o bacterias modificadas (p. ej. que expresen GFP) - Disponibilidad escasa de sondas específicas - Interferencia con autofluorescencia natural
Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	Estudia la superficie de la muestra mediante un haz de electrones enfocado con lentes magnéticas. Variaciones: Criomicroscopía electrónica de barrido (más sencillo, pero menor resolución, más caro y la superficie puede deteriorarse a gran magnificación) y el FIB (Focused ion beam)-SEM (permite la reconstrucción tridimensional).	<ul style="list-style-type: none"> - Alta resolución - Buena profundidad de campo - Amplia gama de aumentos 	<ul style="list-style-type: none"> - Preparación compleja y laboriosa de la muestra - Posible destrucción de la estructura de la muestra o generación de artefactos durante la preparación
Microscopía de Fuerza Atómica (AFM)	Estudio de características diversas (p. ej. grosor, rugosidad, viscoelasticidad de la biopelícula) mediante detección de la fuerza generada entre la punta de la sonda y la muestra.	<ul style="list-style-type: none"> - Imágenes a nivel micrométrico - Conservadora - Resolución alta y constante - Reconstrucción de imágenes tridimensionales - Evaluación cualitativa y cuantitativa de biopelículas vivas en condiciones fisiológicas 	<ul style="list-style-type: none"> - Generación de artefactos (aunque generalmente se consideran insignificantes)

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis de trabajo

2.1.1. Capítulo 1

2.1.1.1. La actividad de biocidas frente a clones epidémicos de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasas puede ser inferior que frente a clones no epidémicos.

2.1.1.2. La presencia de bombas de expulsión en *K. pneumoniae* productor de carbapenemasas puede estar relacionado con la sensibilidad reducida a biocidas.

2.1.2. Capítulo 2

2.1.2.1. La capacidad de producción de biopelícula de clones epidémicos de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa puede ser superior que la de clones no epidémicos.

2.1.2.2. La exposición a concentraciones subletales de biocidas puede favorecer la capacidad de formación de biopelícula en *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa.

2.2. Objetivos del estudio

2.2.1. Capítulo 1

- 2.2.1.1. Determinar la actividad *in vitro* de biocidas frente a aislados de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa.
- 2.2.1.2. Identificar genes que codifican bombas de expulsión que pudieran tener algún papel en el desarrollo de sensibilidad reducida a biocidas. Analizar la relación que pueda existir entre la presencia de genes de bombas de expulsión y la actividad *in vitro* de biocidas.

2.2.2. Capítulo 2

- 2.2.2.1. Evaluar la capacidad de formación de biopelículas y determinar si los aislados pertenecientes a clones epidémicos tienen mayor capacidad de formación de biopelícula que los aislados pertenecientes a clones no epidémicos.
- 2.2.2.2. Evaluar la viabilidad y dinámica de formación de las biopelículas formadas por aislados pertenecientes a clones epidémicos.
- 2.2.2.3. Evaluar la presencia del operón que codifica la fimbria de tipo 3 (*mrkABCDF*), determinar la expresión relativa del gen *mrkA* y analizar si existen diferencias entre aislados de clones epidémicos y aislados de clones no epidémicos.
- 2.2.2.4. Evaluar la capacidad de formación, viabilidad y dinámica de formación de las biopelículas en presencia de concentraciones subletales de biocidas.

3. Material y métodos

3.1. Material

3.1.1. Cepas bacterianas

Se seleccionaron 17 aislados clínicos de Kp-PC representativos de los diferentes secuenciotipos y tipos de carbapenemasas que circulaban en los hospitales españoles durante 2012-2015 (**Tabla 13**). Once aislados provenían de un estudio multicéntrico español realizado en el Laboratorio de Referencia e Investigación para la Resistencia a los Antibióticos (Centro Nacional de Microbiología [CNM], Madrid) y 6 aislados provenían del Laboratorio de referencia para tipado molecular de patógenos nosocomiales y detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos de interés sanitario en Andalucía del Programa PIRASOA (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla)¹⁰¹.

Tabla 13. Principales características de los 17 aislados de Kp-PC incluidos en este trabajo.

Secuenciotipo	Origen ¹	Clon epidémico ²	Genes que codifican carbapenemasa o BLEE	
			Carbapenemasa	BLEE del grupo CTX-M
ST101	CNM	Sí	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST258	PIRASOA	Sí	<i>bla</i> _{KPC-3}	No
ST512	PIRASOA	Sí	<i>bla</i> _{KPC-3}	No
ST11	CNM	Sí	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST15	CNM	Sí	<i>bla</i> _{VIM-1}	No
ST147	CNM	Sí	<i>bla</i> _{VIM-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-9} ³
ST11	CNM	Sí	<i>bla</i> _{OXA-245}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST11	PIRASOA	Sí	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST15	PIRASOA	Sí	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST37	PIRASOA	Sí	<i>bla</i> _{OXA-48}	No
ST405	CNM	Sí	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST340	CNM	No	<i>bla</i> _{VIM-1}	No ⁴
ST437	CNM	No	<i>bla</i> _{OXA-245}	No
ST13	CNM	No	<i>bla</i> _{OXA-48}	No
ST16	CNM	No	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST846	CNM	No	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{CTX-M-15}
ST899	PIRASOA	No	<i>bla</i> _{OXA-48}	No

¹ CNM: Laboratorio de Resistencia a Antibióticos, Centro Nacional de Microbiología, ISCIII. Madrid, PIRASOA: Laboratorio de referencia para tipado molecular de patógenos nosocomiales y detección de mecanismos de resistencia a antimicrobianos de interés sanitario de Andalucía (Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España).

² Criterios extraídos de la publicación de Navon-Venezia et al¹⁶.

³ También se identificó el gen *bla*SHV-12

⁴ También se identificó el gen *bla*TEM-30

3.1.2. Productos químicos

Tabla 14. Productos químicos utilizados.

Ácido acético (Panreac Química, España)	Cristal violeta (VWR Chemicals, EUA)
Agarosa D1 Low EEO (Conda pronadisa, España)	Etanol absoluto (Sigma Aldrich, EUA)
Agua destilada (Panreac Química, España) y MilliQ	Fosfato disódico hidratado (Panreac Química, España)
NaOH (Merck, Alemania)	Fosfato potásico dihidratado (Merck, Alemania)
β-mercaptoetanol (Panreac Química, España)	Glucosa (Sigma Aldrich, EUA)
Cloruro amónico (Sigma Aldrich, EUA)	Metanol (Sigma Aldrich, EUA)
Cloruro cálcico (Sigma Aldrich, EUA)	Proteinasa K (Roche, Suiza)
Cloruro magnésico (Sigma Aldrich, EUA)	Sulfato magnésico (Sigma Aldrich, San Luis, EUA)
Cloruro sódico (Sigma Aldrich, EUA)	

3.1.3. Soluciones

Tabla 15. Soluciones utilizadas.

Solución	Composición
Glucosa al 20%	20 g de glucosa por 100 ml de H ₂ O estéril (solución preparada en el laboratorio)
PBS	0,144 g KH ₂ PO ₄ , 1,775 g NaHPO ₄ heptahidratado, 8,5 g NaCl y agua destilada c.s.p. 1L; pH 7,2 (solución preparada en el laboratorio)
TAE 1%	20 ml TAE al 50% (242 g Tris base (Sigma Aldrich, EUA), 57,1 ml ácido acético, 37,2 g Na ₂ EDTA dihidratado (Sigma Aldrich, EUA), agua c.s.p. 1L) en 980 ml agua destilada (solución preparada en el laboratorio)
Solución de lisis para la extracción de ADN	200 µl de lisozima 50 mg/ml, 100 µl de lisostatina 2 mg/ml, 20 µl de Tris-HCl 1 M, 4 µl de EDTA 0,5 M (Todos de Sigma Aldrich, EUA) y 676 µl de H ₂ O (solución preparada en el laboratorio)

3.1.4. Reactivos

Tabla 16. Reactivos utilizados.

Proceso	Reactivo
PCR	0,2 µl de Taq 5U/ µl (Invitrogen, EUA), 5 µl de Buffer Taq 10X, 2,5 µl de cebadores [10µM] F y R (TibMolbiol, Alemania), 2 µl MgCl ₂ , 4 µl dNTPs (Invitrogen, EUA) y 31,8 µl de agua MilliQ (por reacción) + 2 µl de ADN
Electroforesis	RedSafe Nucleic Acid Staining Solution (INtRON Biotechnology, Corea)
Secuenciación del genoma completo	Extracción de ADN: DNeasy® Blood and Tissue Kit (250) (Qiagen, Alemania) Preparación de la librería: Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina®, EUA), 1X dsDNA HS (high sensitivity) Assay Kit (Thermo Scientifics, EUA) Secuenciación: MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina®, EUA)
Expresión génica	Extracción de ARN: RNeasy mini kit (Qiagen, Alemania) Tratamiento Dnasa: Ambion® RNA (Life Technologies, EUA) Transcripción: Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Sigma Aldrich, EUA) RT-PCR: LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche, Suiza)
CLSM	FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit (Invitrogen, EUA)

3.1.5. Equipos

Tabla 17. Equipos utilizados.

Autoclaves	Modelo Presoclave 75 (pSelecta, España)
Balanzas electrónicas de precisión	Modelo ER-120A (A&D), Modelo PS 360.X2 (Radwag, Polonia)
Baño	Modelo UNITRONIC OR (pSelecta, España)
Centrífuga de placas de 96 pocillos	Eppendorf centrifuge 5810R (Eppendorf, Alemania)
Congeladores y frigoríficos	4°C, -20°C y -80°C: varios modelos
Electroforesis en gel	Microondas: EM-G4752N 900W (Sanyo, Japón) Matraz erlenmeyer 500 ml (Labbox, España) Moldes y peines para geles (BioRad, EUA) Cubeta de electroforesis horizontal y electrodos (BioRad, EUA) Fuente de alimentación 1000/500 Power Supply (BioRad, EUA) Cámara de revelado: Gel Logic 200 Imaging System (Kodak, EUA)
Lector de microplacas	Modelo Infinite 200Pro (Tecan, Suiza)
Estudio de sensibilidad	MicroScan WalkAway® 96 plus (Siemens, Alemania) Panel Neg MIC 44 (Beckman Coulter, EUA)
Estufas	25°C modelo PREBATEM TFT (pSelecta, España) 37°C B6420 (Heraeus instruments, Alemania)
Extracción de ácidos nucleicos	Extracción: QIAcube (Qiagen, Alemania)
Cuantificación de ácidos nucleicos	Nanodrop® modelo ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA), Qubit Fluorometer (Thermo Scientific, EUA)
Microscopio CLSM	Zeiss LSM710 CLSM (Carl Zeiss, Alemania)
Sistema "Flow cell"	Bomba peristáltica: Watson-Marlow 205S peristaltic pump (Watson-Marlow Fluid Technology Group, Reino Unido). Tubos de silicona de 1 mm de diámetro (Lindemann GmbH, Alemania) "Bubble trap" (DTU Bioengineering, Universidad Técnica de Dinamarca) Jeringuillas de insulina 1 ml, jeringas de plástico de 5 ml y aguja 30G (Becton, Dickinson and Company, EUA) Tapones (B Braun, Melsungen, Alemania) "Flow cell" (DTU Bioengineering, Universidad Técnica de Dinamarca) Cubres 24 x 60 mm (Deltalab, España) Bolas de vidrio (Sigma Aldrich, EUA) Matraz erlenmeyer de 3 L (Labbox, España) Garrafa de desechos
Secuenciador	MiSeq System Illumina® (Illumina®, EUA)
Sonicador	Modelo 513. Watt. 100. Volt. 220 (pSelecta, España)
Termocicladores	2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA) SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies, EUA) LightCycler® 2.0 Instrument (Roche, Suiza)

3.1.6. Medios de cultivo

Tabla 18. Medios de cultivo utilizados.

Medio	Descripción	Componentes
MacConkey (Oxoid, Reino Unido) + 2 mg/l de cefotaxima (Sigma-Aldrich, EUA)	Medio selectivo y diferencial	MacConkey Agar N°3 (Oxoid): Peptona (20 g/l), lactosa (10 g/l), sales biliares No.3 (1,5 g/l), cloruro de sodio (5 g/l), rojo neutro (0,03 g/l), cristal violeta (0,001 g/l), agar (15 g/l) Cefotaxima (2mg/l) (Sigma-Aldrich, EUA); pH 7,1.
Mueller Hinton Broth II (Oxoid, Reino Unido)	Medio líquido para el estudio de sensibilidad antimicrobiana.	Extracto de carne bovina (3 g/l), hidrolizado de caseína (17,5 g/l), almidón (1,5 g/l); pH 7,3
Mueller Hinton Agar II (Oxoid, Reino Unido)	Medio sólido para el estudio de sensibilidad antimicrobiana.	Extracto de carne bovina (3 g/l), hidrolizado de caseína (17,5 g/l), almidón (1,5 g/l), agar (17 g/l); pH 7,3
Sales M9 5X	Componente del medio M9	Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O (64 g), KH ₂ PO ₄ (15 g), NaCl (2,5 g), NH ₄ Cl (5 g), H ₂ O (1 l)
Medio M9	Medio líquido mínimo	Sales M9 5x (200 ml/l), sulfato magnésico 1 M (2ml/l), cloruro cálcico 1 M (100 µl/l), glucosa 20% (20 ml/l); pH 7,0
Medio FAB modificado	Medio líquido mínimo	MgCl ₂ 1 M (3000 µl), CaCl ₂ 0,1 M (300 µl), metales traza (300 µl), H ₂ O destilada (2700 ml), medio A-10 (300 ml), 816 µl glucosa 20% filtrada
Medio A-10	Componente de medio mínimo FBA	H ₂ O destilada (2500 ml), (NH ₄)SO ₄ (5 g), Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (15 g), KH ₂ PO ₄ (7,5 g), NaCl (7,5 g)
Metales traza	Componente de medio mínimo FBA	H ₂ O destilada (1000 ml), Ca ₂ SO ₄ ·2H ₂ O (200 mg), FeSO ₄ ·7H ₂ O (200 mg), MnSO ₄ ·H ₂ O (20 mg), CuSO ₄ ·5H ₂ O (20 mg), ZnSO ₄ ·7H ₂ O (20 mg), CoSo ₄ ·7H ₂ O (10 mg), NaMoO ₄ ·H ₂ O (10 mg), H ₃ BO ₃ (5mg)

3.1.7. Biocidas

Tabla 19. Biocidas, solvente y diluyente utilizados en su preparación y composición.

Biocida	Solvente/ Diluyente	Composición
Betadine® solución dérmica (MEDA Pharma SAU, España)	Puro	Por 100 ml: 10g de povidona yodada, glicerol, fosfato disódico, ácido cítrico, hidróxido de sodio, laureth-9 y agua purificada c.s.p.
Cloruro de benzalconio solución acuosa 50% (Sigma-Aldrich, EUA)	Agua/agua	50% cloruro de benzalconio y agua destilada c.s.p.
Digluconato de clorhexidina 20% solución acuosa (Sigma-Aldrich, EUA)	Agua/agua	1,6-Bis(N5-[p-clorofenil]-N1-biguanida) hexano; 1,1'-Hexametilenebis(5-[p-clorofenil]biguanida)
Etanol 70% V/V (Vaza Laboratorios, España)	Agua/agua	Etanol 96% y agua destilada c.s.p.
Triclosán, Irgasán (Sigma-Aldrich, EUA)	Metanol 70%/agua	(5-Cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol)
Lejía (Rubio Díaz Hnos, S.L., España)	Puro	Por 1L: 35g de hipoclorito sódico activo a la salida de fábrica y agua destilada c.s.p.
Sterillium® solución hidroalcohólica (BODE Chemie GmbH, Alemania)	Puro	Composición por 100g: 45g de 2-propanolol, 30g de 1-propanolol, 0,2g de etilsulfato de mecetronio y emolientes

3.1.8. Herramientas informáticas y servidores en línea

Tabla 20. Herramientas informáticas y servidores en línea utilizados.

Servidores en línea	Aplicación	Disponible en:
Clustal Omega v2.0.12	Alineamiento múltiple de secuencias	https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
ResFinder v3.2	Identificación de determinantes de resistencia a partir de datos de secuenciación masiva	https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/
MLSTFinder v2.0.4	Identificación de secuencias tipo (ST) a partir de datos de secuenciación masiva	https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/
UniProt	Base de datos de acceso libre de secuencias de proteínas e información funcional	https://www.uniprot.org/
RAST	Anotación de genoma bacteriano	https://rast.nmpdr.org/
BLAST	Alineamiento de secuencias (ADN, ARN o proteínas) de tipo local	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
BioRender	Herramienta para generación de figuras científicas	https://biorender.com/

3.1.9. Programas informáticos

Tabla 21. Programas informáticos utilizados.

Programa informático	Aplicación
Growthcurver (software libre, (Sprouffske K, Growthcurver sourcecode, 2016)	Herramienta bioinformática para el análisis de datos generados en experimentos de curvas de crecimiento. Descargable en http://github.com/sprouffske/growthcurver .
CLC Genomics Workbench versión 9 (CLC bio, Dinamarca).	Herramienta bioinformática para el análisis de datos de secuenciación masiva: ensamblaje <i>de novo</i> de genomas completos y análisis de calidad de la secuenciación.
Unipro UGene v1.31.1 (UNIPRO, Rusia)	Herramienta bioinformática multiplataforma de acceso libre: anotación, búsqueda rápida de secuencias, alineamiento de secuencias, PCR <i>in silico</i> , diseño de cebadores...
IBM® SPSS Statistics v21.0.0.0 (IBM Corp., Armonk, EUA)	Análisis estadístico de resultados y generación de gráficos.
Microsoft Excel 2016 (Microsoft Comp., EUA)	Análisis estadístico de resultados y generación de gráficos.
GraphPad Prism® v6.05 (GraphPad Software, EUA)	Análisis estadístico de resultados y generación de gráficos.
Zeiss Zen 2 (Blue Edition) Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Alemania)	Adquisición y procesamiento de imágenes de microscopía confocal y análisis e interpretación de datos.
COMSTAT2 v2.1 (Systems Biology-DTU, Dinamarca)	Análisis y extracción de parámetros cuantitativos (biomasa, grosor, superficie...) de imágenes obtenidas por microscopía confocal.
IMARIS software package (Bitplane AG, Suiza)	Análisis y visualización de imágenes en 3D.

3.1.10. Cebadores

Tabla 22. Cebadores utilizados.

Gen	Cebadores (TIB Molbiol, Berlín, Alemania)	Tamaño amplicón (pb)	Referencia
<i>mrkA</i>	F-5' AGCGATGCGAACGTTTACCTGTCTC 3' R-5' CGTCATCCTGTTTAGTGCCATCAGC 3'	139	300
<i>rpoD</i>	F-5' GAAGAGATGGATGACGACGAAGACG 3' R-5' GTACGCAGCTCGGCGAATTTCTCAC 3'	116	300
<i>qacEΔ1</i>	F-5' GCGAAGTAATCGCAACATCC 3' R-5' TACCTACAAAGCCCCACGCA 3'	234	Diseño propio (Unipro UGene v1.31.1)
<i>smvA</i>	F-5' CGCTGATGGCGATTTTGCTG 3' R-5' CGCTGAGGGTCGGCG 3'	81	234

3.2. Métodos de Microbiología

3.2.1. Estudio de sensibilidad *in vitro* a carbapenémicos

Las CMI de imipenem, meropenem y ertapenem se determinaron usando paneles Neg MIC 44 y el sistema automatizado MicroScan WalkAway® 96 plus y las categorías clínicas se establecieron de acuerdo con los puntos de corte de EUCAST Versión 12.0³⁰¹. La CMI es la concentración más baja de un antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento visible de un microorganismo en un tiempo y unas condiciones *in vitro* definidos. *E. coli* (ATCC® 25922™) se utilizó como control, como recomiendan EUCAST y CLSI^{302,303}.

3.2.2. Estudio de sensibilidad *in vitro* a biocidas

3.2.2.1. Preparación de biocidas

Se utilizó agua destilada estéril como solvente en la preparación de las diluciones de los 7 biocidas estudiados, excepto para la dilución de triclosán, en la que se utilizó metanol al 70% como solvente. Las diluciones de los biocidas fueron preparadas el mismo día de su uso. Las concentraciones de los biocidas (mg/l) analizadas en cada uno de los medios utilizados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 23. Rangos de concentraciones de biocidas analizados en MHB y medio mínimo M9.

Biocida	Rangos de concentraciones (mg/l) de los biocidas testados en	
	MHB	M9
Solución de propanol (Sterillium®)	425.000-207,5	6.640,6-3,2
Povidona yodada (Betadine®)	50.000-24,4	781,3-0,4
Hipoclorito de sodio	17.500-8,5	273,4-0,1
Digluconato de clorhexidina	156,3-0,1	4,9-0,002
Cloruro de benzalconio	500-0,2	7,8-0,004
Etanol	285-0,1	4,5-0,002
Triclosán	15-0,007	15-0,007

3.2.2.2. Microdilución en caldo

Los valores de CMI de los biocidas se determinaron mediante microdilución en MHB, de acuerdo con las normas del CLSI con algunas modificaciones³⁰³. Para ello, se realizó una suspensión 0,5 McFarland de un cultivo fresco de cada uno de los aislados a analizar y, tras realizar una dilución 1/100, se inoculó en placas de poliestireno transparente de 96 pocillos con fondo en U (GreinerBioOne® International GmbH, Alemania) en las que previamente se había realizado la dilución seriada del biocida (1/2) en caldo Mueller-Hinton II (MHB). Las placas se incubaron durante 16-20h a 37°C. Los valores de CMI fueron determinados en dos medios (MHB y medio mínimo M9) y a 2 temperaturas de incubación diferentes (25°C y 37°C). Se utilizó medio MHB

por ser recomendado por EUCAST y CLSI en *Enterobacterales* para la determinación de la CMI de los antimicrobianos y medio mínimo M9 para simular las condiciones de escasez de nutrientes que pueden encontrarse en las superficies del entorno hospitalario^{301,303}. La determinaciones se realizaron a la temperatura estándar ($35\pm 2^{\circ}\text{C}$) y a 25°C , representando la temperatura ambiente del entorno³⁰⁴. Se utilizaron controles de esterilidad y de crecimiento. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC® 700603™) se utilizó como control de reproducibilidad. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en diferentes días.

La significación estadística de las diferencias observadas en los valores de CMI se calculó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05.

3.2.3. Curvas de crecimiento

Se realizaron curvas de crecimiento de los 17 aislados de Kp-PC en todas las condiciones en las que se realizó el análisis de actividad *in vitro* de los biocidas (25°C y 37°C ; medio MHB y M9). La finalidad de esta determinación fue estudiar la capacidad de crecimiento de estos aislados en las diferentes condiciones de temperatura y medio de cultivo para analizar su posible impacto en la determinación de los valores de CMI a biocidas en condiciones diferentes al estándar (cultivo en MHB a 37°C). Las curvas de crecimiento se obtuvieron realizando lecturas de densidad óptica (595nm) cada 60 minutos durante un periodo de 48 horas usando el lector de microplacas Infinite 200 PRO³⁰⁵.

El protocolo que se siguió fue el siguiente (**Figura 11**):

1. Inocular medio MHB con las cepas a estudiar e incubar 6 horas a 37°C en agitación.
2. Obtener un 0,5 McFarland con el cultivo anterior.
3. Hacer una dilución 1/10.000 en el medio de cultivo a analizar (10^4 UFC/ml aproximadamente) e inocular en una placa de poliestireno transparente de 96 pocillos con fondo plano (GreinerBioOne® International GmbH, Alemania). Se inocularon 200 μl por pocillo y se realizaron 3 réplicas por placa.
4. Cubrir la placa con la tapa y medir la densidad óptica (DO) a 595 nm durante 48 horas a 25 o 37°C en el sistema Infinite® 200PRO. El equipo realiza mediciones cada 60 minutos (49 mediciones, 0-48h) y registra los datos en un documento Excel.
5. Realización de las curvas de crecimiento mediante el programa Excel.
6. Análisis de resultados mediante Growthcurver.

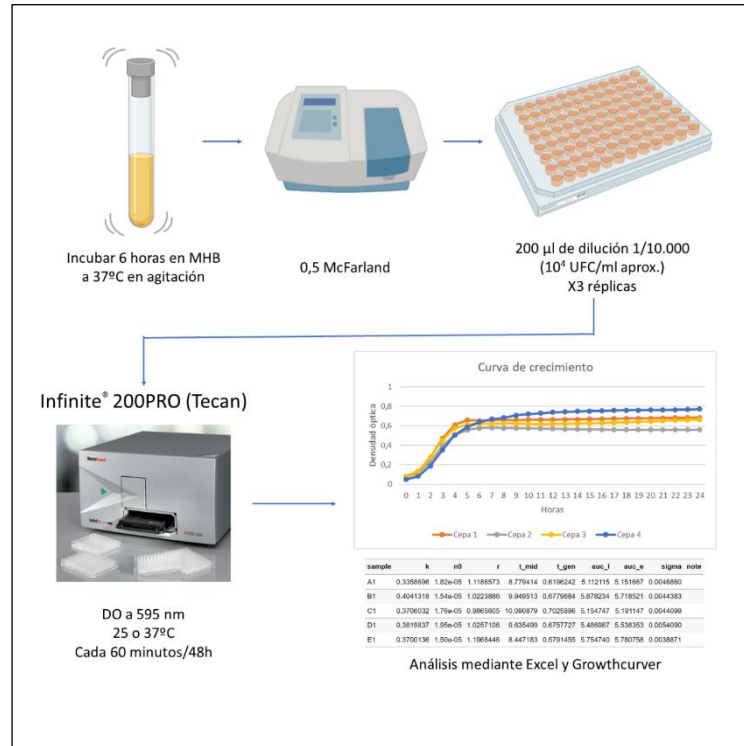


Figura 11. Esquema de la metodología utilizada para la realización de las curvas de crecimiento.

Los resultados obtenidos fueron analizados con el paquete Growthcurver. Esta herramienta informática ajusta los datos de crecimiento bacteriano obtenidos a la siguiente fórmula (**Fórmula 1**):

$$N_t = \frac{K}{1 + \left(\frac{K - N_0}{N_0}\right) e^{-rt}}$$

Fórmula X1. N_0 : tamaño de la población al comienzo del experimento, N_t : número de bacterias en un tiempo determinado (t), K : tamaño máximo de población en las condiciones analizadas, r : tasa de crecimiento intrínseco de la población.

Growthcurver encuentra los mejores valores de N_0 , K y r mediante la implementación del algoritmo de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg-Marquardt y calcula el tiempo de generación (t_{gen} o doubling time), en cada condición analizada³⁰⁶. La tasa de crecimiento intrínseco (r) es la esperada en ausencia de limitaciones a causa del tamaño de la población y el tiempo de generación es el tiempo necesario para que se duplique la población medido en horas.

La significación estadística de las diferencias observadas en la tasa de crecimiento intrínseco (r) y el tiempo de generación (t_{gen}) se calculó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05.

3.2.4. Tinción de biopelículas con cristal violeta

La cantidad de biomasa de las biopelículas formadas por los 17 aislados de Kp-PC estudiados se determinó mediante el ensayo de tinción con cristal violeta descrito por Stepanovic con algunas modificaciones³⁰⁷. Se estudió la capacidad de formación de biopelícula en cuatro condiciones diferentes, combinando dos temperaturas diferentes (25°C y 37°C) y dos condiciones de humedad diferentes (con y sin humedad). Las biopelículas se incubaron a 37°C como temperatura estándar y a 25°C representando la temperatura ambiente del entorno. Las determinaciones se realizaron en presencia y ausencia de humedad para representar diferentes condiciones ambientales que pueden encontrarse en el entorno.

Los ensayos se realizaron en placas de poliestireno transparente de 96 pocillos con fondo plano (GreinerBioOne® International GmbH, Alemania). Se prepararon cuatro placas idénticas incubadas en 4 condiciones diferentes para cada aislado: placa 1 (25°C con humedad), placa 2 (25°C sin humedad), placa 3 (37°C con humedad) y placa 4 (37°C sin humedad). Los ensayos se realizaron por triplicado.

El protocolo para el ensayo de tinción con cristal violeta que se siguió fue **(Figura 12)**:

1. Realizar un cultivo “*over night*” (O/N) en MHB de cada uno de los aislados a estudiar.
2. Inocular tres pocillos de una placa de 96 pocillos con fondo plano con 100 µl de una dilución 1/100 realizada en medio M9 solo o complementado con concentraciones subletales de cada uno de los biocidas a analizar (equivalentes a 0,25 veces su CMI). En el caso de las placas en las que se estudia el efecto de la presencia de humedad, los pocillos que rodean a los que han sido inoculados deben llenarse con 100 µl agua destilada.
3. Colocar la tapa sobre la placa e incubar aeróbicamente durante 18-24 horas a 25 o 37°C.
4. Tras la incubación, lavar cada pocillo cinco veces con 200 µl de tampón PBS (90,1% de NaCl, 8,4% de Na₂HPO₄, 1,5% de KH₂PO₄).
5. Fijar las bacterias que permanecen unidas al fondo plano de los pocillos con metanol al 99%.
6. Eliminar el metanol por volcado de la placa y secado al aire.
7. Llenar los pocillos con 200 µl de cristal violeta al 2% durante 10 minutos. Lavar el exceso de colorante por volcado de las placas y enjuagar por triplicado con agua estéril.
8. Secar las placas al aire.
9. Resolubilizar el cristal violeta con 150 µl de ácido acético glacial al 33% durante 15 minutos.

10. Medir la DO de cada pocillo mediante el lector de microplacas Infinite 200 PRO a 595 nm.

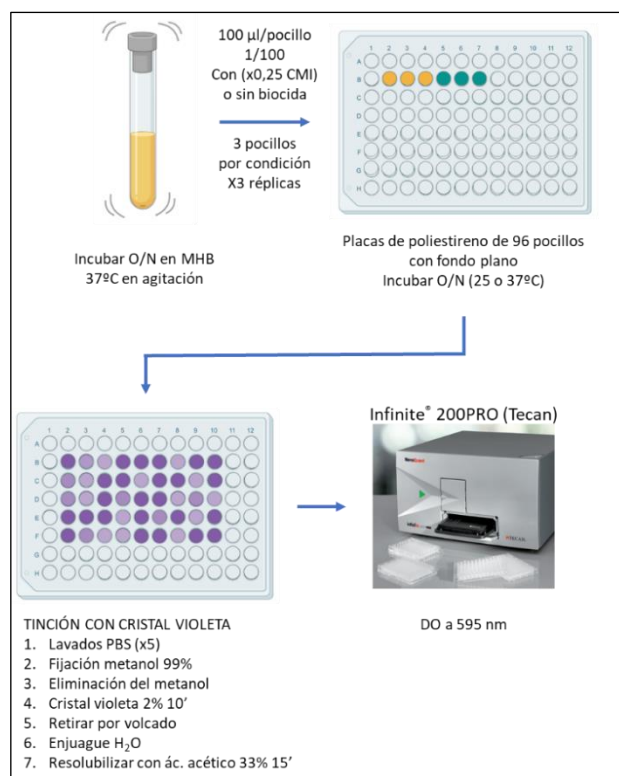


Figura 12. Esquema de la metodología de tinción de biopelícula de Kp-PC con cristal violeta. O/N: “over night”, MHB: caldo Mueller Hinton, DO: densidad óptica.

El valor de DO de cada aislado se calcula como el valor promedio de DO reducido por el punto de corte para los valores de DO (DOc), (DO del aislado = DO promedio - DOc). El valor promedio de los valores de DO es la media de los valores de DO de 3 determinaciones independientes realizadas en 3 días diferentes. El valor DOc corresponde a tres desviaciones estándar por encima de la media de valor de DO del control negativo (DOc= DO media del control negativo + [3 x desviación estándar del control negativo]).

Finalmente, los aislados se clasificaron de acuerdo con su capacidad de formación de biopelículas, siguiendo el siguiente esquema establecido por Stepanovic³⁰⁷ (Tabla 24).

Tabla 24. Clasificación de capacidad de formación de biopelícula según Stepanovic³⁰⁷.

Fórmula	Capacidad de formación de biopelículas	Símbolo
$DO \leq DOc$	No formador de biopelícula	-
$DOc \leq DO \leq 2xDOc$	Débilmente formador de biopelícula	+
$2DOc \leq DO \leq 4xDOc$	Moderadamente formador de biopelícula	++
$4DOc \leq DO$	Fuertemente formador de biopelícula	+++

La significación estadística de las diferencias observadas en la capacidad de formación de biopelículas se calculó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. La significación estadística del efecto de los biocidas sobre la capacidad de formación de biopelículas se analizó mediante el Test de Wilcoxon (no paramétrico). Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05.

3.2.5. Supervivencia bacteriana en biopelículas

La viabilidad o supervivencia celular de las biopelículas formadas por 4 aislados, representativos de los clones epidémicos circulantes en nuestra región (ST512/KPC-3, ST258/KPC-3, ST15/OXA-48 y ST11/OXA-48), se analizó mediante recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Al igual que el ensayo anterior, las biopelículas se realizaron en placas de polietileno transparente de 96 pocillos de fondo plano (GreinerBioOne® International GmbH, Alemania), utilizando medio M9, para simular las condiciones de escasez de nutrientes, con o sin concentraciones subletales de los biocidas a estudiar. Se analizaron 2 temperaturas de incubación, 37°C como temperatura estándar y 25°C representando la temperatura ambiente del entorno. No se adicionó humedad a las placas, debido a que el protocolo fue diseñado para simular las condiciones presentes en diferentes superficies secas del entorno hospitalario.

El protocolo para el ensayo de supervivencia que se siguió fue (**Figura 13**):

1. Realizar un cultivo O/N en MHB de cada uno de los aislados a estudiar.
2. Inocular tres pocillos de la placa de 96 pocillos con fondo plano con 100 µl de una dilución 1/100 realizada en medio M9 solo o suplementado con concentraciones subletales de cada biocida a analizar (equivalentes a 0,25 veces su CMI).
3. Preparar tantas placas como combinaciones de temperatura y tiempos de incubación queremos estudiar, en este caso 20 placas por aislado. La viabilidad de la biopelícula se analizará tras 24, 48 y 72 horas, 1, 1,5, 2 y 3 semanas y 1, 1,5 y 2 meses de incubación a 25 y 37°C.
4. Colocar la tapa sobre la placa e incubar aeróbicamente a 25 o 37°C.
5. Tras la incubación, eliminar las bacterias planctónicas con 5 lavados secuenciales con tampón PBS.
6. Separar las bacterias adheridas al fondo plano del pocillo mediante sonicación durante 2 minutos.
7. Inocular 100 µl en placas de MHA diluciones seriadas en base 10 (desde la original a 10⁻⁸ en función del tiempo de incubación y la exposición o no a biocidas) de las bacterias obtenidas tras la sonicación.

8. Incubar las placas en aerobiosis 24 horas a 37°C.
9. Realizar el recuento de UFC obtenidas.

El recuento de bacterias se expresó como el \log_{10} de la media de UFC/ml calculados de tres pocillos en tres experimentos independientes.

La significación estadística de las diferencias observadas en la viabilidad de las biopelículas se calculó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05 en todos los análisis.

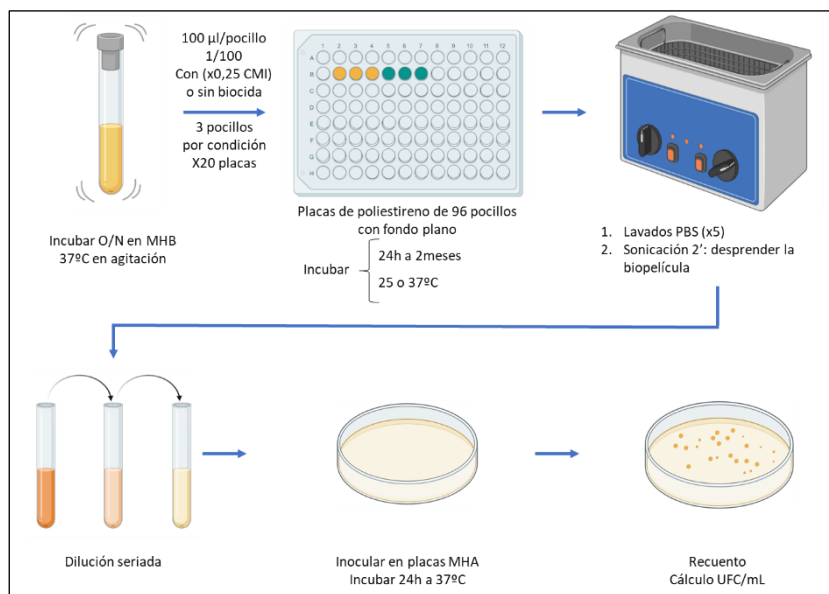


Figura 13. Esquema de metodología de estudio de supervivencia en biopelículas de Kp-PC. O/N: “over night”.

3.2.6. Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)

La dinámica y la estructura tridimensional de las biopelículas formadas por 4 aislados representativos de los clones epidémicos circulantes en nuestra región (ST512/KPC-3, ST258/KPC-3, ST15/OXA-48 y ST11/OXA-48) fue analizada mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM), como se ha descrito anteriormente por Rojo-Molinero y colaboradores³⁰⁸. Además, puesto que los resultados obtenidos mediante tinción con cristal violeta y supervivencia mostraron que povidona yodada fue el biocida con mayor efecto sobre la formación de biopelícula, se analizó el efecto de concentraciones subletales (0,25x CMI) de este biocida sobre la formación de la biopelícula. La temperatura de incubación de las biopelículas fue 30°C, temperatura habitualmente utilizada para el estudio de biopelículas en este sistema, a la que se forman pocas burbujas que puedan dañar la biopelícula y que simula la temperatura ambiente³⁰⁹.

El protocolo para el estudio de la biopelícula mediante CLSM que se siguió fue:

Día -1

1. Esterilizar el sistema.
2. Montar las "Flow cell" de tres canales (**Figura 14**). Para ello colocar un cubreobjetos sobre los canales y sellarlo con silicona.

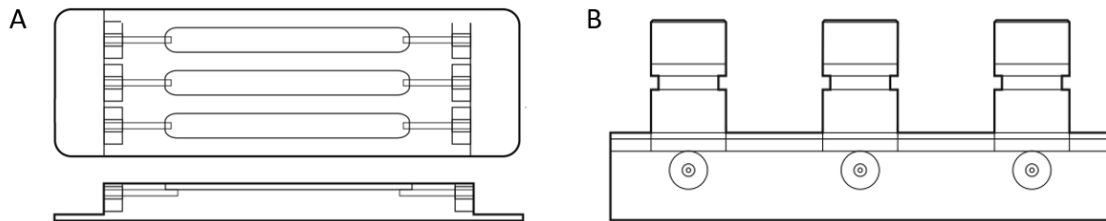


Figura 14. Esquema de dispositivo "Flow cell" (A) y dispositivo "Bubble trap" (B) adaptado de Barraud y colaboradores³¹⁰. (Copyright del diseño: Biocentrum-DTU 2005).

Día 0

1. Montar el sistema (**Figura 15**).
2. Iniciar el flujo del sistema (0,50 rpm) haciendo pasar agua estéril con lejía por el mismo O/N.
3. Preparar medio mínimo FBA (a excepción de glucosa y A-10) y autoclavar.
4. Descongelar o dar un pase del aislado que se vaya a inocular en una placa de agar MacConckey e incubar O/N a 35°C.

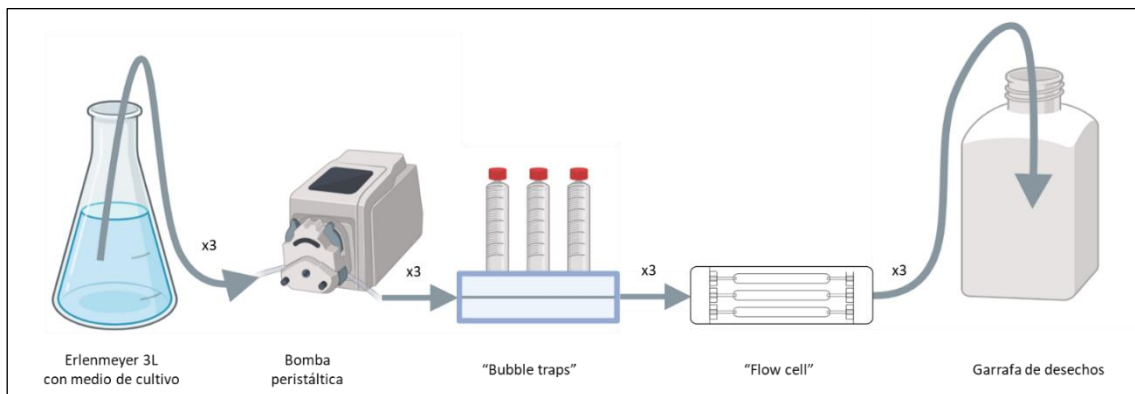


Figura 15. Esquema de sistema de "Flow Cell" con 1 "Bubble trap" y 1 "Flow cell".

Día 1

1. Añadir medio A-10 (autoclavado) y glucosa (filtrada) al medio FAB e introducir en la cámara a 30°C para que se atempere.

2. Eliminar la solución de agua destilada estéril con lejía del sistema dejando pasar aire tras quitar los tapones de las “Bubble traps”.
3. Enjuagar la solución de agua con lejía haciendo pasar agua destilada estéril por el mismo con los tapones en las “Bubble traps” e iniciando el flujo del sistema (90 rpm).
4. Eliminar el agua del sistema dejando pasar aire tras quitar los tapones de las “Bubble traps”.
5. Introducir medio mínimo FBA o FBA con povidona yodada (0,25xCMl) en el sistema y mantener el flujo a 1,50 rpm.
6. Detener el flujo del sistema y pinzar la “Flow cell”.
7. Ajustar el cultivo bacteriano hasta alcanzar una DO de 0,1 medida a 600nm mediante un espectrofotómetro visible.
8. Inocular 250 μ l de una dilución 1/100 del cultivo previamente ajustado en el interior de cada uno de los canales de la “Flow cell” con una jeringa a través de los tubos de salida.
9. Poner la “Flow cell” con el cubreobjetos boca abajo durante una hora para que las bacterias puedan adherirse a la superficie del cubreobjetos.
10. Darle la vuelta a las “Flow cells”, quitar las pinzas e iniciar el flujo del sistema a 1,50 rpm.

Días 2, 3 y 7

Las biopelículas se analizaron con el microscopio de barrido láser confocal LSM710 de Zeiss a las 24h, 48h y 1 semana tras la inoculación. Los pasos que se siguieron fueron:

1. Detener el flujo del sistema y pinzar los tubos de la “Flow cell”.
2. Inocular 150 μ l de reactivo FilmTracerTM LIVE/DEAD[®] Biofilm Viability kit.
3. Quitar las pinzas y reanudar el flujo de medio de cultivo.
4. Poner la “Flow cell” boca abajo en la pletina del microscopio, enfocar, realizar los ajustes necesarios.
5. Tras la observación de la estructura de la biopelícula a lo largo del canal de la “Flow cell” tomar imágenes representativas de la biopelícula.

Se tomaron y analizaron al menos cuatro imágenes por cada canal de cada “Flow cell” de cada uno de los aislados expuestos o no a concentraciones subletales de povidona yodada, mediante el programa Zeiss Zen 2 (Blue Edition) Software.

Las imágenes fueron analizadas mediante el software COMSTAT2 v2.1³¹¹ para la estimación de la biomasa (μ m³/ μ m²) y el grosor máximo (μ m) de la biopelícula. Además, se generaron imágenes tridimensionales utilizando el paquete de software IMARIS.

Último día

Extraer las bacterias que forman la biopelícula para comprobar la ausencia de contaminación del sistema. Los pasos que se siguieron fueron:

1. Detener el flujo del sistema y pinzar las "Flow cells" por ambos extremos.
2. Desconectar los tubos de entrada y salida de la "Flow cell" y poner los tubos de extracción.
3. Introducir 1 ml de suero con bolitas de vidrio con una jeringa a través de cada uno de los canales de la "Flow cell".
4. Desprender la biopelícula moviendo el embolo de la jeringa.
5. Extraer la totalidad del volumen.
6. Sembrar diluciones de 10^{-4} y 10^{-6} en MHA.
7. Incubar 24 horas en aerobiosis a 37°C.

La significación estadística de las diferencias en la biomasa y grosor máximo de las biopelículas se calculó mediante el test paramétrico T de Student o el test no paramétrico U de Mann-Whitney en función de la distribución de los datos. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05 en todos los análisis.

3.3. Métodos de Biología Molecular

3.3.1. PCR (Polimerase Chain Reaction)

El estudio de la presencia de genes codificantes de bombas de expulsión se realizó principalmente por WGS. La presencia o ausencia de los genes *smvA* y *qacEA1* fue confirmada por PCR convencional. Para ello se utilizó la enzima Taq (Invitrogen, EUA) y cebadores específicos de los genes a analizar obtenidos en trabajos anteriores de otros autores (*smvA*) o de diseño propio mediante el programa informático UGene (*qacEA1*)²³⁴.

El protocolo a seguir fue el siguiente:

1. Extracción del ADN de los 17 aislados estudiados y la cepa ATCC® 700603™: resuspender 1 colonia del microorganismo de estudio en 100 µl de agua MilliQ estéril en un eppendorf, hervir a 100°C durante 10 minutos en el termociclador, centrifugar 2 minutos a 13.000 rpm y conservar el sobrenadante.
2. Preparar la mezcla de reactivos de PCR o Master Mix:

Tabla 25. Reactivos y volúmenes para preparación de Master Mix.

Reactivo	Volumen por cada reacción (µl)
Cebador "Forward" [10µM]	2,5
Cebador "Reverse" [10µM]	2,5
MgCl ₂	2
dNTPS	4
Buffer Taq 10X	5
Taq 5 U/µl Invitrogen	0,2
H ₂ O MilliQ estéril	31,8
ADN	2

3. Realización de la PCR :

94°C	-----	5'	} 30 ciclos
94°C	-----	1'	
X°C	-----	1,5'	
72°C	-----	1'	
72°C	-----	5'	

X= 55 para *qacEA1* y 53 para *smvA*.

4. Preparar el gel de agarosa: diluir 4 gr de agarosa en 400 ml de TAE 1X. Hervir, enfriar y añadir 12µl de RedSafe.
5. Electroforesis en gel: cargar 5-10 µl de las muestras y la escalera (Thermo Scientifics, EUA) en los pocillos e iniciar la electroforesis (120-150 voltios durante 1-1,5 horas).
6. Visualización del gel mediante cámara Gel Logic 200 Imaging System (Kodak).

3.3.2. RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

La expresión relativa del gen *mrkA* se estudió mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) usando el sistema LightCycler® 2.0 Instrument (Roche, Suiza). La detección de amplicones se realizó usando SYBR Green I. La cuantificación de los amplicones se realizó mediante el método del “Cycle threshold” (Ct) comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)³¹². Se utilizó el gen *rpoD* como gen endógeno de referencia y la cepa *K. pneumoniae* ATCC® 700603™ como calibrador (expresión establecida como 1)³¹³. El ARN de los aislados de estudio y la cepa control se extrajo por triplicado.

El protocolo que se siguió fue el siguiente (**Figura 16**):

1. Inocular el aislado en 5 ml de LB e incubar en agitación a 37°C O/N.
2. Trasferir 100 µl de cada cultivo en un tubo Falcon con 10 ml de LB.
3. Incubar en agitación a 37°C durante 2-3 horas, hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,5.
4. Centrifugar 1,5 ml en un tubo de 2 ml durante 2 minutos a 13.000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante y conservar el sedimento en hielo hasta que el extractor QIAcube esté programado y preparado.
6. Extracción del ARN mediante QIAcube, utilizando el protocolo “Enzymatic lysis”. Conservar el ARN a 4°C hasta que pueda realizarse el tratamiento con DNasa.
7. Realizar el tratamiento con Dnasa AMBION® Life Technologies.
8. Cuantificar el ARN con el espectrofotómetro Nanodrop® (modelo ND-1000) y diluir a 50 ng/µl.
9. Realizar la PCR de transformación del ARN a ADN complementario (ADNc) mediante el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit” (Roche, Suiza).

25°C	-----	10 min
55°C	-----	30 min
8°C	-----	5 min

10. Diluir el ADNc (1/5).
11. Preparar la mezcla de reactivos de PCR o Master Mix:

Tabla 26. Reactivos y volúmenes para preparación de Master Mix.

Reactivo	Volumen por cada reacción (μl)
Cebador "Forward" [10μM]	0,5
Cebador "Reverse" [10μM]	0,5
LightCycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I (Roche, Suiza)	2
H ₂ O MilliQ estéril	5
ADNc 1/5	2

12. Realizar la qRT-PCR en el termociclador Lightcycler 2.0 Instrument (Roche, Suiza). El programa de la qRT-PCR utilizado es el siguiente:

95°C	-----	10'	} 40 ciclos
95°C	-----	1''	
55°C	-----	5''	
72°C	-----	15''	
95°C	-----	30''	
75°C	-----	15''	
40°C	-----	30''	

La especificidad de los amplicones se determinó mediante la temperatura de fusión o de "melting" (T_m) de los mismos. Los ensayos se realizaron por triplicado en las tres extracciones realizadas.

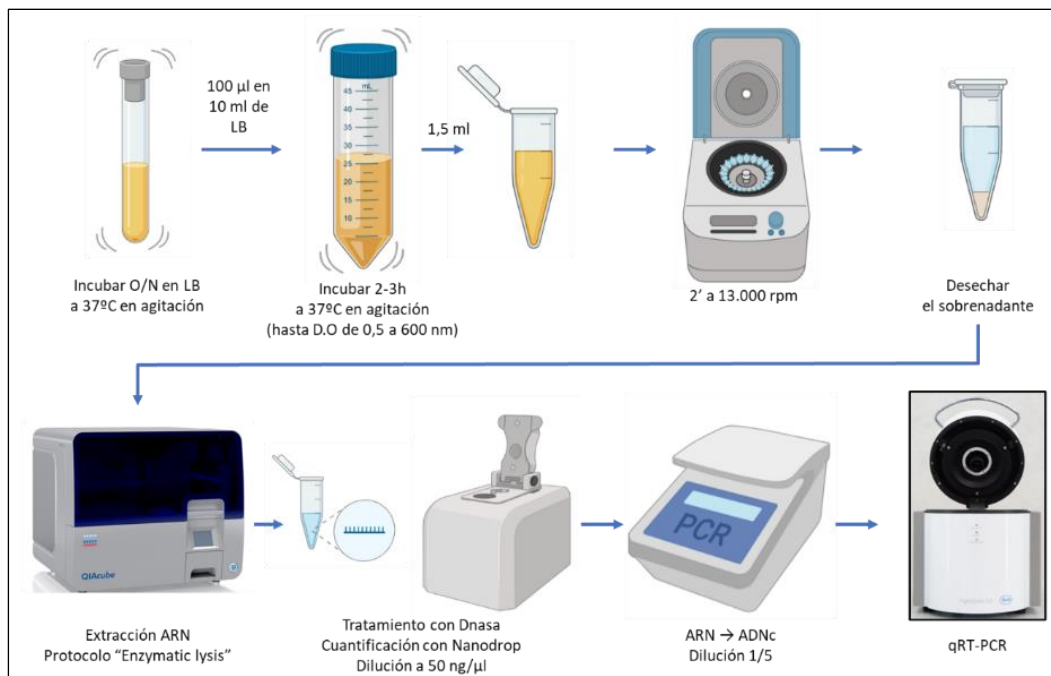


Figura 16. Esquema de la metodología utilizada para la cuantificación de la expresión del gen *mrkA* mediante qRT-PCR. O/N: "over night".

La significación estadística de la asociación entre la expresión relativa de *mrkA* y la capacidad de formación de biopelícula se calculó mediante el coeficiente de correlación de Spearman (test no paramétrico). La significación estadística de la asociación entre la expresión relativa de *mrkA* y las variables cualitativas tipo de clon (bivariante) y carbapenemasa producida (multivariante) se utilizaron los test no paramétricos U de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis, respectivamente. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05 en todos los análisis.

3.3.3. Secuenciación masiva de genomas

3.3.3.1. Extracción del ADN

Con el objetivo de secuenciar el genoma de los aislados de estudio se procedió a la extracción del ADN (250) (Qiagen, Alemania) de forma manual mediante el siguiente protocolo:

1. Sembrar el microorganismo en agar sangre e incubar a 37°C O/N.
2. Resuspender colonias del microorganismo a estudiar (1/2 asa de 100 µl) en 500 ml de solución salina en un eppendorf de 2 ml.
3. Centrifugar 2 minutos a 13.500 rpm.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200 µl de solución de lisis. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
5. Añadir 20 µl de proteinasa K (Qiagen, Alemania) y vortear.
6. Añadir 200 µl de tampón AL (Qiagen, Alemania) y vortear. Incubar a 50°C durante 10 minutos.
7. Agregar 200 µl de etanol (96–100%), y vortear de nuevo.
8. Transferir todo el volumen a la columna de centrifugación DNeasy Mini (Qiagen, Alemania) colocada en un tubo colector de 2 ml.
9. Centrifugar a $\geq 6.000 \times g$ (8.000 rpm) durante 1 minuto. Desechar el tubo colector y el volumen centrifugado.
10. Colocar la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de 2 ml, agregar 500 µl de tampón AW1 (Qiagen, Alemania) y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 6.000 \times g$ (8.000 rpm). Desechar el tubo colector y el volumen centrifugado.
11. Colocar la columna de centrifugación DNeasy Mini en un nuevo tubo de 2 ml, agregar 500 µl de tampón AW2 (Qiagen, Alemania) y centrifugar durante 3 minutos a $20.000 \times g$ (14.000 rpm). Desechar el tubo colector y el volumen centrifugado. Este proceso permite secar la membrana de la columna de centrifugación DNeasy Mini, lo cual es necesario para evitar que el etanol residual pueda interferir con las reacciones posteriores.

12. Retirar la columna de centrifugación DNeasy Mini y colocar en un tubo eppendorf de 1,5 ml.
13. Añadir 50 μ l de tampón AE (Qiagen, Alemania) directamente sobre la membrana Dneasy. Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto y centrifugar durante 1 minuto a $\geq 6.000 \times g$ (8.000 rpm) para eluir el ADN.

3.3.3.2. Preparación de la librería

La preparación de la librería se realizó mediante el kit Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina®, EUA). En este proceso el ADN se fragmenta y etiqueta con adaptadores en una reacción llamada “tagmentación” (**Figura 17**). Posteriormente estos fragmentos son amplificados y se les añaden, secuencias complementarias a los cebadores de secuenciación, los índices de secuenciación (secuencias que identifican los fragmentos pertenecientes a una misma muestra) y los adaptadores comunes (secuencias que permiten que los fragmentos a secuenciar se unan a la superficie de la celda de flujo o “Flow cell”).

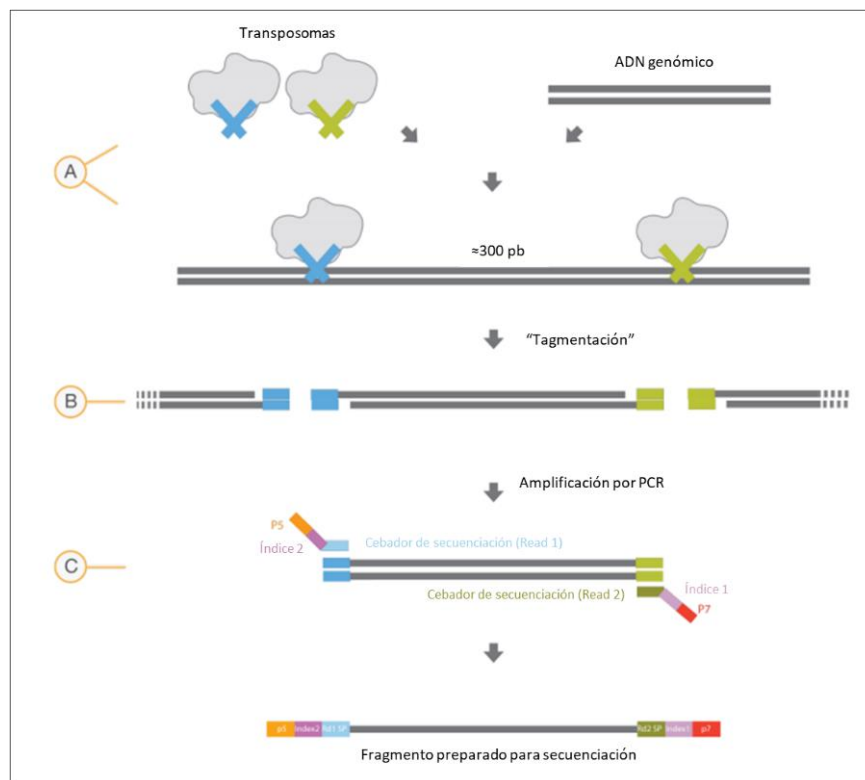


Figura 17. Proceso de fragmentación y “tagmentación” de la librería mediante el kit Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina®, EUA). Adaptado del protocolo de Illumina®.

Para la preparación de la librería que se siguieron los siguientes pasos:

1. Normalización de la cantidad de ADN inicial. Se utiliza el Qubit Fluorometer (Thermo Scientific, EUA) para cuantificar. Se necesita 1 ng de ADN total, 5 µl de ADN a 0,2 ng/µl por muestra.
2. Fragmentación enzimática del ADN y etiquetado o “tagmentación”. En este proceso el ADN es fragmentado y se añaden adaptadores a los fragmentos para etiquetarlos. Para este proceso se necesita el reactivo “Amplicon Tag Mix”, tampón de “tagmentación” (Illumina®, EUA) e incubar 5 minutos a 55°C. Posteriormente se añade tampón neutralizante (Illumina®, EUA), se centrifuga (280 g y 20°C, 1 minuto) y se obtienen 25 µl de ADN fragmentado y neutralizado.
3. Amplificación de la librería y adición de los índices. En este paso se añaden los índices y se amplifican los fragmentos de ADN. Para este proceso se el utiliza el reactivo “Nextera PCR Master Mix” y los índices de secuenciación Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina®, EUA). Amplificar la librería mediante reacción PCR con el siguiente programa:

72°C	-----	3'	} 12 ciclos
95°C	-----	30''	
95°C	-----	10''	
55°C	-----	30''	
72°C	-----	30''	

4. Purificación de la librería. En este paso se utilizan bolitas magnéticas para purificar el ADN de la librería. Para este proceso se necesitan bolitas magnéticas AMPure XP (Beckman Coulter, EUA), etanol al 80% y tampón de resuspensión (Illumina®, EUA). Los productos de PCR del paso anterior se mezclan con las bolitas magnéticas (ratio 3:1). Una placa magnética permite la retirada del sobrenadante y la realización de varios lavados con etanol al 80%. Finalmente, se resuspende el ADN y se transfiere el sobrenadante a una placa de PCR.
5. Normalización de la librería. En este paso se normaliza la cantidad de cada librería para asegurar una representación equitativa en el pool. Para este proceso se necesita reactivo de normalización de la librería, bolitas magnéticas de normalización de la librería, reactivo de lavado, tampón de normalización (Illumina®, EUA) y NaOH. Los pasos de este proceso son: normalización, lavados y elución.
6. Dilución de la librería a la concentración adecuada para la secuenciación. Añadir volúmenes iguales (5µl) de la librería normalizada (4 nM) en un mismo tubo eppendorf LoBind® (Eppendorf, Alemania). Diluir a 15 pM en tampón de hibridación (Illumina®,

EUA) y desnaturalizar el pool incubando a 95°C durante 2 minutos. Finalmente, el pool se carga en el cartucho MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina®, EUA).

3.3.3.3. Secuenciación de genomas completos

Se utilizó el equipo MiSeq™ (Illumina®, EUA) una plataforma integrada que permite la generación de “clusters” y amplificación del material a secuenciar, secuenciación de ADN por síntesis y análisis de los datos.

1. Generación de “clusters”: en este paso cada fragmento de ADN se amplifica en una reacción isotérmica en la celda de flujo o “Flow cell” del secuenciador MiSeq™ (Illumina®, EUA). La “Flow cell” consiste en una cámara o portaobjetos hueco, con múltiples canales recubiertos con dos tipos de oligonucleótidos complementarios a los adaptadores de los fragmentos de ADN. Los fragmentos de ADN hibridan por un extremo con un tipo de oligonucleótido de la superficie de la “Flow cell”, posteriormente una polimerasa genera la secuencia complementaria al fragmento adherido, generando una molécula de doble cadena. Esta molécula se desnaturaliza y el fragmento original es eliminado.
2. Amplificación de “clusters”: los fragmentos de ADN adheridos a la superficie de la “Flow cell” se amplifican mediante “amplificación puente”. La hebra se pliega y la región adaptadora del extremo que previamente había quedado libre hibrida con el otro tipo de oligonucleótido de la superficie de la “Flow cell”. La polimerasa sintetiza la cadena complementaria formando un puente de doble cadena, que se desnaturaliza obteniendo dos cadenas adheridas a la superficie de la “Flow cell”. Este proceso se repite múltiples veces de forma simultánea para todos los fragmentos de la “Flow cell”, obteniéndose la amplificación clonal de todos los fragmentos. Finalmente se eliminan las copias complementarias, generándose agrupaciones con múltiples copias del fragmento a secuenciar.
3. Secuenciación del genoma: la secuenciación se realiza por síntesis con nucleótidos marcados con 4 fluorocromos diferentes y terminadores reversibles. La secuenciación por síntesis se inicia al añadirse el primer nucleótido tras el cebador de secuenciación. En cada ciclo se añade un único nucleótido marcado fluorescentemente a la secuencia de síntesis. Tras cada ciclo los clústeres son estimulados por un láser y estos emiten una señal característica para cada nucleótido añadido. Cada clúster emite la misma señal en cada ciclo y millones de clúster son analizados en paralelo. Tras completarse la primera lectura (read) (es decir, una vez se ha sintetizado y leído toda la molécula complementaria a la que está adherida a la “Flow cell”), la molécula sintetizada es eliminada. A continuación, se añade el cebador del índice 1, se hibrida a la molécula de ADN diana y se genera una lectura que identifica a qué

muestra pertenece ese fragmento. Posteriormente se elimina la secuencia sintetizada lo que libera el extremo 3' de la molécula diana, lo que permite que se doble y se una por el extremo libre al segundo oligonucleótido de la "Flow cell". Tras esto, se añade el cebador del segundo índice, se lee de la misma forma que el primero, se elimina y una polimerasa sintetiza la cadena complementaria. Tras eliminarse la molécula original el proceso vuelve a realizarse con la cadena complementaria (**Figura 18**).

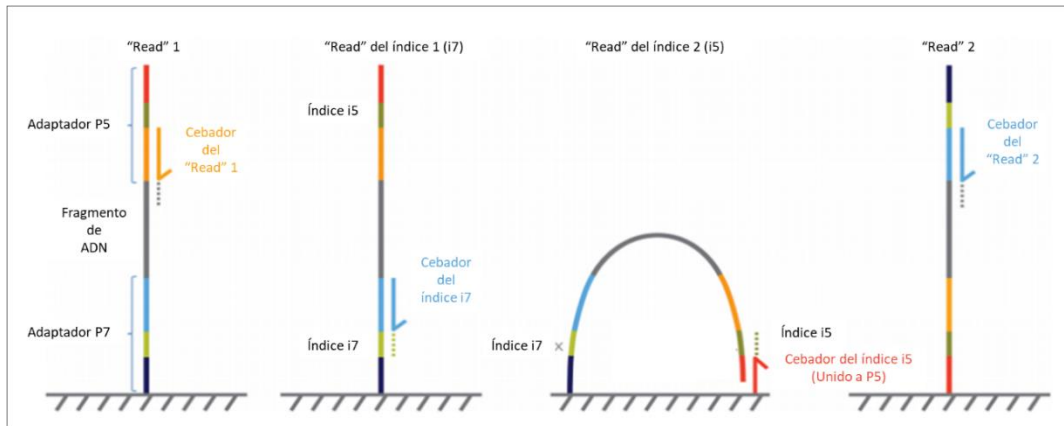


Figura 18. Secuenciación "paired-end". Adaptado del protocolo de Illumina®.

3.3.3.4. Análisis de datos

Durante la secuenciación el software de análisis MiSeq Reporter (Illumina®, EUA) filtra los datos en tiempo real y realiza estimaciones estadísticas que miden la calidad de los datos. Las estimaciones estadísticas incluidas en el informe de calidad son:

- "Clusters" que pasan el filtro. El software calcula el porcentaje de "cluster" que tienen la calidad suficiente para ser incluidos. Para ello divide el valor de señal con mayor intensidad de cada ciclo entre la suma de los dos valores con mayor intensidad de cada ciclo. Los "clusters" superan el filtro cuando no más de 1 llamada de bases o "base call" en los primeros 25 ciclos presenta una relación de $<0,6$.
- Niveles de calidad: los Q-score, calculan la probabilidad de error en la lectura de las bases incorporadas en la secuencia.
- Valores de fase y prefase: indica cuantas hebras pueden haberse desfasado en la síntesis, es decir han incorporado una base más o menos en un ciclo y se ha desfasado la lectura.

El software realiza un análisis secundario que incluye el "demultiplexado", la eliminación de los adaptadores y la generación de archivos FASTq.

- El “demultiplexado” permite la separación de los datos de cada una de las muestras de la librería basándose en los índices asignados y que se han indicado en una hoja de cálculo.
- La eliminación de las secuencias del adaptador del extremo 3’ o trimeado, evita que estas secuencias interfieran con la alineación de las lecturas.
- Los archivos Fastq, contienen las lecturas no indexadas para cada muestra y sus q-scores, excluyendo las lecturas identificadas como controles y aquellas no pasaron el filtro. Cada archivo Fastq contiene lecturas de una única muestra, el nombre de la cual se incluye en el nombre del archivo.

3.3.3.5. Ensamblado de secuencias de ADN

El CLC Genomics Workbench (CLC bio, Dinamarca) es un programa informático con múltiples aplicaciones que permite entre otras funciones, la generación de informes de calidad de los datos de secuenciación y el ensamblado *de novo* de los datos generados por secuenciación masiva.

El informe de calidad de los datos de secuenciación evalúa entre otros parámetros, número y longitud de las lecturas, el “coverage” de las bases, las ambigüedades de base y la distribución porcentual de contenido de GC en secuencia. Esta información permite evaluar la calidad de los datos obtenidos antes de proceder al ensamblado.

El proceso de ensamblado *de novo* de las secuencias tiene dos etapas:

1. Generación de secuencias “contig” simples. Para ello las secuencias generadas por WGS se dividen en fragmentos más cortos con el mismo número de bases o k -meros, siendo k la longitud de la secuencia. Posteriormente, se buscan fragmentos que coincidan en $k-1$ bases con el primero, y se van ensamblando utilizando los gráficos de Bruijn. Esta es la parte real *de novo* del proceso.
2. Alineación de todas las lecturas obtenidas mediante WGS utilizando los “contigs” simples como referencia.

La siguiente figura (**Figura 19**) muestra un esquema de la tecnología de secuenciación de Illumina®.

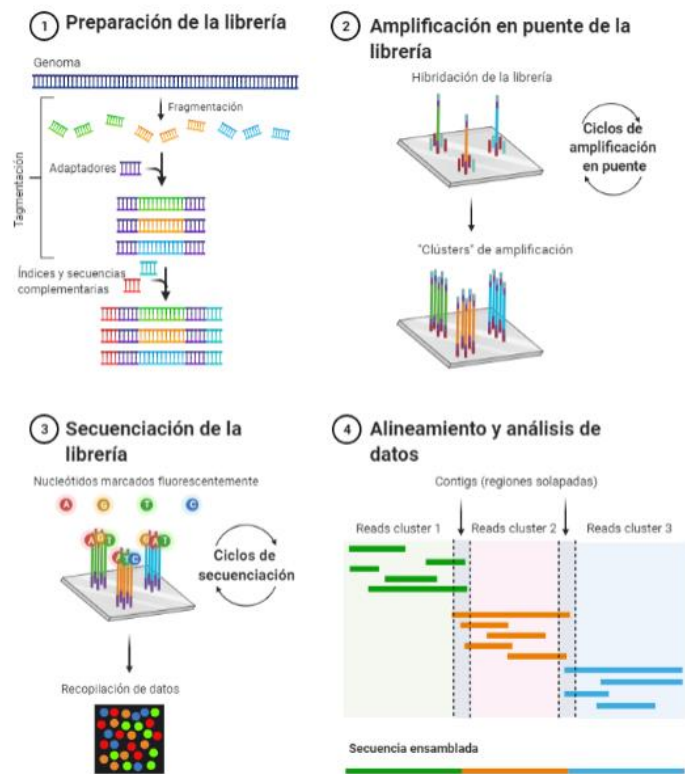


Figura 19. Secuenciación mediante MiSeq (Illumina®). Adaptado de plantilla de BioRender.com.

3.3.4. Anotación de genes: tipado molecular, resistoma y anotación de genes

3.3.4.1. Tipado molecular y resistoma

El tipado y el resistoma se obtuvieron de forma automatizada usando los servidores MLSTFinder 2.0.4 y ResFinder 3.2 del "Center for Genomic Epidemiology", disponibles en <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/> y <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>, respectivamente.

3.3.4.2. Anotación automática de genoma completo

La anotación inicial de los genomas se realizó mediante el servidor en línea automático RAST (Rapid Annotation using subsystem Technology) disponible en <https://rast.nmpdr.org/>. El sistema identifica genes codificantes de proteínas, rRNA y tRNA, asigna funciones a los genes y predice los subsistemas representados en el genoma. Para ello el sistema tras identificar los genes que codifican rRNA y tRNA, realiza una primera búsqueda para detectar secuencias que correspondan a posibles genes. Tras esto, selecciona un conjunto de secuencias que correspondan a probables genes representativos y universales (por ejemplo, las tRNA sintetasas) y busca, en una base de datos que ha sido revisada manualmente por expertos, las secuencias filogenéticamente más cercanas. Posteriormente busca en la secuencia problema los genes de

los subsistemas presentes en las secuencias filogenéticamente cercanas. Tras esto, el sistema trata de anotar los genes probables que no han sido identificados. Finalmente, el servidor permite la visualización o descarga del genoma anotado en diferentes formatos (GenBank, FAST, Excel...).

3.3.4.3. Anotación manual de genes

Para confirmar la anotación automática de RAST o realizar anotaciones adicionales se procedió a la anotación manual:

1. Obtención de las secuencias de los genes en bases de datos como UniProt o NCBI, disponibles en <https://www.uniprot.org/> y <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> respectivamente.
2. Búsqueda de las secuencias mediante el programa informático Unipro UGene v1.31.1.
3. Alineamiento de la secuencia de referencia y la de los aislados de estudio mediante el servidor en línea Clustal Omega v2.0.12 disponible en <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>.

La significación estadística de la asociación entre presencia de genes de bombas de expulsión y los valores de CMI de los biocidas o el tipo de clon (epidémico o no epidémico) calculó mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Se utilizó un nivel de significación estadística de 0,05.

4. Resultados

4.1. Caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa

4.1.1. Tipado molecular, actividad *in vitro* de carbapenémicos y resistoma

Como se aprecia en la **Tabla 27**, 11 aislados (65%) pertenecen a clones epidémicos y 6 aislados (35%) a clones no epidémicos. Los 17 aislados pertenecen a 14 secuenciotipos (ST) diferentes. Cada secuenciotipo está representado por 1 aislado, a excepción del ST11, representado por 3 aislados, y el ST15 representado por 2 aislados. Respecto al tipo de carbapenemasa, 10 aislados (59%) producen una carbapenemasa del grupo OXA-48, 4 (23%) producen VIM-1 y 3 (18%) son productores de una carbapenemasa del grupo KPC. Los aislados fueron elegidos para representar los clones y carbapenemasas más prevalentes en España en el momento en que fueron seleccionados³¹⁴.

Los valores de CMI de los carbapenémicos variaron entre >1 y $\leq 0,5$ mg/l para ertapenem, y >8 a ≤ 1 mg/l para imipenem y meropenem (**Tabla 27**). El 94% de los aislados mostraron resistencia a ertapenem, el 24% a imipenem y el 18% a meropenem. Centrándose en el tipo de carbapenemasa (**Tabla 27**), ninguno de los aislados productores de carbapenemasa del grupo OXA-48 fueron resistentes a imipenem, el 10% lo fue a meropenem y el 90% a ertapenem. Todos los aislados productores de VIM-1 fueron resistentes a ertapenem, mientras que el 25% eran resistentes a imipenem y ninguno a meropenem. Todos los aislados productores de carbapenemasa del grupo KPC fueron resistentes a ertapenem e imipenem mientras que solo 2 (67%) lo fueron a meropenem.

Los principales determinantes genéticos de resistencia a antimicrobianos detectados mediante WGS se muestran en la **Tabla 28**. Todos los aislados presentan determinantes relacionados con resistencia a betalactámicos, fluoroquinolonas y fosfomicina; en este último caso el gen *fosA* se detectó en todos los aislados. Los determinantes relacionados con resistencia a sulfametoxazol, aminoglucósidos, cloranfenicol y trimetoprim se detectaron en el 82, 76, 71 y 65% de los aislados respectivamente, siendo estos determinantes genéticos más frecuentes en los aislados epidémicos (91, 91, 82 y 73%, respectivamente) que en los que no epidémicos (67, 50, 50 y 50%, respectivamente). Los determinantes genéticos relacionados con resistencia a tetraciclina se detectaron con menor frecuencia (24%) que los citados anteriormente, y también fueron más frecuentes entre los aislados epidémicos que entre los aislados no epidémicos (36% y 0%, respectivamente).

Las secuencias de los genomas obtenidas mediante WGS se depositaron en NCBI (BioProject PRJNA631892). La identificación a nivel de especie de las secuencias enviadas a la base de datos

Bioproject, se confirma comparando la identidad de nucleótidos promedio entre la secuencia enviada y la de los genomas de cepas de referencia registrados en GenBank. Como resultado de esta prueba, el aislado ST899/OXA-48 fue reclasificado como *K. quasipneumoniae*³¹⁵.

Tabla 27. Sensibilidad a ertapenem, imipenem y meropenem de los 17 aislados de Kp-PC.

Clon/ carbapenemasa	Clon epidémico	ERT		IMP		MEM	
		CMI	C	CMI	C	CMI	C
ST101/KPC-2	Sí	>1	R	>8	R	>8	R
ST258/KPC-3	Sí	>1	R	>8	R	>8	R
ST512/KPC-3	Sí	>1	R	8	R	8	I
ST11/VIM-1	Sí	>1	R	2	S	2	S
ST15/VIM-1	Sí	>1	R	8	R	8	I
ST147/VIM-1	Sí	>1	R	4	I	8	I
ST11/OXA-245	Sí	>1	R	≤1	S	≤1	S
ST11/OXA-48	Sí	≤0,5	S	≤1	S	≤1	S
ST15/OXA-48	Sí	>1	R	4	I	≤1	S
ST37/OXA-48	Sí	>1	R	≤1	S	4	I
ST405/OXA-48	Sí	>1	R	≤1	S	≤1	S
ST340/VIM-1	No	>1	R	2	S	2	S
ST437/OXA-245	No	>1	R	≤1	S	≤1	S
ST13/OXA-48	No	>1	R	2	S	≤1	S
ST16/OXA-48	No	>1	R	≤1	S	≤1	S
ST846/OXA-48	No	>1	R	4	I	>8	R
ST899/OXA-48	No	>1	R	2	S	2	S

ERT: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, CMI: concentración mínima inhibitoria (mg/l), C: categoría clínica según los puntos de corte de EUCAST v.12, S: sensible a dosis estándar, I: sensible cuando se incrementa la exposición (dosis altas), R: resistente. Para MEM se han utilizado los puntos de corte clínicos para infecciones diferentes a meningitis (S ≤ 2 y R >8)³⁰¹.

Tabla 28. Determinantes de resistencia adquirida detectados mediante WGS de los 17 aislados de Kp-PC.

Clon/ carbapenemasa	Clon epidémico	AG	BL	FQ*	FOS*	PHE	SUL	TET	SXT
ST101/KPC-2	Sí	<i>aac(3)-IId, aac(6')-Ib aadA1, strA, strB</i>	<i>bla_{OXA-9}, bla_{TEM-1A}, bla_{CTX-M-15}, bla_{KPC-2}, bla_{SHV-11}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>catA2</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(D)</i>	<i>dfrA14</i>
ST258/KPC-3	Sí	<i>aph(3')-Ia, aac(6')-Ib, aadA2</i>	<i>bla_{OXA-9}, bla_{TEM-1A}, bla_{SHV-11}, bla_{KPC-3}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	NSD	<i>dfrA12</i>
ST512/KPC-3	Sí	<i>aac(6')-Ib, aadA2, aph(3')-Ia</i>	<i>bla_{OXA-9}, bla_{KPC-3}, bla_{SHV-11}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	NSD	<i>dfrA12</i>
ST11/VIM-1	Sí	<i>aac(3)-Iia, aadA1, aph(3')-Ia, strA, strB</i>	<i>bla_{SHV-11}, bla_{OXA-1}, bla_{CTX-M-15}, bla_{VIM-1}, bla_{TEM-1B}</i>	<i>oqxA, oqxB, QnrB1</i>	<i>fosA</i>	<i>catA1, catA2, catB2, catB4</i>	<i>sul1, sul2</i>	NSD	<i>dfrB1</i>
ST15/VIM-1	Sí	<i>aac(3)-Ila, aac(3)-Iid, aac(6')-Ib3, aadA1, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id</i>	<i>bla_{SCO-1}, bla_{OXA-9}, bla_{SHV-2}, bla_{VIM-1}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>catA1, catB2</i>	<i>sul1, sul2</i>	NSD	<i>dfrA14, dfrB1</i>
ST147/VIM-1	Sí	<i>aacA4, aadA8</i>	<i>bla_{CTX-M-9}, bla_{VIM-1}, bla_{SHV-12}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB, QnrA1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB2</i>	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA14, dfrB1</i>
ST11/OXA-245	Sí	<i>aac(6')Ib-cr, strA strB</i>	<i>bla_{TEM-1B}, bla_{OXA-245}, bla_{CTX-M-15}, bla_{SHV- 1}, bla_{OXA-1}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB, QnrB1</i>	<i>fosA</i>	<i>catA2, catB4</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(D)</i>	NSD
ST11/OXA-48	Sí	<i>aph(3')-Ia, aadA2</i>	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV-11}, bla_{CTX-M-15}</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>catA1</i>	<i>sul1</i>	NSD	<i>dfrA12</i>
ST15/OXA-48	Sí	<i>strA, strB</i>	<i>bla_{CTX-M-15}, bla_{SHV-2B}, bla_{OXA-48}, bla_{TEM- 1B}</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	NSD	<i>sul2</i>	NSD	NSD
ST37/OXA-48	Sí	NSD	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV-11}</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	NSD	NSD	NSD	NSD
ST405/OXA-48	Sí	<i>aac(3)-Ila, aac(6')Ib-cr, strA, strB</i>	<i>bla_{OXA-48}, bla_{CTX-M-15}, bla_{TEM-1B}, bla_{OXA- 1}, bla_{SHV-76}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB, QnrB66,</i>	<i>fosA</i>	<i>catB4</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	<i>dfrA14</i>
ST340/VIM-1	No	<i>aacA4, aadA1, aadA2, aph(3')- Ia, strA, strB</i>	<i>bla_{VIM-1}, bla_{TEM-30}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>catA1, catB2</i>	<i>sul1, sul2</i>	NSD	<i>dfrA12, dfrB1, dfrA14</i>
ST437/OXA-245	No	NSD	<i>bla_{OXA-245}, bla_{CMY-2}, bla_{SHV-11}</i>	<i>oqxA, oqxB, QnrB52</i>	<i>fosA</i>	NSD	<i>sul1</i>	NSD	NSD
ST13/OXA-48	No	NSD	<i>bla_{OXA-48}, bla_{SHV-101}</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	NSD	NSD	NSD	NSD
ST16/OXA-48	No	<i>aac(6')Ib-cr, aadA2, aph(3')-Ia</i>	<i>bla_{OXA-48}, bla_{CTX-M-15}, bla_{SHV-1}, bla_{OXA-1}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>catB4</i>	<i>sul1</i>	NSD	<i>dfrA12</i>
ST846/OXA-48	No	<i>aac(3)-Iia, aac(6')-Ib-cr, aph(3'')- Ib, aph(6)-Id</i>	<i>bla_{OXA-48}, bla_{TEM-1B}, bla_{CTX-M-15}, bla_{OXA- 1}, bla_{SHV-26}</i>	<i>aac(6')Ib-cr, oqxA, oqxB, qnrB1</i>	<i>fosA</i>	<i>catB3, catB3</i>	<i>sul2</i>	NSD	<i>dfrA14</i>
ST899/OXA-48	No	NSD	<i>bla_{OKP-A-5}, bla_{OXA-48}</i>	<i>oqxA, oqxB</i>	<i>fosA</i>	NSD	NSD	NSD	NSD

AG: aminoglucósidos, BL: betalactámicos, FQ: fluoroquinolonas, FOS: fosfomicina, PHE: cloranfenicol, SUL: sulfametoxazol, TET: tetraciclina, SXT: trimetoprim, NSD: no se detectan. * *oqxA*, *oqxB* y *fosA*, se han descrito en el cromosoma de *K. pneumoniae* y en plásmidos transmisibles a otras especies bacterianas³.

4.2. Capítulo 1

4.2.1. Actividad *in vitro* de biocidas

4.2.1.1. Actividad *in vitro* de biocidas en MHB

En la **Tabla 29** se muestran las medianas de las CMI de los 7 biocidas testados frente a 17 aislados de Kp-PC analizados en MHB, obtenidos en 3 experimentos independientes. En general, los valores de CMI obtenidos a 25°C fueron iguales o ligeramente inferiores que los determinados a 37°C. Los rangos de CMI (mg/l) de los biocidas analizados a 25°C fueron 1,9-0,05 (triclosán), 9,8-2,4 (digluconato de clorhexidina), 31,2-7,8 (cloruro de benzalconio), 35,6-4,5 (etanol), 1.094-547 (hipoclorito de sodio), 3.125-1.562 (povidona yodada) y 106.250-26.562 (solución hidroalcohólica). Las CMI de los biocidas analizados a 37°C fueron 1.094 para el hipoclorito sódico, mientras que para los demás biocidas variaron entre 1,9-0,1 (triclosán), 19,5-1,2 (digluconato de clorhexidina), 15,6-7,8 (cloruro de benzalconio), 35,6-4,5 (etanol), 3.125-1.562 (povidona yodada) y 53.125-26.562 (solución hidroalcohólica).

4.2.1.2. Actividad *in vitro* de biocidas en medio mínimo M9

En la **Tabla 30** se muestran las medianas de las CMI de los 7 biocidas evaluados frente a 17 aislados de Kp-PC analizados en caldo mínimo M9, obtenidos en 3 experimentos independientes. En general, los valores de CMI obtenidos a 25°C fueron iguales o ligeramente inferiores que los determinados a 37°C. Los valores de CMI (mg/l) de los biocidas analizados obtenidos a 25°C fueron 0,1 para cloruro de benzalconio, mientras que para los demás biocidas variaron entre 0,08-0,04 (digluconato de clorhexidina), 1-0,5 (hipoclorito sódico), 1,9-0,05 (triclosán), 0,28-0,07 (etanol), 24,4-6,1 (povidona yodada) y 207,5-52 (solución hidroalcohólica). Los valores de CMI de los biocidas analizados a 37°C fueron de 1 para el hipoclorito sódico, mientras que para el resto oscilaron entre 0,08-0,04 (digluconato de clorhexidina), 0,2-0,1 (cloruro de benzalconio), 0,28-0,07 (etanol), 1,9-0,1 (triclosán), 24,4-12,2 (povidona yodada) y 830-104 (solución hidroalcohólica).

Tabla 29. Medianas de los valores de CMI de los biocidas analizados en caldo Mueller Hinton (MHB) a 25 y 37°C frente a 17 aislados de Kp-PC.

Clon/carbapenemasa	Valores de CMI (mg/l) en MHB													
	Solución hidroalcohólica (Sterillium®)		Povidona yodada (Betadine®)		Hipoclorito sódico		Digluconato de clorhexidina		Cloruro de benzalconio		Etanol		Triclosán	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
ST101/KPC-2	53.125	53.125	1.562	1.562	1.094	1.094	9,8	19,5	7,8	7,8	8,9	8,9	0,3	0,5
ST258/KPC-3	53.125	53.125	3.125	3.125	1.094	1.094	4,9	4,9	7,8	7,8	8,9	8,9	0,5	1,9
ST512/KPC-3	53.125	26.562	3.125	1.562	1.094	1.094	4,9	19,5	7,8	7,8	8,9	8,9	0,3	0,5
ST11/VIM-1	53.125	53.125	1.562	1.562	547	1.094	9,8	19,5	31,2	15,6	35,6	17,8	0,3	0,5
ST15/VIM-1	53.125	53.125	1.562	1.562	547	1.094	2,4	2,4	15,6	15,6	8,9	8,9	0,05	0,3
ST147/VIM-1	53.125	26.562	1.562	3.125	1.094	1.094	4,9	4,9	15,6	15,6	17,8	17,8	1,9	1,9
ST11/OXA-245	53.125	26.562	1.562	3.125	547	1.094	4,9	9,8	7,8	7,8	17,8	8,9	0,5	0,5
ST11/OXA-48	53.125	53.125	1.562	3.125	1.094	1.094	4,9	4,9	7,8	7,8	17,8	8,9	0,5	0,5
ST15/OXA-48	106.250	53.125	3.125	3.125	1.094	1.094	4,9	1,2	7,8	7,8	17,8	8,9	0,5	0,5
ST37/OXA-48	53.125	26.562	3.125	3.125	1.094	1.094	2,4	4,9	15,6	7,8	8,9	8,9	0,1	0,3
ST405/OXA-48	53.125	53.125	1.562	1.562	547	1.094	4,9	19,5	7,8	7,8	8,9	8,9	0,5	0,5
ST340/VIM-1	53.125	53.125	3.125	3.125	1.094	1.094	4,9	19,5	15,6	7,8	8,9	8,9	0,5	0,9
ST437/OXA-245	26.562	26.562	1.562	1.562	547	1.094	2,4	9,8	7,8	7,8	17,8	8,9	0,9	0,9
ST13/OXA-48	53.125	53.125	1.562	3.125	1.094	1.094	4,9	19,5	7,8	7,8	8,9	8,9	0,3	0,5
ST16/OXA-48	53.125	53.125	1.562	3.125	1.094	1.094	4,9	19,5	7,8	7,8	17,8	8,9	0,5	0,5
ST846/OXA-48	53.125	53.125	1.562	3.125	1.094	1.094	4,9	19,5	15,6	15,6	17,8	35,6	0,5	1,9
ST899/OXA-48	53.125	26.562	1.562	3.125	1.094	1.094	9,8	9,8	7,8	7,8	4,5	4,5	0,1	0,1

En negrita, valores de CMI que presentan ± 2 diluciones de diferencia entre las dos temperaturas analizadas.

Tabla 30. Medianas de los valores de CMI de los biocidas analizados en caldo medio mínimo M9 a 25 y 37°C frente a 17 aislados de Kp-PC.

Clon/carbapenemasa	Valores de CMI (mg/l) en medio mínimo M9													
	Solución hidroalcohólica (Sterillium®)		Povidona yodada (Betadine®)		Hipoclorito sódico		Digluconato de clorhexidina		Cloruro de benzalconio		Etanol		Triclosán	
	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C	25°C	37°C
ST101/KPC-2	52	207,5	12,2	12,2	1	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	0,1	0,3
ST258/KPC-3	52	207,5	6,1	12,2	1	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,07	0,14	0,9	1,9
ST512/KPC-3	104	207,5	12,2	12,2	1	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,07	0,14	0,5	0,9
ST11/VIM-1	104	104	6,1	12,2	1	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	0,3	0,3
ST15/VIM-1	104	104	6,1	12,2	0,5	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	0,3	0,1
ST147/VIM-1	104	104	6,1	12,2	0,5	1	0,08	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	1,9	1,9
ST11/OXA-245	104	207,5	6,1	12,2	1	1	0,04	0,08	0,1	0,2	0,14	0,14	0,5	0,5
ST11/OXA-48	104	207,5	12,2	24,4	0,5	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,28	0,14	0,5	0,5
ST15/OXA-48	52	104	6,1	12,2	0,5	1	0,04	0,04	0,1	0,1	0,07	0,07	0,3	0,5
ST37/OXA-48	104	207,5	12,2	12,2	1	1	0,08	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	0,05	0,1
ST405/OXA-48	207,5	415	12,2	24,4	1	1	0,04	0,08	0,1	0,2	0,28	0,28	0,1	0,1
ST340/VIM-1	207,5	207,5	12,2	24,4	1	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	0,9	1,9
ST437/OXA-245	104	104	12,2	12,2	0,5	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,07	0,14	0,9	1,9
ST13/OXA-48	104	207,5	6,1	24,4	0,5	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,07	0,07	0,05	0,1
ST16/OXA-48	104	104	12,2	12,2	0,5	1	0,08	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	0,5	0,5
ST846/OXA-48	207,5	830	24,4	24,4	0,5	1	0,04	0,08	0,1	0,2	0,28	0,28	0,3	0,9
ST899/OXA-48	104	207,5	12,2	24,4	1	1	0,04	0,08	0,1	0,1	0,14	0,14	0,05	0,1

En negrita, valores de CMI que presentan ± 2 diluciones de diferencia entre las dos temperaturas analizadas.

4.2.1.3. Efecto de la temperatura en los valores de CMI

Las medias de los valores de CMI determinados a 37°C fueron significativamente superiores que las determinadas a 25°C, excepto para cloruro de benzalconio, etanol y triclosán, para los cuales las diferencias no fueron estadísticamente significativas y solución hidroalcohólica en MHB (Tabla 31).

Teniendo en cuenta el número de diluciones de diferencia en lugar de las medias de los valores de CMI, se observó que las diferencias no superan ± 1 diluciones, a excepción de los valores de CMI de digluconato de clorhexidina y triclosán determinados en MHB (47% y 18% de los aislados respectivamente), y para la solución hidroalcohólica, triclosán y povidona yodada en M9 (18%, 12% y 6% de los aislados respectivamente). En estos casos se observaron diferencias de ± 2 diluciones entre las dos temperaturas analizadas en algunos aislados, siendo generalmente superiores los valores de CMI determinados a 37°C (Tablas 29 y 30).

4.2.1.4. Efecto del medio de cultivo en los valores de CMI

Con respecto al tipo de medio de cultivo utilizado (MHB o M9), se observaron diferencias significativas en todos los biocidas analizados, siendo las medias de los valores de CMI determinados en MHB mayores que las determinadas en M9 ($p \leq 0,05$), excepto para triclosán, para el que se obtuvieron medias de los valores de CMI de 0,7 en ambos medios de cultivo a 37°C ($p=0,47$) y 0,5 en ambos medios de cultivo a 25°C ($p=0,55$) (Tabla 31).

Teniendo en cuenta el número de diluciones de diferencia en lugar de las medias de los valores de CMI, se observó que las diferencias superaron las ± 1 diluciones de diferencia en todos los biocidas estudiados (siendo superiores en MHB), excepto para triclosán en el que esta diferencia únicamente se observó en con los aislados ST405/OXA-48 y ST13/OXA-48 (Tablas 29 y 30).

Tabla 31. Media de los valores de CMI de biocidas de los 17 aislados de Kp-PC en las diferentes condiciones analizadas.

Biocida	Medias de la CMI (valor de <i>p</i>)			
	MHB, 25°C/ MHB, 37°C	M9, 25°C/ M9, 37°C	MHB, 25°C/ M9, 25°C	MHB, 37°C/ M9, 37°C
Solución hidroalcohólica	54.688/43.750 (0,02)	113/220 (<0,01)	54.688/113 (<0,01)	43.750/220 (<0,01)
Povidona yodada	2.022/2.574 (0,04)	10,4/16,5 (<0,01)	2.022/10,4 (<0,01)	2.574/16,5 (<0,01)
Hipoclorito sódico	933/1.094 (0,02)	0,8/1,1 (<0,01)	933/0,8 (<0,01)	1.094/1,1 (<0,01)
Digluconato de clorhexidina	5,3/12,3 (<0,01)	0,04/0,07 (<0,01)	5,3/0,04 (<0,01)	12,3/0,07 (<0,01)
Cloruro de benzalconio	11,5/9,7 (0,41)	0,1/0,1 (0,07)	11,5/0,1 (<0,01)	9,7/0,1 (<0,01)
Etanol	13,9/11,3 (0,14)	0,1/0,1 (0,54)	13,9/0,1 (<0,01)	11,3/0,1 (<0,01)
Triclosán	0,5/0,7 (0,08)	0,5/0,7 (0,23)	0,5/0,5 (0,55)	0,7/0,7 (0,47)

En negrita se indican las diferencias estadísticamente significativas.

4.2.1.5. Asociación de la actividad *in vitro* de los biocidas con el tipo de clon (epidémico o no epidémico) y el tipo de carbapenemasa

No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de CMI de los biocidas evaluados entre los aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos y los aislados de Kp-CP pertenecientes a clones no epidémicos, en ninguna de las condiciones analizadas (**Tabla 32**).

Respecto al tipo de carbapenemasa producida, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas, excepto para los aislados productores de VIM-1 en los que las medias de los valores de CMI de cloruro de benzalconio determinados en MHB (19,5 a 25°C y 13,7 a 37°C) eran superiores a las de los aislados productores de carbapenemasas del grupo OXA-48 a ambas temperaturas (9,4 a 25°C y 8,6 a 37°C; $p=0,01$ y $p=0,02$ respectivamente), y que a la de los aislados productores de carbapenemasas del grupo KPC a 25°C (7,8 a 25°C y 37°C; $p=0,02$ y $p=0,07$ respectivamente).

Tabla 32. Media de los valores de CMI de los biocidas evaluados frente a aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos y aislados pertenecientes a clones no epidémicos.

Biocida	Media de CMI clones epidémicos/ media de CMI clones no epidémicos (valor de <i>p</i>)			
	MHB, 25°C	MHB, 37°C	M9, 25°C	M9, 37°C
Solución hidroalcohólica	57.955/48.698 (0,15)	43.466/44.271 (0,90)	99/138 (0,10)	189/277 (0,74)
Povidona yodada	2.131/1.823 (0,41)	2.415/2.865 (0,25)	8,9/13,2 (0,09)	14,4/20,3 (0,06)
Hipoclorito sódico	895/1.003 (0,41)	1.094/1.094 (1)	0,9/0,7 (0,30)	1,1/1,1 (1)
Digluconato de clorhexidina	5,3/5,3 (1)	10,1/16,3 (0,09)	0,05/0,04 (0,94)	0,07/0,08 (0,46)
Cloruro de benzalconio	12,1/10,4 (0,81)	9,9/9,1 (0,63)	0,1/0,1 (1)	0,1/0,1 (0,94)
Etanol	14,6/12,6 (0,74)	10,5/12,6 (0,59)	0,15/0,14 (0,83)	0,15/0,15 (1)
Triclosán	0,5/0,4 (0,63)	0,7/0,8 (0,51)	0,5/0,4 (0,88)	0,6/0,9 (0,61)

4.2.2. Curvas de crecimiento en MHB y M9 a 25 y 37°C

Para comprobar la capacidad de crecimiento de los 17 aislados de Kp-PC en las 4 condiciones de estudio (25 o 37°C en MHB y 25 o 37°C en M9) se realizaron curvas de crecimiento (**Figura 20**).

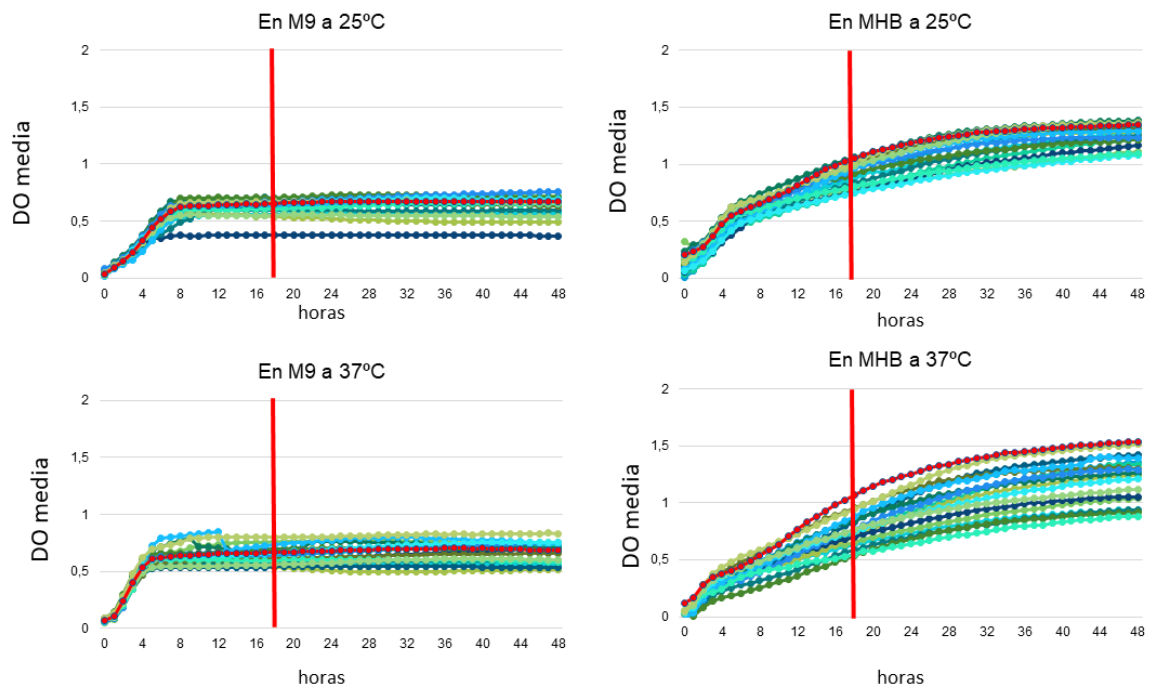


Figura 20. Curvas de crecimiento de 17 aislados de Kp-PC (en diferentes tonos de azul y verde) y del aislado de control (ATCC® 700603™, en rojo) en las 4 condiciones de temperatura y medio de cultivo estudiadas. La línea vertical roja marca las 18h, momento en el que se realiza la lectura del valor de CMI.

A partir de los resultados obtenidos se calculó la tasa de crecimiento intrínseco (r) y el tiempo de generación (t_{gen}).

Respecto al efecto de temperatura sobre la tasa de crecimiento intrínseco (r), en MHB se obtuvieron valores ligeramente superiores a 25°C que a 37°C ($p \leq 0,01$) mientras que en M9 los valores fueron inferiores a 25°C que a 37°C ($p \leq 0,01$) (**Tabla 33**). Respecto al efecto del medio de cultivo, en MHB se obtuvieron valores inferiores a los obtenidos en M9 en ambas temperaturas ($p \leq 0,01$) (**Tabla 33 y Figura 21**).

También se calculó el tiempo de generación (t_{gen}) en las 4 condiciones analizadas. Respecto al efecto de la temperatura, en M9 se obtuvieron valores superiores a 25°C que a 37°C ($p < 0,01$) mientras que en MHB no se observan diferencias significativas ($p = 0,08$). Respecto al efecto del medio de cultivo, los valores obtenidos en MHB fueron mayores que los obtenidos en M9 ($p \leq 0,01$) en ambas temperaturas (**Tabla 34 y Figura 22**).

Tabla 33. Tasa de crecimiento intrínseco (r ; horas⁻¹) en MHB y M9, a 25°C y 37°C, de los 17 aislados de Kp-PC.

Aislado/ carbapenemasa	MHB				M9			
	25°C		37°C		25°C		37°C	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
ST101/KPC-2	0,12	0,01	0,14	0,01	1,04	0,07	0,97	0,01
ST258/KPC-3	0,14	0,01	0,10	0,01	0,62	0,01	1,45	0,06
ST512/KPC-3	0,15	0,01	0,13	0,01	0,70	0,04	1,11	0,03
ST11/VIM-1	0,12	0,01	0,12	0,00	0,55	0,02	1,22	0,06
ST15/VIM-1	0,12	0,02	0,13	0,00	0,69	0,03	1,46	0,07
ST147/VIM-1	0,14	0,02	0,13	0,01	0,70	0,02	1,41	0,06
ST11/OXA-245	0,12	0,01	0,11	0,00	0,60	0,02	1,17	0,06
ST11/OXA-48	0,13	0,00	0,11	0,01	0,64	0,01	0,89	0,01
ST15/OXA-48	0,16	0,01	0,14	0,01	0,61	0,04	1,14	0,39
ST37/OXA-48	0,15	0,01	0,12	0,01	0,73	0,01	0,94	0,19
ST405/OXA-48	0,13	0,01	0,12	0,00	0,69	0,01	1,36	0,05
ST340/VIM-1	0,15	0,01	0,13	0,00	0,74	0,02	1,26	0,11
ST437/OXA-245	0,14	0,00	0,11	0,00	0,54	0,02	0,82	0,16
ST13/OXA-48	0,16	0,01	0,15	0,01	0,76	0,04	1,00	0,07
ST16/OXA-48	0,16	0,02	0,11	0,00	1,04	0,07	2,11	0,06
ST846/OXA-48	0,16	0,01	0,14	0,01	0,78	0,05	1,30	0,17
ST899/OXA-48	0,14	0,00	0,13	0,00	0,82	0,03	1,23	0,07
ATCC® 700603™	0,18	0,02	0,16	0,02	0,70	0,03	1,06	0,01

DE: desviación estándar.

Tabla 34. Tiempo de generación (t_{gen} ; h) en MHB y M9, a 25°C y 37°C, de los 17 aislados de Kp-PC.

Aislado/ carbapenemasa	MHB				M9			
	25°C		37°C		25°C		37°C	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
ST101/KPC-2	5,67	0,30	5,08	0,48	0,67	0,05	0,72	0,01
ST258/KPC-3	5,03	0,40	6,65	0,38	1,11	0,01	0,48	0,02
ST512/KPC-3	4,50	0,19	5,46	0,23	0,99	0,06	0,62	0,02
ST11/VIM-1	5,80	0,41	5,59	0,20	1,26	0,04	0,57	0,03
ST15/VIM-1	5,76	1,03	5,44	0,19	1,00	0,04	0,47	0,02
ST147/VIM-1	4,98	0,59	5,25	0,24	1,00	0,03	0,49	0,02
ST11/OXA-245	5,95	0,27	6,31	0,07	1,16	0,04	0,59	0,03
ST11/OXA-48	5,20	0,07	6,27	0,29	1,09	0,01	0,78	0,01
ST15/OXA-48	4,24	0,37	5,07	0,31	1,15	0,09	0,65	0,21
ST37/OXA-48	4,67	0,35	5,77	0,33	0,95	0,01	0,76	0,17
ST405/OXA-48	5,17	0,42	5,69	0,11	1,01	0,01	0,51	0,02
ST340/VIM-1	4,76	0,22	5,29	0,15	0,94	0,02	0,55	0,05
ST437/OXA-245	4,85	0,14	6,29	0,14	1,29	0,04	0,87	0,15
ST13/OXA-48	4,27	0,37	4,52	0,24	0,92	0,05	0,70	0,05
ST16/OXA-48	4,31	0,46	6,05	0,07	0,67	0,05	0,33	0,01
ST846/OXA-48	4,47	0,41	4,88	0,23	0,89	0,06	0,54	0,07
ST899/OXA-48	5,07	0,12	5,40	0,19	0,85	0,03	0,57	0,03
ATCC® 700603™	3,91	0,35	4,30	0,48	0,99	0,05	0,65	0,00

DE: desviación estándar.

Respecto al tipo de clon, a 25°C se observó una menor tasa de crecimiento intrínseco y un mayor tiempo de generación en los clones epidémicos respecto los no epidémicos en ambos medios de cultivo ($p < 0,01$). Por el contrario, a 37°C las diferencias en las tasas de crecimiento intrínseco ($p = 0,08$ y $p = 0,81$; MHB y M9 respectivamente) y tiempo de generación ($p = 0,11$ y $p = 0,81$; MHB y M9 respectivamente) entre clones epidémicos y no epidémicos no fueron significativas.

Respecto al tipo de carbapenemasa, no se observaron diferencias significativas en la tasa de crecimiento intrínseco ($p \geq 0,92$) ni en el tiempo de generación ($p \geq 0,86$).

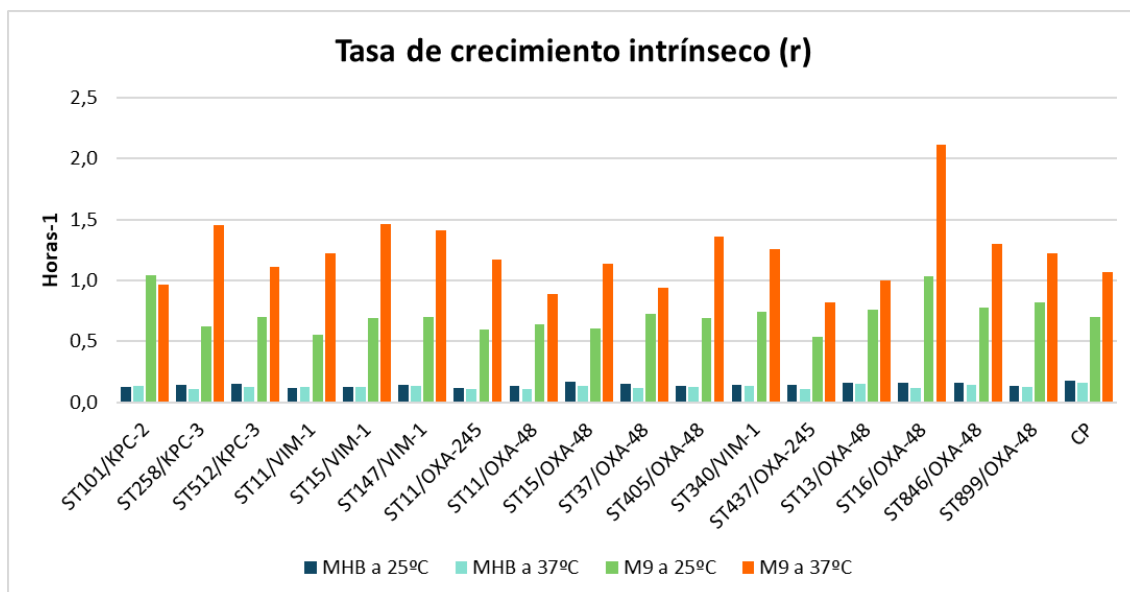


Figura 21. Tasa de crecimiento intrínseco (r; horas-1) de 17 aislados de KP-PC. CP: control positivo.

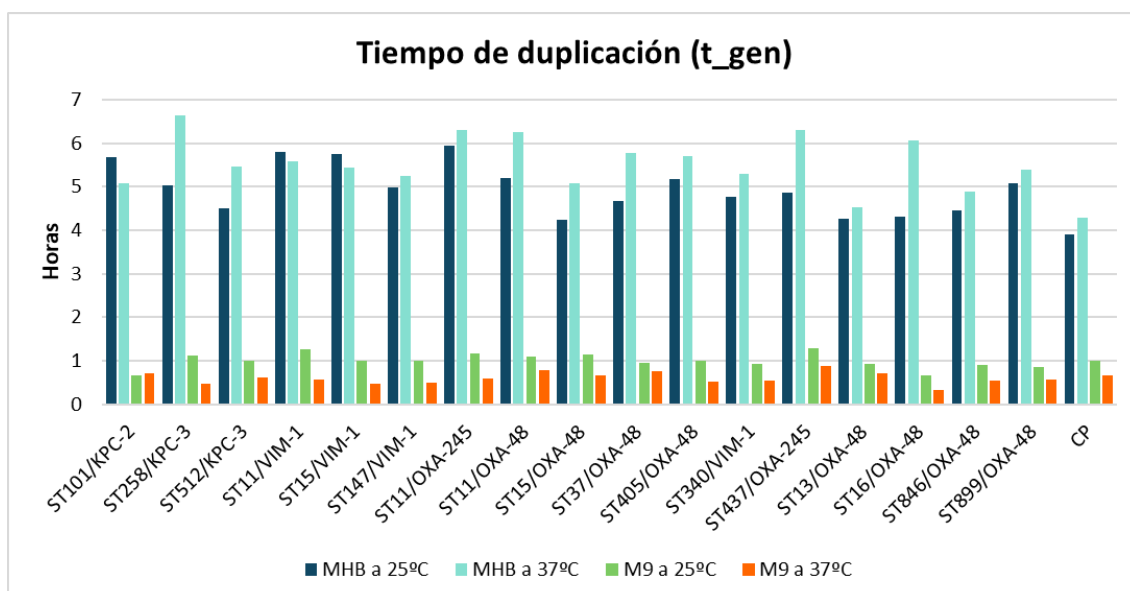


Figura 22. Tiempo de generación (t_gen; h) de los aislados de Kp-PC. CP: control positivo

4.2.3. Identificación de genes de bombas de expulsión relacionadas con sensibilidad reducida a biocidas. Análisis de la relación entre la presencia de genes de bombas y la actividad *in vitro* de biocidas.

Los genes *cepA*, *acrAB*, *kpnEF* y *oqxAB* se detectaron en todos los aislados analizados mientras que los genes *qacA* y *qacE* no se detectaron en ninguno de los aislados (**Tabla 35**). Por otro lado, los genes *smvA* y *smvR* se detectaron en todos los aislados a excepción de uno (94%), el aislado perteneciente al clon ST15 productor de OXA-48. La distribución del gen *qacEΔ1* fue más variable, detectándose en el 47% de los aislados. La presencia o ausencia de los genes *smvA* y *qacEΔ1* fue confirmada por PCR convencional.

Tabla 35. Presencia de genes codificantes de bombas de expulsión en los 17 aislados de Kp-PC.

Aislado/ carbapenemasa	Genes codificantes de bombas de expulsión								
	CE	<i>cepA</i>	<i>acrAB</i>	<i>kpnEF</i>	<i>oqxAB</i>	<i>smvAR</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacE</i>	<i>qacA</i>
ST101/KPC-2	Sí	+	+	+	+	+	-	-	-
ST258/KPC-3	Sí	+	+	+	+	+	+	-	-
ST512/KPC-3	Sí	+	+	+	+	+	+	-	-
ST11/VIM-1	Sí	+	+	+	+	+	+	-	-
ST15/VIM-1	Sí	+	+	+	+	+	+	-	-
ST147/VIM-1	Sí	+	+	+	+	+	+	-	-
ST11/OXA-245	Sí	+	+	+	+	+	-	-	-
ST11/OXA-48	Sí	+	+	+	+	+	+	-	-
ST15/OXA-48	Sí	+	+	+	+	-	-	-	-
ST37/OXA-48	Sí	+	+	+	+	+	-	-	-
ST405/OXA-48	Sí	+	+	+	+	+	-	-	-
ST340/VIM-1	No	+	+	+	+	+	+	-	-
ST437/OXA-245	No	+	+	+	+	+	-	-	-
ST13/OXA-48	No	+	+	+	+	+	-	-	-
ST16/OXA-48	No	+	+	+	+	+	+	-	-
ST846/OXA-48	No	+	+	+	+	+	-	-	-
ST899/OXA-48	No	+	+	+	+	+	-	-	-

CE: clon epidémico

No se observaron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de los genes *smvAR* y *qacEΔ1* y el tipo de clon al que pertenece el aislado (clon epidémico o clon no epidémico; $p=0,13$ y $p=0,10$; respectivamente) ni con los valores de CMI de los biocidas que pueden expulsar ($p=1$: CMI de cloruro de benzalconio y ambos genes; $p=0,47$: CMI de digluconato de clorhexidina y *qacEΔ1*). No obstante, se observaron diferencias significativas entre la presencia de *qacEΔ1* y la ausencia de carbapenemasas del grupo OXA-48 (*qacEΔ1* presente en 2/10 aislados productores de carbapenemasas del grupo OXA-48, $p=0,01$) y la presencia de la carbapenemasa VIM-1 (*qacEΔ1* presente en todos los aislados productores de VIM-1, $p=0,02$). Dado que los

genes *cepA*, *acrAB*, *kpnEF* y *oqxAB* se detectaron en todos los aislados analizados y que los genes *qacA* y *qacE* no se detectaron en ninguno, no se estudió la asociación de su presencia o ausencia con el tipo de clon (epidémico o no epidémico), los valores de CMI de los biocidas que pueden o el tipo de carbapenemasa que codifican.

El porcentaje de homología de los aminoácidos, inferida a partir de las secuencias nucleotídicas y comparadas con la secuencia de referencia de las bombas de expulsión detectadas (anexo 1), varió entre el 100 y el 92,2%, siendo este rango más estrecho (100-99%) si no se tienen en cuenta los resultados obtenidos para el aislado ST899/OXA-48, que fue el que presentó más diferencias y que fue reclasificado como *K. quasipneumoniae* a partir de los datos obtenidos mediante WGS (Tabla 36).

Tabla 36. Porcentaje de aminoácidos idénticos respecto a la secuencia de referencia de los genes codificantes para bombas de expulsión. Las secuencias de referencia se recogen en el anexo 1.

Aislado/ carbapenemasa	% Identidad											
	<i>cepA</i>	<i>acrA</i>	<i>acrB</i>	<i>kpnE</i>	<i>kpnF</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxB</i>	<i>smvA</i>	<i>smvR</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacE</i>	<i>qacA</i>
ST101/KPC-2	100	99,8	100	100	99,1	100	99,6	99,8	100	NSD	NSD	NSD
ST258/KPC-3	100	100	100	100	100	100	100	99,8	99,5	100	NSD	NSD
ST512/KPC-3	100	100	100	100	100	100	100	99,8	99,5	100	NSD	NSD
ST11/VIM-1	100	100	100	100	100	100	99,5	100	99,5	100	NSD	NSD
ST15/VIM-1	100	100	100	99,2	100	100	99,5	100	100	100	NSD	NSD
ST147/VIM-1	100	99,8	100	100	100	100	99,6	99,8	100	100	NSD	NSD
ST11/OXA-245	100	100	100	100	100	100	99,5	100	99,5	NSD	NSD	NSD
ST11/OXA-48	100	100	100	100	100	100	99,5	100	99,5	100	NSD	NSD
ST15/OXA-48	100	100	100	99,2	100	100	99,5	NSD	NSD	NSD	NSD	NSD
ST37/OXA-48	100	100	100	100	100	100	100	100	99,0	NSD	NSD	NSD
ST405/OXA-48	100	99,8	100	100	100	100	99,8	99,8	100	NSD	NSD	NSD
ST340/VIM-1	100	100	100	100	100	100	100	100	99,5	100	NSD	NSD
ST437/OXA-245	100	100	100	100	100	100	100	100	100	NSD	NSD	NSD
ST13/OXA-48	100	99,8	100	100	100	100	99,8	99,8	100	NSD	NSD	NSD
ST16/OXA-48	100	99,8	100	100	100	100	99,7	99,8	100	100	NSD	NSD
ST846/OXA-48	100	100	100	100	100	99,5	99,5	99,8	100	NSD	NSD	NSD
ST899/OXA-48	99,7	99	99,2	98,3	98,2	97,4	98,9	94,9	92,2	NSD	NSD	NSD

NSD: no se detecta.

El rango de cobertura y el porcentaje mínimo de lecturas correctas en las posiciones en las que se detectaron variaciones en las secuencias respecto a la de referencia (anexo 1) se muestran en la **Tabla 37**. El rango de cobertura muestra el número de lecturas del aislado con menor y mayor número de lecturas obtenidas en esas posiciones. El porcentaje mínimo de lecturas correctas es el porcentaje de lecturas en las que se presenta el mismo aminoácido que la secuencia consenso del aislado que presenta el porcentaje menor. En la **Tabla 38** se especifican

todos los cambios de aminoácidos observados en la bombas de expulsión estudiadas. Todas las secuencias de *qacEΔ1* detectadas fueron idénticas a la secuencia de referencia.

Tabla 37. Rango de cobertura y porcentaje mínimo de lecturas correctas de las posiciones en las que se observan variaciones en las secuencias de los genes estudiados en los 17 aislados de Kp-PC.

	Genes codificantes de bombas de expulsión (longitud de la secuencia en pb)								
	<i>cepA</i> (300)	<i>acrA</i> (397)	<i>acrB</i> (1048)	<i>kpnE</i> (120)	<i>kpnF</i> (109)	<i>oqxA</i> (391)	<i>oqxB</i> (1050)	<i>smvA</i> (494)	<i>smvR</i> (191)
Rango de cobertura	36	21-45	24-41	25-41	10-22	25-52	12-86	9-48	9-42
% mínimo de lecturas correctas	94,4	93,5	100	96	100	97,5	89,3	88,2	84,0

Tabla 38. Cambios de aminoácido detectados en los genes codifican bombas de expulsión respecto a la secuencia de referencia. Las secuencias de referencia se recogen en el anexo 1.

Clon/ carbapenemasa	<i>cepA</i>	<i>acrA</i>	<i>acrB</i>	<i>kpnE</i>	<i>kpnF</i>	<i>oqxA</i>	<i>oqxB</i>	<i>smvA</i>	<i>smvR</i>
ST101/KPC-2		T188A			I39F + 35insIYGFRRK		G148N, G540S, D749E, Y783F	A423T	
ST258/KPC-3								A89S	A171T
ST512/KPC-3								A89S	A171T
ST11/VIM-1							G148N, G540S, D749E, Y783F, P1049L		T187K
ST15/VIM-1				K112Q			G148N, G540S, D749E, Y783F, P1049L		
ST147/VIM-1		T188A					G148N, R341S, D749E, I960M	A423T	
ST11/OXA-245							G148N, G540S, D749E, Y783F, P1049L		T187K
ST11/OXA-48							G148N, G540S, D749E, Y783F, P1049L		T187K
ST15/OXA-48				K112Q			G148N, G540S, D749E, Y783F, P1049L		
ST37/OXA-48									A127G, V130L
ST405/OXA-48		T188A					G148N, G540S	A493S	
ST340/VIM-1									T187K
ST437/OXA-245									
ST13/OXA-48		T188A					G148N, D749E		
ST16/OXA-48		T188A					G540S, V566A, D749E	T456A	
ST846/OXA-48						G8E, T137S	G148N, V419I, S708T, Y783F, V839I	A423T	
ST899/OXA-48	V126F	I52M, T188A, T200S, I301V	I235V, F281Y, E639D, A648G, E682Q, I728V, A841S	V26I, I96V	A10I, I36V	T41A, A113T, E306A, K308Q, I351V, Q353K, K354Q, N357K, S386P, T389A	G148N, Q325K, G540S, A551V, T648S, A710T, H848L, E850D, E851A, L852M, I856V, R1041S	I78V, M90L, I148M, E185D, V195I, L225I, A242P, I294M, L312M, R316K, F332L, Q346H, S413T, A415V, S421N, G422E, A423T, A429S, S439T, Q448E, T456A, I459T, L472M, A488T, Q491P	A8E, A27S, T50A, A57S, N123T, I133V, S139C, R143H, A145T, A148P, A149V, D170G, A171T, A173T, A177T

4.3. Capítulo 2

4.3.1. Capacidad de formación de biopelícula. Diferencias entre aislados pertenecientes a clones epidémicos y aislados pertenecientes a clones no epidémicos.

Como se aprecia en la **Tabla 39**, los resultados de formación de biopelícula medida con tinción con cristal violeta muestran que la cantidad de biopelícula formada en ausencia de biocidas fue variable, dependiendo del tipo de clon (epidémico o no epidémico), la temperatura a la que se formó y la ausencia o presencia de humedad.

Tabla 39. Capacidad de formación de biopelícula de los 17 aislados de Kp-PC según la clasificación de Stepanovic³⁰⁷.

Clon/carbapenemasa	Clon de alto riesgo	25°C		37°C	
		Sin humedad	Con humedad	Sin humedad	Con humedad
ST101/KPC-2	Sí	+++	+++	+++	+++
ST258/KPC-3	Sí	-	-	+	+
ST512/KPC-3	Sí	-	-	+	+
ST11/VIM-1	Sí	-	-	-	-
ST15/VIM-1	Sí	-	-	-	-
ST147/VIM-1	Sí	+++	+++	+++	+++
ST11/OXA-245	Sí	++	+++	+++	+++
ST11/OXA-48	Sí	-	-	-	-
ST15/OXA-48	Sí	+	+	+++	+++
ST37/OXA-48	Sí	+	-	+	+
ST405/OXA-48	Sí	+++	+++	+++	+++
ST340/VIM-1	No	-	-	-	-
ST437/OXA-245	No	-	-	+	+
ST13/OXA-48	No	-	-	+++	+++
ST16/OXA-48	No	+	+	+++	+++
ST846/OXA-48	No	-	-	+++	+++
ST899/OXA-48	No	-	-	+	++

-: no productor de biopelícula, +: productor de biopelícula débil, ++: productor de biopelícula moderado, +++: productor de biopelícula fuerte.

Respecto al tipo de clon (epidémico o no epidémico) se observó que la capacidad de formación de biopelícula a 37°C fue similar entre los dos grupos ($p=0,6$), 8 aislados de clones epidémicos (73%) y 5 aislados de clones no epidémicos (83%) fueron capaces de formar biopelícula, en ausencia y presencia de humedad. A 25°C, por el contrario, la capacidad de formación de biopelícula fue superior en los aislados de clones epidémicos que en los aislados de clones no epidémicos ($p=0,03$). Entre los clones epidémicos, 6 aislados (55%) en ausencia de humedad y 5 aislados (45%) en presencia de humedad fueron capaces de formar biopelícula, mientras que entre los clones no epidémicos únicamente el asilado ST16/OXA-48 (17%) fue capaz de formar

biopelícula en ausencia y presencia de humedad. Del mismo modo, se observó que a 37°C la frecuencia de formadores fuertes de biopelícula era similar entre clones epidémicos (5 aislados [45%] en ausencia y presencia de humedad) y clones no epidémicos (3 aislados [50%] en ausencia y presencia de humedad). Además, a 25°C se observó que los aislados productores fuertes de biopelícula pertenecían con mayor frecuencia a clones epidémicos (3 aislados en ausencia de humedad y 4 aislados en presencia de humedad, suponiendo el 27 y 36% de los clones epidémicos), que a clones no epidémicos (ningún aislado en ausencia y presencia de humedad). Finalmente, se observó que la frecuencia de aislados formadores moderados o débiles fue similar entre los clones epidémicos y no epidémicos a ambas temperaturas (**Tabla 40**).

Tabla 40. Porcentaje de aislados de Kp-CP pertenecientes a clones epidémicos/no epidémicos en cada categoría de capacidad de formación de biopelícula en las 4 condiciones estudiadas.

Categoría de formación de biopelícula	25°C		37°C	
	Sin humedad	Con humedad	Sin humedad	Con humedad
Formador fuerte	27%/0%	36%/0%	45%/50%	45%/50%
Formador moderado	9%/0%	0%/0%	0%/0%	0%/17%
Formador débil	18%/17%	9%/17%	27%/33%	27%/17%
No formador	45%/83%	55%/83%	27%/17%	27%/17%

En negrita se indican las diferencias más relevantes.

Tres de los aislados estudiados (ST101/KPC-2, ST147/VIM-1, ST405/OXA-48), pertenecientes a clones epidémicos, fueron productores fuertes de biopelícula en todas las condiciones de temperatura y humedad analizadas. Cuatro de los aislados estudiados, tres clasificados como clones epidémicos y uno como no epidémico, no fueron capaces de formar biopelícula en ninguna de las condiciones de temperatura y humedad analizadas (ST11/VIM-1, ST15/VIM-1, ST11/OXA-48 y ST340/OXA-48).

Aislados pertenecientes al mismo secuenciotipo (ST11 y ST15) mostraron diferente capacidad de formación de biopelícula. ST11/VIM-1 y ST11/OXA-48 no fueron capaces de formar biopelícula en ninguna de las condiciones estudiadas, mientras que ST11/OXA-245 se clasificó como productor moderado o fuerte de biopelícula, en función de las condiciones de temperatura y humedad. Del mismo modo, en ST15/VIM-1 no se observó producción de biopelícula en ninguna de las condiciones estudiadas, mientras que el aislado ST15/OXA-48 se clasificó como productor débil o fuerte de biopelícula, en función de las condiciones de temperatura y humedad.

Respecto al efecto de la temperatura en la formación de las biopelículas, se observó que la capacidad de formación de biopelícula fue mayor a 37°C que a 25°C ($p=0,02$). A 37°C, 13 aislados (76%) fueron capaces de formar biopelícula, tanto en ausencia como en presencia de humedad. A 25°C, 7 aislados (41%) fueron capaces de formar biopelícula en ausencia de humedad y 6 aislados (35%) fueron capaces en presencia de humedad.

Respecto a la humedad, su efecto sobre la capacidad de formación de biopelícula fue escaso ($p=1,0$), observándose cambios en la categoría de formación de biopelícula únicamente en 2 aislados (ST11/OXA-245 y ST37/OXA-48) a 25°C y en 1 aislado (ST899/OXA-48) a 37°C.

4.3.2. Viabilidad y dinámica de formación de biopelículas formadas por aislados pertenecientes a clones epidémicos

4.3.2.1. Viabilidad de las biopelículas formadas por aislados pertenecientes a clones epidémicos

La viabilidad de las biopelículas formadas por 4 aislados seleccionados pertenecientes a los clones epidémicos ST512/KPC-3, ST258/KPC-3, ST15/OXA-48 y ST11/OXA-48 se analizó mediante recuento de bacterias viables. La recuperación de bacterias viables de las biopelículas formadas en ausencia de biocidas fue posible durante todo el periodo de estudio a ambas temperaturas, a excepción de la biopelícula formada por ST11/OXA-48 a 37°C, en la que la viabilidad celular de la biopelícula únicamente fue detectada hasta el día 30 (**Figura 23**).

La viabilidad de la biopelícula (UFC/ml) formada a 25°C y a 37°C por el aislado ST11/OXA-48 fue en general significativamente inferior ($p\leq 0,01$) a la de los aislados ST512/KPC-3, ST258/KPC-3 y ST15/OXA-48, siendo 1-3 logaritmos inferior cuando las biopelículas se formaron a 25°C y 1-4 logaritmos inferior cuando las biopelículas se formaron a 37°C (**Figura 23**). En general, en los aislados ST512/KPC-3, ST258/KPC-3 o ST15/OXA-48 no se observaron diferencias importantes en la viabilidad de las biopelículas formadas a 25°C, excepto en el aislado ST15/OXA-48, en el que durante los 3 primeros días se observaron recuentos superiores a los determinados en el aislado ST512/KPC-3 ($p=0,60$; $p\leq 0,01$; $p\leq 0,01$; días 1, 2 y 3 respectivamente) y el aislado ST258/KPC-3 ($p=0,23$; $p\leq 0,01$; $p=0,17$; días 1, 2 y 3 respectivamente), pero inferiores a partir del día 30 respecto a la del aislado ST258/KPC-3 ($p\leq 0,01$; $p=0,04$; $p=0,03$; días 30, 45 y 60 respectivamente) (**Figura 23A**). A 37°C también se observaron recuentos del aislado ST15/OXA-48 superiores a los del aislado ST512/KPC-3 ($p\leq 0,01$; $p\leq 0,01$; días 2 y 3 respectivamente) y ST258/KPC-3 ($p\leq 0,02$; $p\leq 0,01$; $p=0,03$; días 2, 3 y 7 respectivamente) en los primeros días de formación de biopelícula. Por el contrario, la viabilidad de la biopelículas formadas por el aislado ST512/KPC-3 fue significativamente superior a las formadas por el aislado ST258/KPC-3 a partir del día 21 ($p=0,03$), y por el aislado ST15/OXA-48 a partir de día 30 ($p\leq 0,01$) (**Figura 23B**).

La viabilidad de la biopelícula formada por los 4 aislados estudiados permaneció relativamente estable durante los primeros 10 días de cultivo a 25°C y 37°C. A partir de ese momento, en las biopelículas formadas a 25°C esta viabilidad continuó relativamente estable hasta el día 60, mientras que la viabilidad de las biopelículas formadas a 37°C comenzó a disminuir significativamente ($p \leq 0,01$) en el día 7 para el aislado ST15/OXA-48 (1 logaritmo), en el día 10 para el aislado ST11/OXA-8 (2 logaritmos) y en el día 21 para los aislados ST512/KPC-3 (4 logaritmos) y ST258/KPC-3 (7 logaritmos) (**Figura 24**).

Respecto al efecto de la temperatura en la viabilidad de las biopelículas, se observó una reducción significativa ($p \leq 0,01$) de 1-7 logaritmos en las biopelículas formadas a 37°C respecto a 25°C, a partir del día 14 en los aislados ST15/OXA-48 (3 logaritmos) y ST11/OXA-48 (1 logaritmo), y a partir del día 21 en los aislados ST512/KPC-3 (5 logaritmos) y ST258/KPC-3 (7 logaritmos) (**Figura 24**).

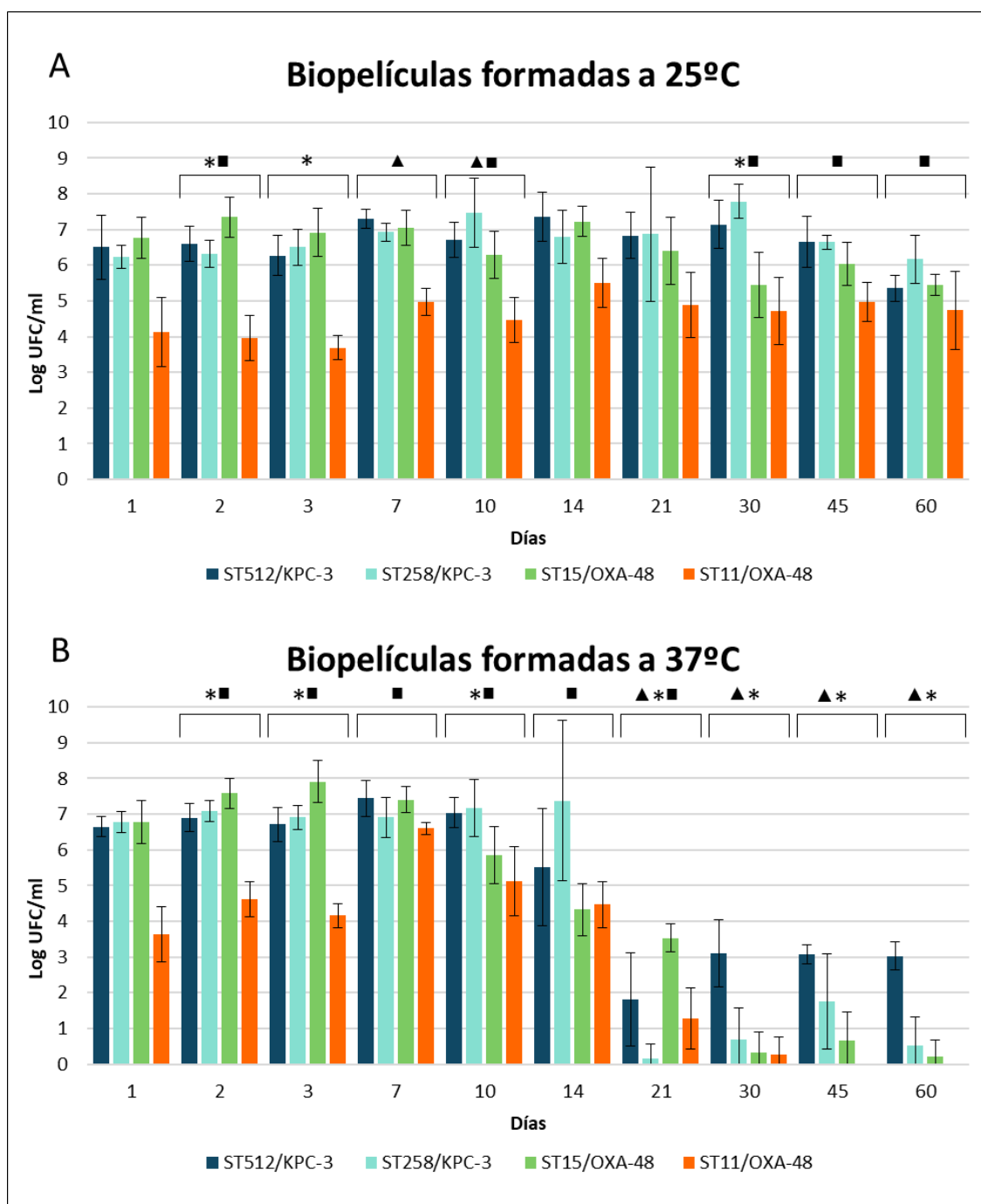


Figura 23. Viabilidad (Log UFC/ml, logaritmo de unidades formadoras de colonias por ml) de biopelículas formadas por cuatro aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos entre los días 1 y 60, a 25°C (A) y 37°C (B). ▲, diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre biopelícula formada por los aislados ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3. *, diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre biopelícula formada por los aislados ST512/KPC-3 y ST15/OXA-48. ■, diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre biopelícula formada por los aislados ST258/KPC-3 y ST15/OXA-48.

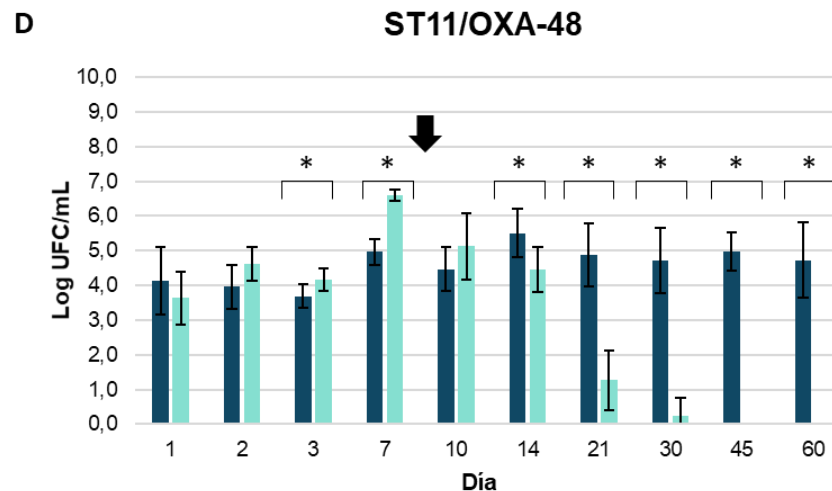
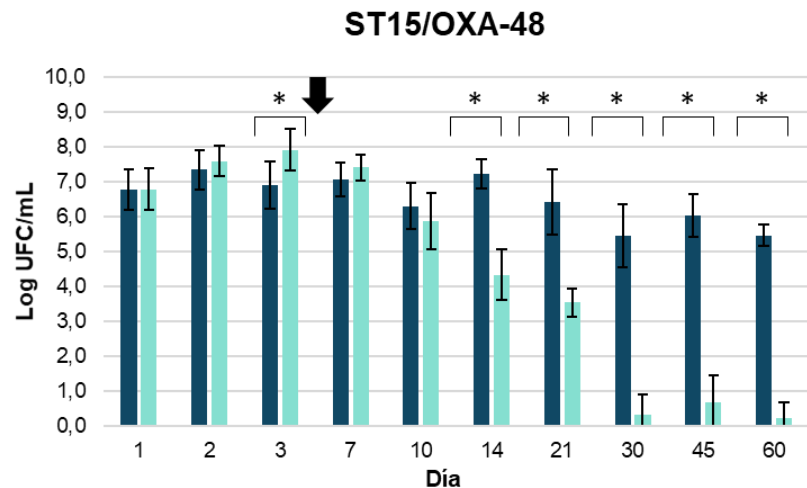
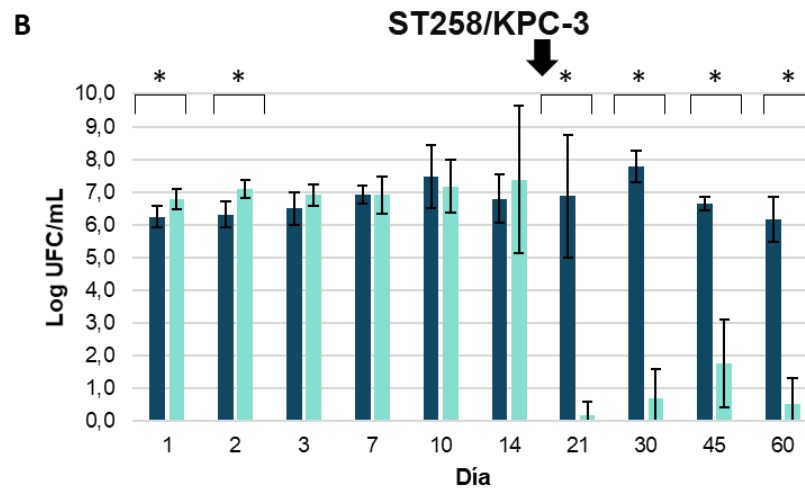
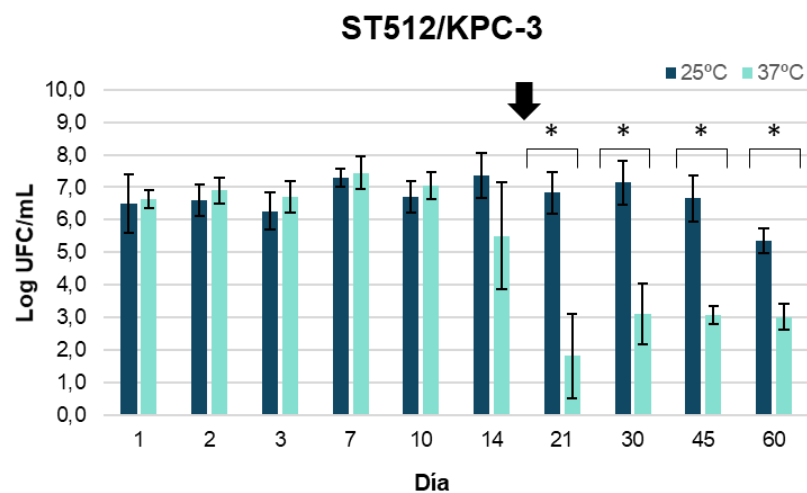


Figura 24. Viabilidad (Log UFC/ml, logaritmo de unidades formadoras de colonias por ml) de biopelículas formadas por cuatro aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos, entre los días 1 y 60, a 25°C y 37°C. Flecha negra: inicio de la disminución significativa ($p \leq 0,05$) del recuento de células viables (Log UFC/ml) a 37°C respecto a la medida anterior (días). * Diferencia significativa ($p \leq 0,05$) del recuento de células viables (Log UFC/ml) entre las dos temperaturas.

4.3.2.2. Dinámica de formación de biopelículas en aislados pertenecientes a clones epidémicos

La dinámica de la formación de biopelícula de los 4 aislados seleccionados pertenecientes a los clones epidémicos ST512/KPC-3, ST258/KPC-3, ST15/OXA-48 y ST11/OXA-48 se analizó en el sistema "Flow cell" mediante microscopia de barrido láser confocal (CLSM). De estos 4 aislados el único que no pudo formar biopelícula en este sistema fue el ST11/OXA-48.

El análisis de las imágenes permitió calcular la media de la cantidad de biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) y el grosor máximo (μm) de las biopelículas de los 3 aislados estudiados, y también se generaron imágenes tridimensionales del proceso de formación de la biopelícula. La representación gráfica de estos resultados y las imágenes tridimensionales de las biopelículas pueden verse en las **Figuras 29 y 30** (apartado 4.3.4.3), conjuntamente con los resultados obtenidos en las biopelículas expuestas a povidona yodada. En el análisis de los datos solo se utilizaron datos de las bacterias viables ya que, mediante la tinción de las bacterias que forman la biopelícula con "FilmTracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit", se observó que prácticamente todas las bacterias eran viables.

A continuación, se expresan los valores medios de biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) y la media del grosor máximo (μm) de los aislados analizados en ausencia de concentraciones subletales de povidona yodada en los días 1, 2 y 6 respectivamente.

ST15/OXA-48 fue el aislado que en general mostró una biopelícula con mayor cantidad de biomasa y grosor máximo ($p \leq 0,01$; excepto en el día 2 en el que no se observan diferencias en la biomasa respecto ST512/KPC3). La biomasa formada por el aislado ST15/OXA-48 fue $6,5 \pm 2,1$ en el día 1 (día 1); $7,1 \pm 3,2$ en el día 2 (día 2) y $8,2 \pm 3,3$ en el día 6 (día 6). El grosor máximo fue $37,8 \pm 9,7$ (día 1); $37,1 \pm 11,3$ (día 2) y $25,3 \pm 9,1$ (día 6). En el aislado ST512/KPC-3 la biomasa observada fue $2,9 \pm 1,4$ (día 1); $6,7 \pm 2,5$ (día 2) y $4,7 \pm 1,7$ (día 6), y el grosor máximo fue $22,3 \pm 6,7$ (día 1); $24,7 \pm 4,8$ (día 2) y $13,6 \pm 4,7$ (día 6). En el aislado ST258/KPC-3 la biomasa fue $1,7 \pm 0,8$ (día 1); $1,4 \pm 1,3$ (día 2) y $5,2 \pm 3,7$ (día 6) y el grosor máximo $11,6 \pm 3,3$ (día 1); $17,1 \pm 5,6$ (día 2) y $14,8 \pm 8,3$ (día 6). Respecto a estos dos últimos aislados, el valor medio de la biomasa y el del grosor máximo fue mayor en ST512/KPC-3 en los días 1 ($p=0,05$ y $p=0,01$; respectivamente) y día 2 ($p \leq 0,01$ y $p \leq 0,01$; respectivamente). Por el contrario, aunque las diferencias no fueron significativas, el valor medio de biomasa y grosor máximo fue mayor en el aislado ST258/KPC-3 en el día 6 ($p=0,97$ y $p=0,84$; respectivamente).

Con respecto a la dinámica de formación de la biopelícula en el aislado ST15/OXA-48, se observó un incremento en la cantidad de biomasa observada en los días 1, 2 y 6, aunque las diferencias

no fueron estadísticamente significativas ($p=0,63$; $p=0,13$ y $p=0,39$; día 2 respecto día 1, día 6 respecto día 1 y día 6 respecto día 2). Por el contrario, se observó una disminución estadísticamente significativa en el grosor máximo de la biopelícula formada en el día 6 respecto a la de los días 1 y 2 ($p\leq 0,01$; ambos). En el caso del aislado ST512/KPC-3, se observó un aumento significativo en la cantidad de biomasa de la biopelícula en el día 2 respecto al día 1 ($p\leq 0,01$) y del día 6 respecto al día 1 ($p=0,02$), así como una disminución en el día 6 respecto al día 2 ($p=0,02$). Además, se observó una disminución del grosor máximo de la biopelícula en el día 6 respecto a los días 1 y 2 ($p\leq 0,01$; ambos). En el aislado ST258/KPC-3, se observó un aumento de la cantidad de biomasa de la biopelícula en el día 6 respecto a los días 1 y 2 ($p=0,02$ y $p\leq 0,01$; respectivamente) y del grosor máximo de la misma en el día 2 respecto al día 1 ($p=0,03$).

Las imágenes tridimensionales y las secciones transversales de las biopelículas formadas en ausencia de povidona yodada, generadas con el programa informático IMARIS a partir de las imágenes obtenidas por CLSM, mostraron que la biopelícula formada por el aislado ST15/OXA-48 cubrió toda la superficie, observándose crecimiento en altura desde el primer día. En el caso de las biopelículas formadas por los aislados ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3 se observaron microcolonias en el día 1 y la biopelícula recubrió toda la superficie en los días 2 y 6, mientras que no se aprecia un incremento importante en la formación de biopelícula en altura.

4.3.3. Prevalencia del operón *mrkABCD* y expresión relativa del gen *mrkA*. Análisis de las diferencias entre aislados de clones epidémicos y aislados de clones no epidémicos.

El operón *mrkABCD* se detectó completo en los 17 aislados analizados, aunque se observaron algunos cambios en las secuencias de aminoácidos de los genes que lo forman (**Tabla 41**).

El rango de cobertura y el porcentaje mínimo de lecturas correctas en las posiciones en las que se detectaron variaciones en las secuencias respecto a la de referencia (anexo 1) se muestran en la **Tabla 42**. El rango de cobertura muestra el número de lecturas del aislado con menor y mayor número de lecturas obtenidas en esas posiciones. El porcentaje mínimo de lecturas correctas es el porcentaje de lecturas en las que se presenta el mismo aminoácido que la secuencia consenso del aislado que presenta el menor porcentaje.

Tabla 41. Porcentaje de aminoácidos idénticos y cambios de aminoácidos detectados respecto a la secuencia de referencia (anexo 1) en los genes del operón *mrkABCDF*.

Aislado/ carbapenemasa	<i>mrkA</i> (202 pb)		<i>mrkB</i> (233 pb)		<i>mrkC</i> (828 pb)		<i>mrkD</i> (331 pb)		<i>mrkF</i> (211 pb)	
	ID (%)	CA	ID (%)	CA	ID (%)	CA	ID (%)	CA	ID (%)	CA
ST101/KPC-2	100		100		100		99,7	Q141E	100	
ST258/KPC-3	100		100		100		100		100	
ST512/KPC-3	100		100		100		100		100	
ST11/VIM-1	100		100		100		100		100	
ST15/VIM-1	99,5	T26N	100		99,8	N376Y, A718T	99,7	Q141E	100	
ST147/VIM-1	99,5	T26N	100		100		100		100	
ST11/OXA-245	100		100		100		100		100	
ST11/OXA-48	100		100		100		100		100	
ST15/OXA-48	99,5	T26N	100		99,8	N376Y, A718T	99,7	Q141E	100	
ST37/OXA-48	100		100		100		100		100	
ST405/OXA-48	99,5	T26N	100		100		99,7	Q141E	100	
ST340/VIM-1	100		100		100		100		100	
ST437/OXA-245	100		100		100		100		100	
ST13/OXA-48	99,5	T26N	100		100		99,4	Q141E, T253I	100	
ST16/OXA-48	100		100		100		99,7	Q141E	100	
ST846/OXA-48	99,5	T26N	99,6	S163G	100		100		99,5	E125D
ST899/OXA-48	98	T26N, N86K, D91N, D153N	100		99,9	I805V	96,7	T60W, M61P, S68N, A111E, N127Y, N130D, Q141E, W164L, G168S, N179S, K285N	99,5	V48I

ID (%): porcentaje de aminoácidos idénticos a la secuencia de referencia, CA: cambio de aminoácido.

Tabla 42. Rango de cobertura y porcentaje mínimo de lecturas correctas de las posiciones en las que se observan variaciones en las secuencias de los genes estudiados en los 17 aislados de Kp-PC.

	Genes codificantes de bombas de expulsión (longitud de la secuencia en pb)				
	<i>mrkA</i> (202)	<i>mrkB</i> (233)	<i>mrkC</i> (828)	<i>mrkD</i> (331)	<i>mrkF</i> (211)
Rango de cobertura	15-79	75	30-53	9-56	41-44
% mínimo de lecturas correctas	73,8	100	95,2	92,9	97,6

La expresión relativa de *mrkA* en los 17 aislados fue variable, observándose un rango entre 0,1 ($\pm 0,0$) y 28,2 ($\pm 4,7$) (Tabla 43 y Figura 25).

Tabla 43. Expresión relativa media de *mrkA*, desviación estándar y capacidad de formación de biopelícula (a 37°C en ausencia de humedad) de los 17 aislados de Kp-PC.

Clon/carbapenemasa	Clon epidémico	Expresión relativa de <i>mrkA</i> (media)	DE	Capacidad de formación de biopelícula*
ST101/KPC-2	Sí	22,6	3,2	+++
ST258/KPC-3	Sí	0,1	0,1	+
ST512/KPC-3	Sí	4,1	0,6	+
ST11/VIM-1	Sí	1,4	0,9	-
ST15/VIM-1	Sí	0,2	0,2	-
ST147/VIM-1	Sí	2,7	1,9	+++
ST11/OXA-245	Sí	27,3	15,6	+++
ST11/OXA-48	Sí	0,1	0,0	-
ST15/OXA-48	Sí	4,6	0,5	+++
ST37/OXA48	Sí	0,1	0,1	+
ST405/OXA-48	Sí	28,2	4,7	+++
ST340/VIM-1	No	0,1	0,1	-
ST437/OXA-245	No	0,1	0,0	+
ST13/OXA-48	No	9,5	0,7	+++
ST16/OXA-48	No	0,3	0,1	+++
ST846/OXA-48	No	1,3	0,7	+++
ST899/OXA-48	No	21,5	0,6	+

DE: Desviación estándar. * A 37°C en ausencia de humedad. -: no productor de biopelícula, +: productor de biopelícula débil, ++: productor de biopelícula moderado, +++: productor de biopelícula fuerte.

Se establecieron tres categorías de expresión relativa de *mrkA*, considerándose el rango 28,2-22,6 expresión de nivel alto; 9,5-1,3 de nivel intermedio y 0,2-0,1 de nivel bajo (**Figura 25**).

La expresión relativa de *mrkA* se asoció directamente con la capacidad de formación de biopelícula (media de la absorbancia, $\rho=0,79$ $p\leq 0,01$). El porcentaje de aislados formadores fuertes de biopelícula fue del 75% entre los aislados que presentaron expresión de *mrkA* de alto nivel, 67% entre los aislados de presentaron expresión de *mrkA* de nivel intermedio y 14% entre los aislados que presentaron expresión de *mrkA* de bajo nivel.

No se observaron diferencias significativas ($p=0,45$) en la expresión relativa de *mrkA* entre los aislados de clones epidémicos y los aislados de clones no epidémicos. Se observó que el nivel de expresión de *mrkA* fue alto, intermedio o bajo en el 27, 36 y 36% de los aislados pertenecientes a clones epidémicos, y en el 17, 33 y 50% de los aislados pertenecientes a clones no epidémicos. Todos los aislados pertenecientes a clones epidémicos que presentaron un nivel de expresión de *mrkA* alto ($n=3$) fueron aislados formadores fuertes de biopelícula, mientras que el único aislado perteneciente a clones no epidémicos que mostró un nivel de expresión de *mrkA* alto (ST899/OXA-48) fue un aislado formador débil de biopelícula (**Figura 25**).

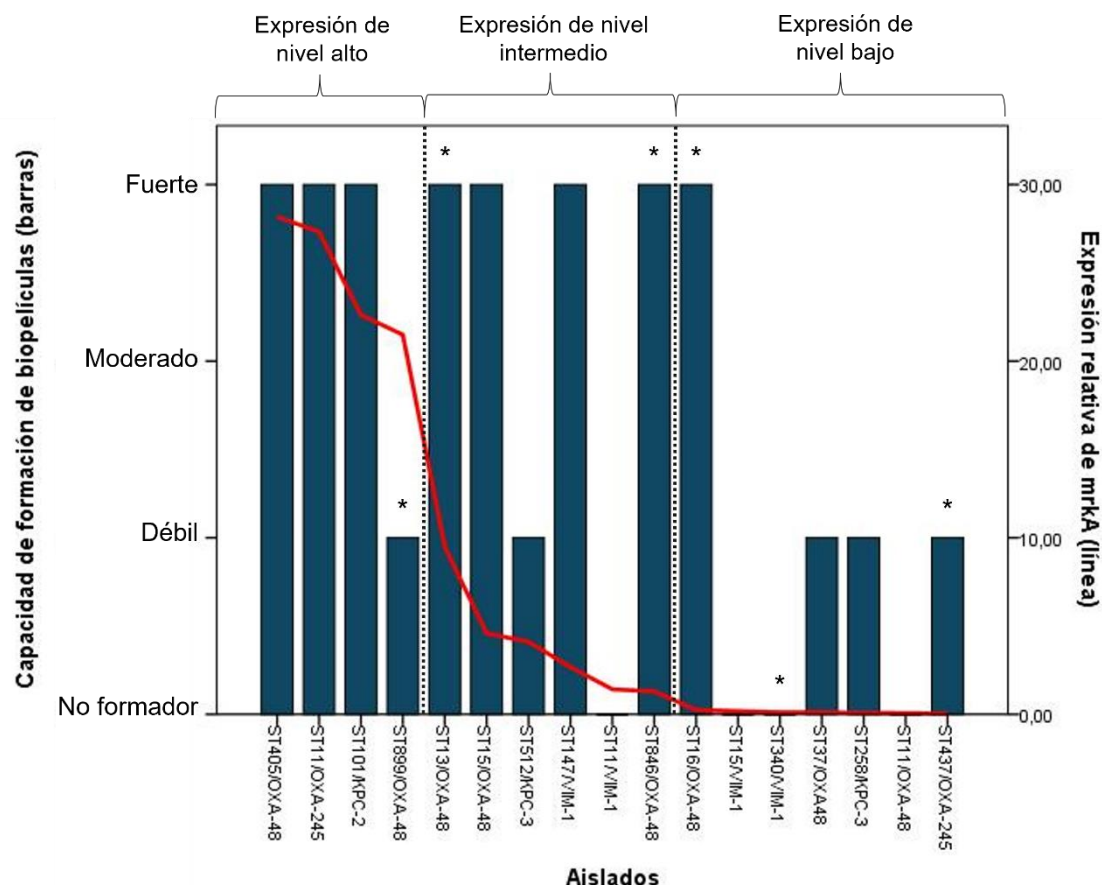


Figura 25. Capacidad de formación de biopelícula, según la clasificación de Stepanovic, a 37°C en ausencia de humedad (barras) y expresión relativa del gen *mrkA* (línea roja) de los 17 aislados de Kp-PC³⁰⁷. *: aislados que pertenecen a clones no epidémicos.

Finalmente, el nivel de expresión relativa de *mrkA* no se relacionó con el tipo de carbapenemasa producida ($p=0,55$). La expresión relativa de *mrkA* de los aislados productores de carbapenemasas pertenecientes al mismo grupo fue muy variable, observándose niveles de expresión alto, intermedio y bajo en todos los grupos con la excepción los productores de carbapenemasas del grupo VIM que presentaron niveles de expresión intermedio y bajo.

4.3.4. Formación de biopelículas y viabilidad de las biopelículas en presencia de biocidas. Dinámica de la formación de biopelículas en presencia de povidona yodada.

4.3.4.1. Formación de biopelícula en presencia de biocidas mediante el ensayo por tinción con cristal violeta.

Los resultados obtenidos mostraron que la presencia de concentraciones subinhibitorias de los 7 biocidas estudiados afectaba la capacidad de formación de biopelícula determinada mediante tinción con cristal violeta de forma variable en los 17 aislados de Kp-PC analizados.

En la **Tabla 44** se observa el porcentaje de aislados capaces de formar biopelícula en las 4 condiciones de temperatura y humedad analizadas, al ser o no expuestos a concentraciones

subinhibitorias de los 7 biocidas estudiados. A 25°C, se observó que, en ausencia de exposición a biocidas, el 41% y 35% de los aislados fueron capaces de formar biopelícula en ausencia y presencia de humedad, respectivamente. La exposición a concentraciones subletales de povidona yodada y solución hidroalcohólica redujo el porcentaje de aislados capaces de formar biopelícula (12% y 12% tras exposición a povidona yodada y 29% y 24% tras exposición a solución hidroalcohólica, en ausencia y presencia de humedad ($p=0,03$; $p=0,05$; $p=0,16$; $p=0,16$) respectivamente). Para el resto de los biocidas se observó un ligero incremento, aunque las diferencias no fueron significativas. A 37°C, se observó que, en ausencia de exposición a biocidas, el 76% de los aislados fueron capaces de formar biopelícula en ausencia y presencia de humedad. La exposición a concentraciones subletales de povidona yodada, triclosán y solución hidroalcohólica redujo el porcentaje de aislados de Kp-PC capaces de formar biopelícula (47% y 47% tras exposición a povidona yodada, 65% y 71% tras la exposición a triclosán y 71% y 71% tras exposición a solución hidroalcohólica, en ausencia y presencia de humedad ($p=0,03$; $p=0,03$; $p=0,16$; $p=0,32$; $p=0,32$; $p=0,32$, respectivamente). Para el resto de los biocidas no se observaron diferencias (76% tras exposición a concentraciones subinhibitorias de hipoclorito sódico y etanol, en ausencia y presencia de humedad, así como a cloruro de benzalconio y digluconato de clorhexidina en ausencia de humedad) o se observó un incremento no significativo (82% y 88% ($p=0,16$) tras exposición a concentraciones subinhibitorias de cloruro de benzalconio y digluconato de clorhexidina en presencia de humedad ($p=0,32$; $p=0,16$, respectivamente).

Tabla 44. Porcentaje de los 17 aislados de Kp-PC, expuestos o no a concentraciones subletales de biocidas, capaces de formar biopelícula en diferentes condiciones de temperatura y humedad.

Biocida	25°C		37°C	
	Ausencia de humedad	Presencia de humedad	Ausencia de humedad	Presencia de humedad
CON	41%	35%	76%	76%
STE	29%	24%	71%	71%
POV	12%	12%	47%	47%
HS	47%	53%	76%	76%
CHV	53%	47%	76%	88%
BZK	47%	47%	76%	82%
ET	53%	53%	76%	76%
TRI	53%	53%	65%	71%

CON: control, STE: solución hidroalcohólica (Sterillium®), POV: povidona yodada, HS: hipoclorito de sodio, CHX: digluconato de clorhexidina, BZK: cloruro de benzalconio, ET: etanol y TRI: triclosán. En negrita, diferencias significativas respecto al control ($p \leq 0,05$).

En general, se observó que la exposición a biocidas no produjo un cambio de categoría en la mayoría de los aislados, excepto con povidona yodada a 25°C y a 37°C, tanto en ausencia como

en presencia de humedad, con el que se observó una reducción de categoría estadísticamente significativa ($p \leq 0,02$) (Figura 26).

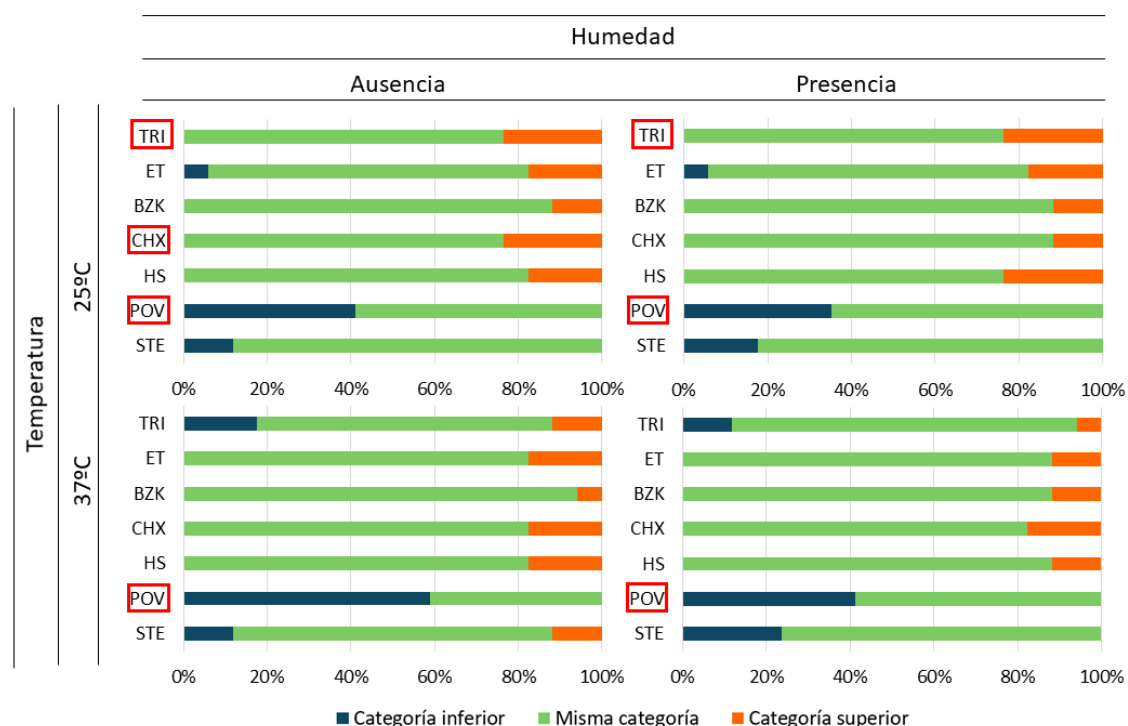


Figura 26. Cambio en la capacidad de formación de biopelículas de los 17 aislados de Kp-PC expuestos o no a concentraciones subletales de 7 biocidas en diferentes condiciones de temperatura y humedad (% de aislados). TRI: triclosán, ET: etanol, BZK: cloruro de benzalconio, CHX: digluconato de clorhexidina, HS: hipoclorito de sodio, POV: povidona yodada, STE: solución hidroalcohólica (Sterillium®) y CON: control. Enmarcados en rojo, biocidas con efecto estadísticamente significativo.

La exposición a hipoclorito de sodio, digluconato de clorhexidina y cloruro de benzalconio supuso un incremento en la categoría de formación de biopelícula en un porcentaje reducido de aislados (6-24%, incluyendo todas las condiciones de temperatura y humedad analizadas). Las diferencias no fueron estadísticamente significativas, con la excepción de la exposición a digluconato de clorhexidina, que produjo un incremento de categoría de formación de biopelícula en el 24% de los aislados a 25°C en ausencia de humedad ($p=0,05$) (Figura 26).

La exposición a la solución hidroalcohólica, etanol y triclosán supuso un cambio de categoría variable, observándose cambios a categorías inferiores o superiores en un porcentaje reducido de aislados (0-24%), incluyendo todas las condiciones de temperatura y humedad analizadas. Las diferencias no fueron estadísticamente significativas, excepto con triclosán que se observa un incremento de categoría en el 24% de los aislados a 25°C en ausencia y en presencia de humedad, respectivamente ($p=0,05$) (Figura 26).

No se observaron diferencias significativas ($p>0,16$) en la capacidad de formación de biopelícula por exposición a los biocidas estudiados en ninguno de los 4 aislados de clones epidémicos en los que se ha estudiado la dinámica de formación y viabilidad de la biopelícula.

4.3.4.2. Viabilidad de biopelículas en presencia de concentraciones subletales de biocidas.

El efecto de los biocidas sobre la viabilidad de las biopelículas se analizó a 25°C hasta el día 60, mientras que a 37°C se analizó hasta el día 7, debido a que a partir de este día el recuento de células viables se redujo de forma significativa ($p\leq 0,01$) (Figura 24).

En general, en los 4 aislados pertenecientes a clones epidémicos seleccionados para este estudio se produjo una reducción en la viabilidad de las biopelículas expuestas a biocidas, aunque fue posible la recuperación de bacterias viables en todos los casos durante el periodo de tiempo analizado (60 o 7 días en biopelículas formadas a 25°C y 37°C, respectivamente) (Tabla 45).

Tabla 45. Recuentos de bacterias viables tras 60 días en biopelículas formadas a 25°C y 7 días en biopelículas formadas a 37°C expuestas o no a concentraciones subletales de biocidas.

B	Viabilidad de la biopelícula (log UFC/ml)							
	Día 60 a 25°C				Día 7 a 37°C			
	ST512/ KPC-3	ST258/ KPC-3	ST15/ OXA-48	ST11/ OXA-48	ST512/ KPC-3	ST258/ KPC-3	ST15/ OXA-48	ST11/ OXA-48
CON	5,4	6,2	5,5	4,7	7,4	6,9	7,4	6,6
POV	5,6	5,8	4,5	2,8	5,9	6,0	6,7	5,3
CHX	4,5	6,1	4,7	1,5	7,1	6,9	7,5	5,3
BZK	5,9	5,3	4,9	3,0	7,1	6,8	7,4	5,7
HS	5,4	6,1	5,2	3,2	6,9	6,7	7,4	5,3
ET	5,4	6,2	5,4	3,3	7,1	6,7	7,1	5,6
STE	5,5	6,3	5,8	3,7	7,2	6,5	7,0	5,7
TRI	5,5	6,8	5,1	3,6	6,9	6,6	7,3	5,8

log UFC/ml: logaritmo de unidades formadoras de colonias por ml, B: biocida, CON: control, POV: povidona yodada, CHX: digluconato de clorhexidina, BZK: cloruro de benzalconio, HS: hipoclorito de sodio, ET: etanol, STE: solución hidroalcohólica (Sterillium®) y TRI: triclosán.

La disminución en la viabilidad de las biopelículas expuestas a los biocidas estudiados respecto al control (biopelícula no expuesta a biocidas) a 25°C y 37°C se muestra en las Figuras 27 y 28. Los biocidas que a concentraciones subletales produjeron una mayor reducción en el recuento de bacterias viables en las biopelículas fueron povidona yodada, seguido por digluconato de clorhexidina, tanto a 25°C como a 37°C, seguidos por cloruro de benzalconio a 25°C e hipoclorito de sodio a 37°C (Figuras 27 y 28, Tabla 46). Povidona yodada fue el biocida en el que la reducción significativa en el recuento de bacterias viables se observó en un mayor porcentaje de los días analizados, tanto a 25°C como a 37°C (Figuras 27 y 28, Tabla 47).

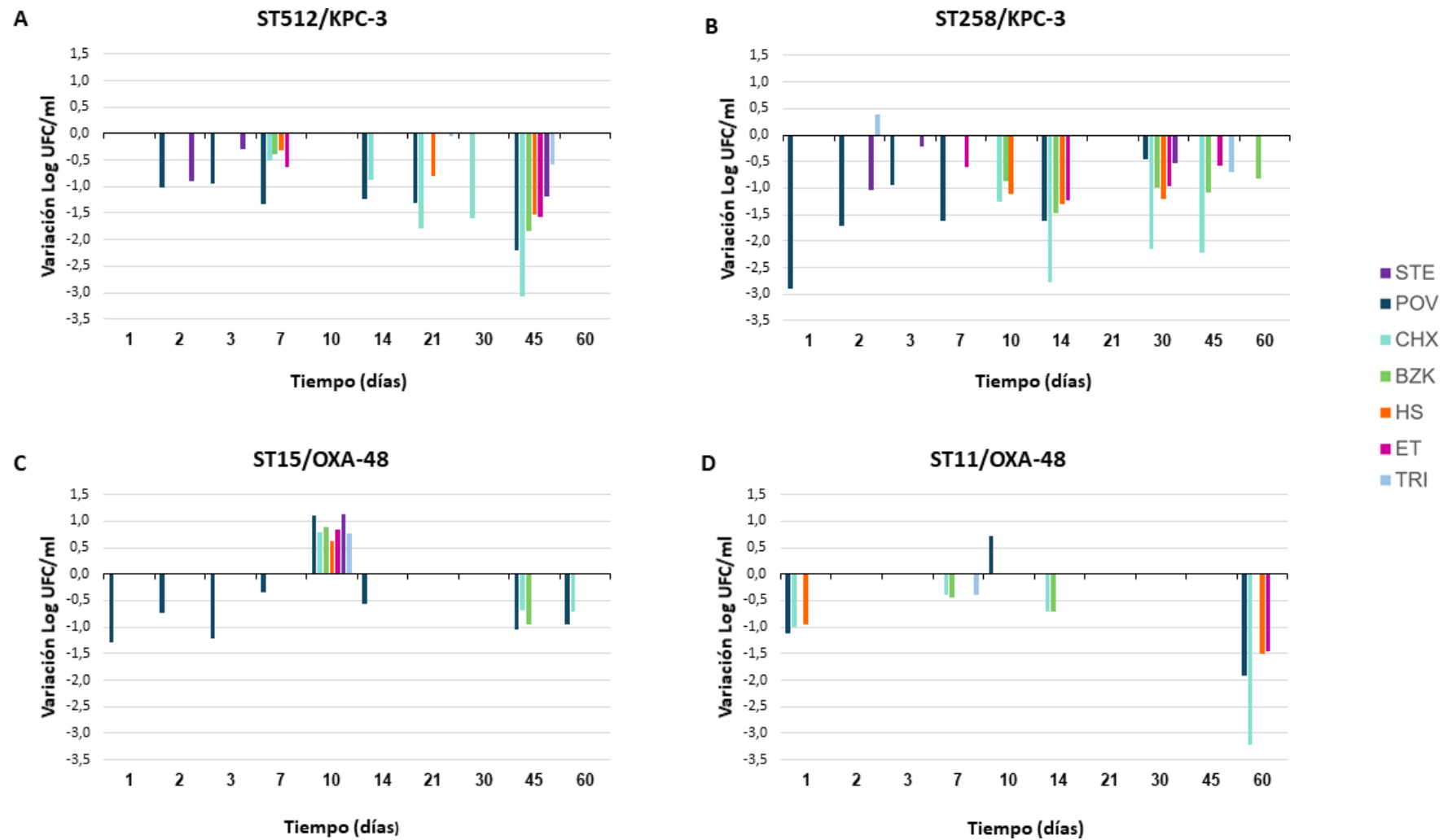


Figura 27. Efecto de 7 biocidas sobre la viabilidad de biopelículas formadas a 25°C de 4 aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos. Únicamente se muestran las diferencias significativas ($p \leq 0,05$). POV: povidona yodada, CHX: digluconato de clorhexidina, BZK: cloruro de benzalconio, HS: hipoclorito de sodio, ET: etanol, STE: solución hidroalcohólica (Sterillium®) y TRI: triclosán.

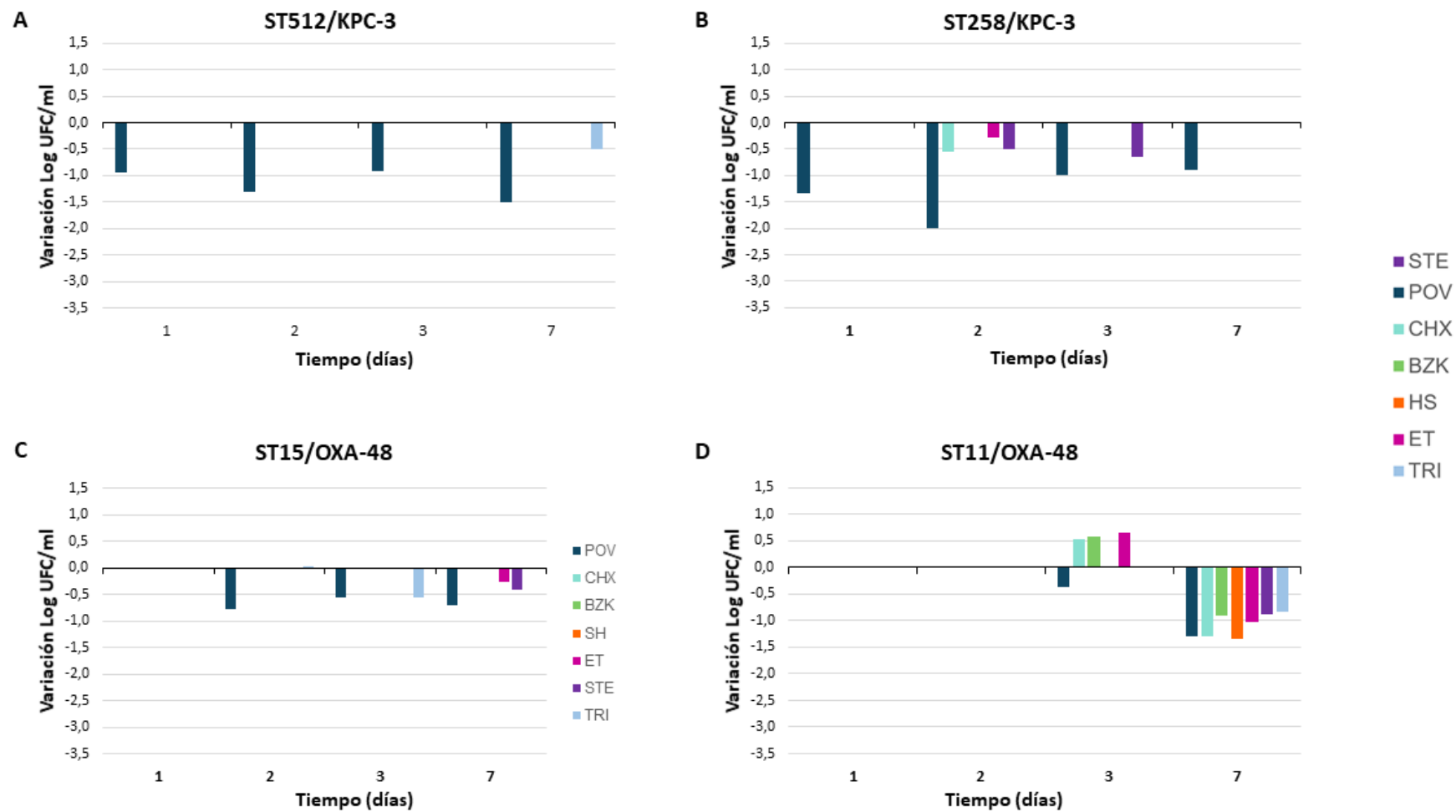


Figura 28. Efecto de 7 biocidas sobre la viabilidad de biopelículas formadas a 37°C de 4 aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos. Únicamente se muestran las diferencias significativas ($p \leq 0,05$). POV: povidona yodada, CHX: digluconato de clorhexidina, BZK: cloruro de benzalconio, HS: hipoclorito de sodio, ET: etanol, STE: solución hidroalcohólica (Sterillium®) y TRI: triclosán.

Tablas 46. Disminución en el recuento de bacterias viables en las biopelículas de 4 aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos expuestas a povidona yodada (A), digluconato de clorhexidina (B), cloruro de benzalconio (C), hipoclorito de sodio (D), etanol al 70% (E), solución hidroalcohólica (F) y triclosán (G). Diferencias significativas ($p \leq 0,05$) respecto al control en negrita.

A	Supervivencia (disminución log UFC/ml) de la biopelícula expuesta a POV													
	Días de incubación a 25°C										Días de incubación a 37°C			
	Clon/ carbapenemasa	1	2	3	7	10	14	21	30	45	60	1	2	3
ST512/KPC-3	-0,5	-1,0	-0,9	-1,3	-0,4	-1,2	-1,3	-0,5	-2,2	0,3	-0,9	-1,3	-0,9	-1,5
ST258/KPC-3	-2,9	-1,7	-0,9	-1,6	-1,0	-1,6	-0,5	-0,5	-0,2	-0,3	-1,3	-2,0	-1,0	-0,9
ST15/OXA-48	-1,3	-0,7	-1,2	-0,3	1,1	-0,6	-0,2	-0,5	-1,0	-0,9	-0,4	-0,8	-0,6	-0,7
ST11/OXA-48	-1,1	-0,4	-0,2	-0,2	0,7	-0,7	-0,4	-0,3	0,0	-1,9	0,0	-0,3	-0,4	-1,3

B	Supervivencia (disminución log UFC/ml) de la biopelícula expuesta a CHX													
	Días de incubación a 25°C										Días de incubación a 37°C			
	Clon/ carbapenemasa	1	2	3	7	10	14	21	30	45	60	1	2	3
ST512/KPC-3	0,0	0,1	0,0	-0,5	0,1	-0,9	-1,8	-1,6	-3,1	-0,8	-0,2	-0,1	0,0	-0,3
ST258/KPC-3	0,2	0,2	-0,1	-0,2	-1,3	-2,8	-1,2	-2,1	-2,2	-0,1	0,0	-0,6	-0,1	0,0
ST15/OXA-48	0,4	0,2	0,3	0,3	0,8	0,1	-0,5	0,4	-0,7	-0,7	0,5	0,2	-0,2	0,1
ST11/OXA-48	-1,0	-0,3	0,0	-0,4	0,0	-0,7	0,2	-0,5	-1,6	-3,2	0,4	0,4	0,5	-1,3

C	Supervivencia (disminución log UFC/ml) de la biopelícula expuesta a BZK													
	Días de incubación a 25°C										Días de incubación a 37°C			
	Clon/ carbapenemasa	1	2	3	7	10	14	21	30	45	60	1	2	3
ST512/KPC-3	0,0	0,2	0,0	-0,4	-0,1	-0,6	0,4	-0,6	-1,8	0,5	-0,3	0,0	0,0	-0,4
ST258/KPC-3	0,0	-0,3	0,0	0,1	-0,9	-1,5	-0,8	-1,0	-1,1	-0,8	0,1	0,0	-0,1	-0,1
ST15/OXA-48	0,5	0,1	0,1	0,3	0,9	0,1	-0,2	-0,1	-0,9	-0,6	0,4	-0,1	-0,3	0,0
ST11/OXA-48	-0,9	-0,4	-0,1	-0,4	0,0	-0,7	0,3	-0,5	-0,7	-1,7	0,3	0,4	0,6	-0,9

D	Supervivencia (disminución log UFC/ml) de la biopelícula expuesta a HS													
	Días de incubación a 25°C										Días de incubación a 37°C			
	Clon/ carbapenemasa	1	2	3	7	10	14	21	30	45	60	1	2	3
ST512/KPC-3	0,2	0,0	0,0	-0,3	-0,3	-0,7	-0,8	-0,6	-1,5	0,1	-0,2	-0,5	0,1	-0,5
ST258/KPC-3	-0,1	-0,1	0,0	-0,3	-1,1	-1,3	-0,8	-1,2	-0,4	-0,1	-0,3	-0,5	-0,3	-0,2
ST15/OXA-48	0,1	0,2	-0,1	0,3	0,6	0,1	0,0	0,0	-0,4	-0,3	0,1	-0,1	-0,4	0,0
ST11/OXA-48	-1,0	-0,2	-0,1	-0,4	0,2	-0,4	0,3	0,1	0,1	-1,5	0,4	0,3	0,5	-1,3

E	Supervivencia (disminución log UFC/ml) de la biopelícula expuesta a ET													
	Días de incubación a 25°C										Días de incubación a 37°C			
	Clon/ carbapenemasa	1	2	3	7	10	14	21	30	45	60	1	2	3
ST512/KPC-3	-0,4	0,0	-0,1	-0,6	-0,1	-0,8	-1,0	-0,5	-1,6	0,1	-0,3	-0,5	-0,3	-0,3
ST258/KPC-3	-0,2	-0,4	0,1	-0,6	-0,4	-1,2	-0,9	-1,0	-0,6	0,1	0,0	-0,3	-0,4	-0,2
ST15/OXA-48	-0,1	-0,1	0,0	0,1	0,8	0,0	-0,4	0,3	-0,6	0,0	0,2	0,0	-0,4	-0,3
ST11/OXA-48	-0,5	-0,4	-0,2	-0,4	0,1	-0,2	0,1	-0,3	-0,4	-1,5	-0,2	0,1	0,7	-1,0

F	Supervivencia (disminución log UFC/ml) de la biopelícula expuesta a STE														
	Días de incubación a 25°C											Días de incubación a 37°C			
	Clon/ carbapenemasa	1	2	3	7	10	14	21	30	45	60	1	2	3	7
ST512/KPC-3	-0,2	-0,9	-0,3	-0,5	0,0	-0,9	-0,5	-0,5	-1,2	0,1	0,0	-0,5	0,0	-0,3	
ST258/KPC-3	-0,3	-1,0	-0,2	-0,3	-0,7	-1,0	-0,6	-0,5	-0,1	0,1	0,2	-0,5	-0,6	-0,4	
ST15/OXA-48	0,0	0,1	0,0	0,3	1,1	-0,2	0,0	-0,1	-0,4	0,3	0,0	0,0	-0,4	-0,4	
ST11/OXA-48	-1,1	0,0	0,1	-0,1	0,4	-0,1	0,0	0,0	0,4	-1,0	0,1	-0,3	0,0	-0,9	

G	Supervivencia (disminución log UFC/ml) de la biopelícula expuesta a TRI														
	Días de incubación a 25°C											Días de incubación a 37°C			
	Clon/ carbapenemasa	1	2	3	7	10	14	21	30	45	60	1	2	3	7
ST512/KPC-3	-0,5	-0,7	-0,9	-0,3	0,4	-0,8	-0,1	1,2	-0,6	0,0	0,1	-0,5	-1,0	-0,5	
ST258/KPC-3	0,3	0,4	0,3	0,2	-0,3	-0,8	-0,7	0,0	-0,7	0,6	0,1	-0,2	-0,2	-0,3	
ST15/OXA-48	0,1	0,1	0,1	0,2	0,8	0,2	0,0	0,3	-0,4	-0,4	0,5	0,0	-0,6	-0,1	
ST11/OXA-48	-0,2	-0,2	-0,1	-0,4	-0,1	-0,4	0,7	0,2	-0,2	-1,1	0,0	-0,1	0,2	-0,8	

Tablas 47. Porcentaje de días en los que se observa una disminución o incremento significativos a 25°C (A) y 37°C (B).

A	Porcentaje de días (n=60) en los que se observa una disminución/incremento estadísticamente significativo de la supervivencia (log UFC/ml) de la biopelícula formada a 25°C expuesta a biocidas							
	Clon/ carbapenemasa	POV	CHX	BZK	HS	ET	STE	TRI
ST512/KPC-3	60%/0%	50%/0%	20%/0%	30%/0%	20%/0%	30%/0%	20%/0%	
ST258/KPC-3	60%/0%	40%/0%	50%/0%	30%/0%	40%/0%	30%/0%	10%/0%	
ST15/OXA-48	70%/10%	20%/10%	10%/10%	0%/10%	0%/10%	0%/10%	0%/10%	
ST11/OXA-48	20%/10%	40%/0%	20%/0%	20%/0%	10%/0%	0%/0%	10%/0%	

B	Porcentaje de días (n=7) en los que se observa una disminución/incremento estadísticamente significativa de la supervivencia (log UFC/ml) de la biopelícula formada a 37°C expuesta a biocidas							
	Clon/ carbapenemasa	POV	CHX	BZK	HS	ET	STE	TRI
ST512/KPC-3	100/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	25/0	
ST258/KPC-3	100/0	25/0	0/0	0/0	25/0	50/0	0/0	
ST15/OXA-48	75/0	0/0	0/0	0/0	25/0	25/0	25/0	
ST11/OXA-48	50/0	25/25	25/25	25/0	25/25	25/0	25/0	

4.3.4.3. Dinámica de formación de biopelículas en presencia de concentraciones subletales de povidona yodada.

A continuación, se expresan los valores medios de biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) y la media del grosor máximo (μm) de las biopelículas formadas en presencia de concentraciones subletales de povidona yodada por los 3 aislados analizados en los días 1, 2 y 6 respectivamente.

ST15/OXA-48 fue el aislado en el que en general se observó una mayor cantidad de biomasa y grosor máximo de la biopelícula ($p \leq 0,01$) en el día 2 y el día 6, mientras que en el día 1 no se

observan diferencias en el grosor máximo respecto los otros dos aislados seleccionados para este estudio (ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3) (**Figuras 29 y 30**). La biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) del aislado ST15/OXA-48 fue $4,7 \pm 2,2$ (día 1); $7,3 \pm 3,5$ (día 2) y $13,2 \pm 4,8$ (día 6) y el grosor máximo (μm) $21,3 \pm 17,8$ (día 1); $25,2 \pm 10,1$ (día 2) y $28,6 \pm 9,4$ (día 6). La biomasa de la biopelícula formada por el aislado ST512/KPC-3 fue $2,1 \pm 1,2$ (día 1); $3,6 \pm 1,7$ (día 2) y $5,4 \pm 1,0$ (día 6) y el grosor máximo $15,2 \pm 6,6$ (día 1); $7,8 \pm 1,7$ (día 2) y $7,7 \pm 1,7$ (día 6). La biomasa de la biopelícula formada por el aislado ST258/KPC-3 fue $2,3 \pm 1,6$ (día 1); $2,9 \pm 1,9$ (día 2) y $5,4 \pm 2,2$ (día 6) y el grosor máximo medio $24,4 \pm 8,4$ (día 1); $17,7 \pm 4,6$ (día 2) y $10,3 \pm 2,8$ (día 6). Los aislados ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3 presentaron valores medios de biomasa similares ($p=0,86$), mientras que en el aislado ST258/KPC-3 se observaron valores medios de grosor máximo superiores a los del aislado ST512/KPC-3 ($p=0,07$; $p\leq 0,01$; $p\leq 0,01$; días 1, 2 y 6 respectivamente) (**Figuras 29 y 30**).

Respecto a la dinámica de formación de la biopelícula en presencia de povidona yodada, en el aislado ST15/OXA-48 se observó un aumento significativo de la cantidad de biomasa de la biopelícula en el día 6 respecto a los días 1 y 2 ($p\leq 0,01$; ambos), mientras que las diferencias en el grosor máximo no fueron significativas en el día 2 respecto al día 1 ($p=0,56$), ni en el día 6 respecto al día 1 ($p=0,38$), ni en el día 6 respecto al día 2 ($p=0,39$). En el aislado ST512/KPC-3 se observó un aumento significativo de la biomasa de la biopelícula en el día 2 respecto al día 1 ($p=0,03$), y en el día 6 respecto a los días 1 ($p\leq 0,01$) y 2 ($p\leq 0,01$). Respecto al grosor máximo de la biopelícula, se observó una disminución significativa en los días 2 y 6 respecto del primer día ($p\leq 0,01$; ambos). En el aislado ST258/KPC-3 se observó un aumento significativo de la cantidad de biomasa de la biopelícula en el día 6 respecto a los días 1 y 2 ($p\leq 0,01$; ambos). Además, se observó una disminución del grosor máximo de la biopelícula en el día 6 respecto a los días 1 y 2 ($p\leq 0,01$; ambos) (**Figuras 29 y 30**).

Las imágenes tridimensionales y las secciones transversales de las biopelículas formadas en presencia de povidona yodada obtenidas por CLSM mostraron que la biopelícula del aislado ST15/OXA-48, a pesar de haber cubierto toda la superficie de la "Flow cell" desde el primer día, no crece en altura hasta el segundo día, y que en el día 6, a pesar de formar una estructura tridimensional, no cubre toda la superficie. Respecto a las biopelículas de los aislados ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3 se observaron microcolonias en el día 1 y la biopelícula recubrió toda la superficie en los días 2 y 6, pero la monocapa no ganó altura en los días 2 y 6 (**Figura 30**).

Respecto al efecto de la povidona yodada en la dinámica de formación de biopelículas se observó que en el aislado ST15/OXA-48 expuesto a povidona yodada se produce un aumento significativo de la biomasa en el día 6 ($p\leq 0,01$), y una disminución significativa del grosor máximo

en los días 1 y 2 ($p=0,04$ y $p=0,01$; respectivamente) respecto al control sin povidona yodada. En el aislado ST512/KPC-3 expuesto a povidona yodada se observó una disminución significativa en la cantidad de biomasa en el día 2 ($p\leq 0,01$), y una disminución significativa del grosor máximo en los días 2 y 6 ($p\leq 0,01$; ambos) respecto a lo observado en ausencia de povidona yodada. En el aislado ST258/KPC-3 no se observaron diferencias significativas en la cantidad de biomasa en presencia o ausencia de povidona yodada en los días 1, 2 y 6 ($p=0,53$; $p=0,53$; $p=0,69$, respectivamente), mientras que se observó un aumento significativo en el grosor máximo el primer día ($p=0,01$) y una disminución significativa en el día 6 ($p=0,05$) en presencia de povidona yodada respecto a la biopelícula formada en ausencia de povidona yodada (**Figuras 29 y 30**).

Los recuentos de bacterias viables (UFC/ml) en ausencia de povidona yodada fueron $4,5 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^8$ (aislado ST15/OXA-48), $7,4 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$ (aislado ST512/KPC-3) y $3,5 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^7$ (aislado ST258/KPC-3). En presencia de povidona yodada los recuentos de bacterias viables fueron $5,8 \times 10^8 \pm 9,6 \times 10^7$ (aislado ST15/OXA-48), $4,7 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$ (aislado ST512/KPC-3) y $6,3 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$ (aislado ST258/KPC-3). Las diferencias observadas entre los aislados (ST15/OXA-48, ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3) no fueron estadísticamente significativas en ausencia ($p=0,10$) ni en presencia de povidona yodada ($p=0,20$).

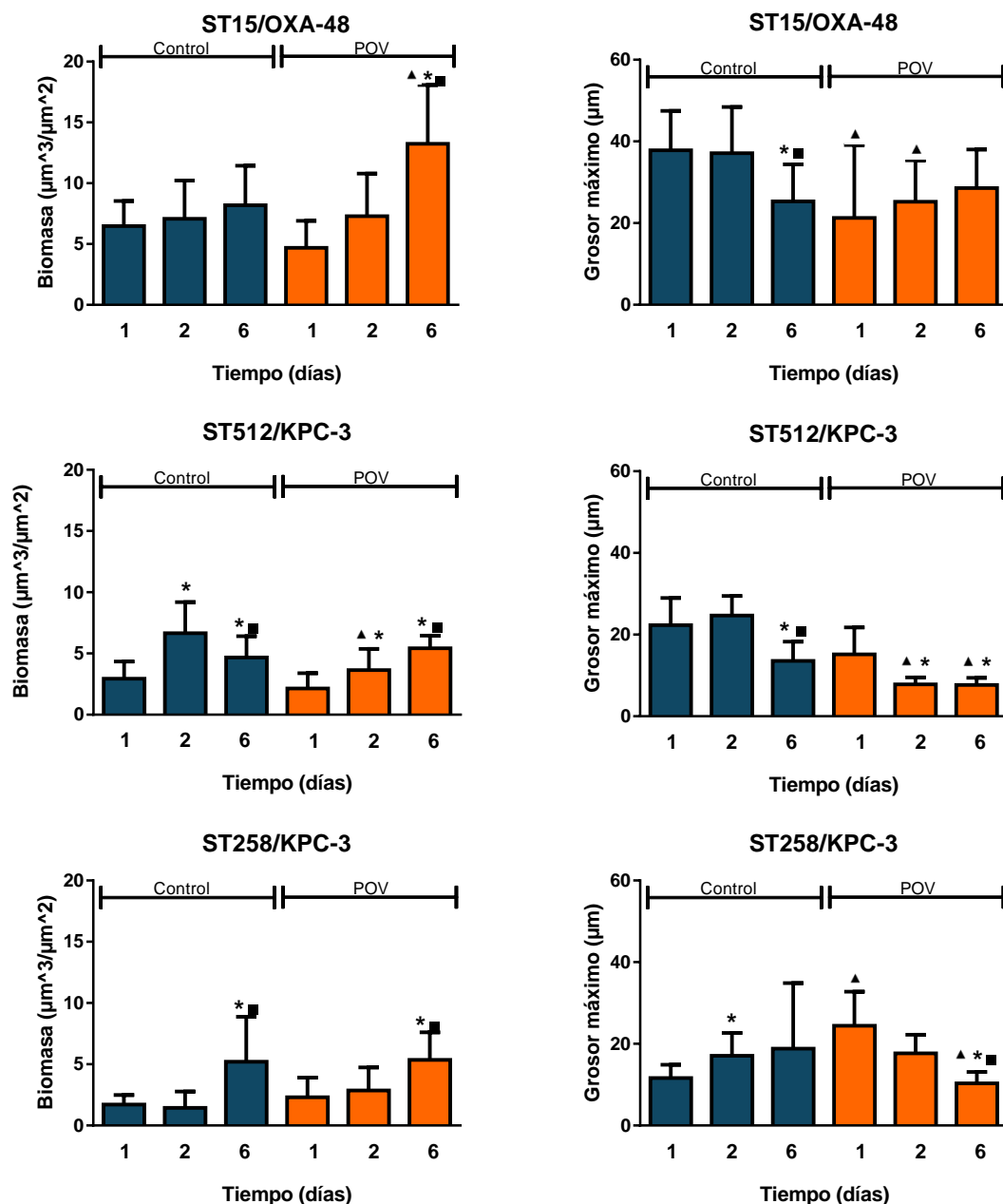


Figura 29. Efecto de la povidona yodada (POV) sobre la cantidad de biomasa (A) y el espesor máximo de biopelículas (B) de 3 aislados de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos. Medias y las desviaciones estándar (barras de error) de al menos tres experimentos independientes. ▲, diferencia estadísticamente significativa entre biopelícula expuesta a povidona yodada expuesta y el control, en cada momento del tiempo. *, diferencia estadísticamente significativa respecto al día 1. ■, diferencia estadísticamente significativa respecto al día 2.

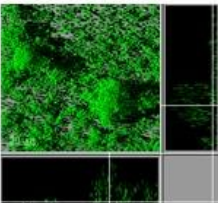
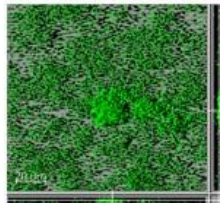
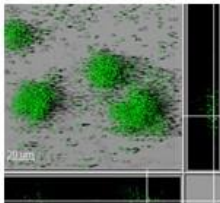
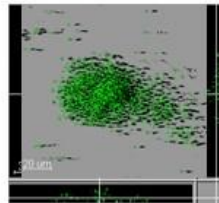
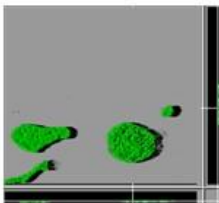
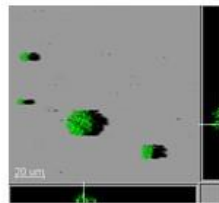
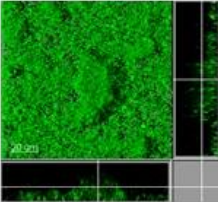
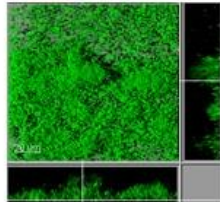
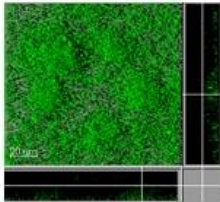
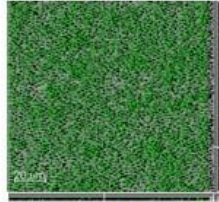
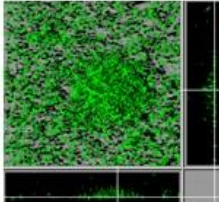
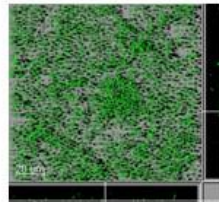
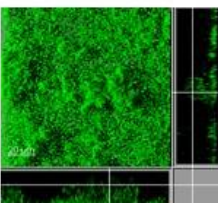
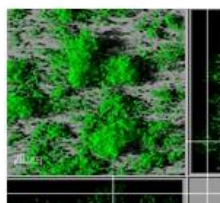
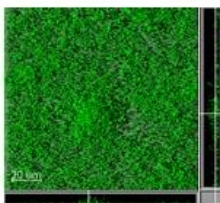

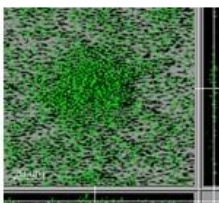

Día/ biomasa/ Grosor máximo	ST15/OXA-48		ST512/KPC-3		ST258/KPC-3	
	Control	Povidona yodada	Control	Povidona yodada	Control	Povidona yodada
Día 1						
Biomasa	6,5 ± 2,1	4,7 ± 2,2	2,9 ± 1,4	2,1 ± 1,2	1,7 ± 0,8	2,3 ± 1,6
Grosor máximo	37,8 ± 9,7	21,3 ± 17,8	22,3 ± 6,7	15,2 ± 6,6	11,6 ± 3,3	24,4 ± 8,4
Día 2						
Biomasa	7,1 ± 3,2	7,3 ± 3,5	6,7 ± 2,5	3,6 ± 1,7	1,4 ± 1,3	2,9 ± 1,9
Grosor máximo	37,1 ± 11,3	25,2 ± 10,1	24,7 ± 4,8	7,8 ± 1,7	17,1 ± 5,6	17,7 ± 4,6
Día 6						
Biomasa	8,2 ± 3,3	13,2 ± 4,8	4,7 ± 1,7	5,4 ± 1,0	5,2 ± 3,7	5,4 ± 2,2
Grosor máximo	25,3 ± 9,1	28,6 ± 9,4	13,6 ± 4,7	7,7 ± 1,7	14,8 ± 8,3	10,3 ± 2,8

Figura 30. Imágenes tridimensionales y cortes transversales, biomasa ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) y espesor (μm) de biopelículas expuestas o no (control) a povidona yodada. Las biopelículas se tiñeron con FilmTracer™ LIVE / DEAD® Biofilm Viability Kit los días 1, 2 y 6 y únicamente se tuvieron en cuenta los datos de bacterias viables.

5. Discusión

La diseminación de clones epidémicos de Kp-PC está suponiendo un serio problema de salud mundial con importantes repercusiones clínicas, terapéuticas y epidemiológicas^{16,96}. El éxito de estos clones epidémicos como patógeno nosocomial se ha relacionado con su capacidad para adquirir plásmidos que contienen genes de resistencia antimicrobiana, teniendo especial relevancia los que codifican carbapenemasas^{79,96}. Además de la adquisición de resistencia a los antimicrobianos, pueden existir otros factores que contribuyan en la capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas, favoreciendo la capacidad de persistencia y de diseminación de estos clones y contribuyendo en mayor o menor grado en su comportamiento epidémico^{16,96}. Entre algunos de estos factores destacan la adquisición o desarrollo de SRB o la producción de biopelículas. Ambos factores pueden contribuir en el fracaso o la ineficacia de las estrategias de limpieza y desinfección y, por tanto, facilitar el establecimiento de reservorios ambientales de Kp-PC en el entorno hospitalario^{22,78,107,109,184,247}.

En este contexto, se ha realizado el presente estudio en aislados representativos de Kp-PC pertenecientes a clones epidémicos y clones no epidémicos con el objetivo de analizar i) la actividad *in vitro* de biocidas habitualmente utilizados en el entorno hospitalario y sociosanitario, ii) la posible asociación entre SRB y la presencia de genes de bombas de expulsión de biocidas, iii) la capacidad de formación de biopelícula y iv) el efecto de concentraciones subletales de algunos biocidas sobre la formación de biopelícula. La información obtenida en este estudio puede ser útil en el diseño de nuevas estrategias de prevención y control de infecciones causadas por Kp-PC que contribuyan a reducir las tasas de resistencia antimicrobiana y la diseminación de clones epidémicos de Kp-PC.

A pesar de que la SRB no está tan bien estudiada como la resistencia a los antibióticos, en los últimos años se ha incrementado el número de publicaciones que evidencian que las bacterias pueden adquirir o desarrollar mecanismos de tolerancia o SRB^{130,316,317}. Una de las principales dificultades o limitaciones que tienen los estudios relacionados con SRB es la ausencia de métodos estandarizados, sencillos y reproducibles, lo que dificulta la comparación de resultados entre diferentes trabajos y limita la aplicabilidad o utilidad de la determinación de SRB en los laboratorios de Microbiología Clínica¹⁷⁴. Febler y colaboradores propusieron dos métodos estandarizados para estudiar la sensibilidad a biocidas; uno basado en macrodilución y otro en microdilución, ambos realizados en caldo TSB doble concentrado, con lectura tras 24h de incubación a 37°C^{318,319}. Los protocolos fueron publicados en *Veterinary Microbiology* en 2018 y 2020, respectivamente, pero hasta el momento no se ha generalizado su uso en los laboratorios clínicos^{318,319}. Uno de los métodos más sencillos y utilizados para el estudio de sensibilidad a

biocidas es la determinación de la CMI. La utilidad de este método genera cierta controversia ya que los biocidas generalmente se utilizan a concentraciones muy superiores a las analizadas por esta técnica, pero pueden ser útiles como indicador de presencia de mecanismos de SRB³¹⁶. Una limitación evidente del uso de los valores de CMI para definir y diferenciar cepas sensibles de cepas resistentes o tolerantes a biocidas es la ausencia de comités que establezcan puntos de corte de CMI para estos compuestos, aunque sí se han propuesto puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) para algunos biocidas que podrían tener cierta utilidad en la detección de SRB¹⁷⁵. En el caso de *K. pneumoniae*, los puntos de corte ECOFF (mg/l) propuestos por Morrissey y colaboradores basados en la distribución de las CMI de 50 aislados de *K. pneumoniae* son de 2 mg/l para triclosán, 64 mg/l para digluconato de clorhexidina, 32 mg/l para cloruro de benzalconio y 8,2 g/l de clorina activa para hipoclorito sódico, determinados por microdilución en caldo siguiendo la metodología CLSI¹⁷⁵. El número de aislados utilizados y la ausencia de caracterización de los mismos podría limitar la utilidad de estos valores para detectar aislados con SRB. Aun así, aplicando los puntos de corte epidemiológicos a los valores de CMI obtenidos en este trabajo a 37°C en MHB, todos los aislados de Kp-PC analizados serían sensibles a estos biocidas. Otro aspecto a tener en cuenta es que en la mayoría de los estudios en los que se analiza la actividad *in vitro* de biocidas, la determinación de la CMI suele realizarse en caldo nutritivo a 37°C. Estas condiciones experimentales no representan las situaciones reales en las que los biocidas se utilizan, por lo que no permiten analizar el efecto que las diferentes condiciones ambientales puedan tener sobre la actividad de los biocidas y pueden subestimar la presencia de mecanismos de SRB^{235,320}. A pesar de las limitaciones descritas, la determinación de la CMI de los biocidas en el presente estudio ha sido muy útil para determinar cuáles son los biocidas con mayor actividad *in vitro* frente a Kp-PC (triclosán, digluconato de clorhexidina, cloruro de benzalconio y etanol), determinar si existen diferencias significativas entre los aislados de Kp-PC en función del tipo de clon (epidémico vs no epidémico) y el tipo carbapenemasa y, por otro lado, si la temperatura y el medio de cultivo afectan los valores de CMI obtenidos. Es importante destacar que no se observaron diferencias en la actividad *in vitro* de los biocidas estudiados entre los aislados de clones epidémicos y los aislados de clones no epidémicos, lo que descartaría que los aislados de clones epidémicos de Kp-PC estudiados sean más tolerantes a biocidas que los no epidémicos. No obstante, estos resultados deben interpretarse con cautela debido al tamaño muestral de este estudio, por lo que se requieren nuevos estudios con mayor número de aislados. Del mismo modo, los resultados obtenidos no permiten establecer una relación entre la SRB (valores de CMI) y la producción de ciertas carbapenemasas, con la única excepción de los aislados productores de VIM-1, que al ser analizados en MHB fueron más resistentes a cloruro de benzalconio que los aislados productores

de otro tipo de carbapenemasa. Esto podría deberse a una posible co-movilización del gen que codifica esta carbapenemasa (*bla*_{VIM-1}) junto con genes que codifican bombas que expulsan cloruro de benzalconio, como *qacEΔ1*. Esta hipótesis se desarrolla de forma más extensa en el apartado de la discusión que analiza la asociación de las bombas de expulsión con la SRB.

En relación con las tasas de crecimiento y los tiempos de generación, se ha observado que a 25°C los aislados de clones epidémicos tienen una tasa de crecimiento inferior y un tiempo de generación mayor que los aislados de clones no epidémicos. La razón por la cual los clones epidémicos pueden tener un *fitness* inferior a los no epidémicos son desconocidos, aunque puede deberse al coste asociado a la adquisición de determinantes de patogenicidad, supervivencia y resistencia característicos de este tipo de clones³²¹⁻³²³. En un estudio realizado por Benenson y colaboradores, en el cual se realizaron ensayos de competición entre dos aislados de *K. pneumoniae* portadores del mismo plásmido codificante de *bla*_{KPC-3} o muy similar, se observó que el aislado perteneciente a un clon no epidémico (ST321) presentaba un *fitness* superior al del aislado del clon epidémico ST512³²³. En ese estudio también se observó que el aislado del clon epidémico presentaba un mayor número de determinantes de resistencia y un plásmido adicional respecto al no epidémico³²³. Del mismo modo, el estudio del resistoma de los 17 aislados de Kp-PC estudiados en nuestro trabajo pone de manifiesto que los clones epidémicos presentan un mayor número de determinantes de resistencia que los no epidémicos. Además, los resultados obtenidos en nuestro estudio sugieren que el coste asociado a la adquisición de estos determinantes de resistencia podría tener mayor impacto en condiciones adversas, cómo por ejemplo una temperatura de crecimiento inferior a la óptima.

Respecto al efecto de la temperatura y de los medios de cultivo en la actividad de los biocidas, los resultados obtenidos en este trabajo muestran el impacto de estos factores sobre los valores de CMI, y evidencian la necesidad de estandarización de un método que pueda ser utilizado de rutina en los centros sanitarios para la detección de aislados potencialmente tolerantes a los biocidas utilizados en estos centros. Los resultados obtenidos indican que la temperatura de incubación puede tener un discreto efecto sobre los valores de CMI obtenidos. Se observó que las medias de los valores de CMI de algunos biocidas fueron algo mayores a 37°C que a 25°C. No obstante, estas diferencias fueron discretas y únicamente se observaron diferencias superiores a 1 dilución en un porcentaje elevado de los aislados (47%) con digluconato de clorhexidina analizado en MHB. El efecto de la temperatura en los valores de CMI de los biocidas podría deberse a la combinación de diversos factores como diferencias en la capacidad de crecimiento del microorganismo en función de la temperatura o a diferencias en la estabilidad

térmica del producto³²⁴. Por un lado, la obtención de unos valores de CMI algo superiores a 37°C respecto a 25°C, podría ser debido a que los aislados estudiados tengan una capacidad de crecimiento superior a 37°C que a 25°C. Diversos estudios, publicados en su mayoría en los años 80 y 90, analizaron el impacto de la temperatura en la tasa de crecimiento de *K. pneumoniae*, siendo refutados en publicaciones más recientes. Estos trabajos demostraron que *K. pneumoniae* es capaz de crecer en un rango amplio de temperaturas (17-46°C) y, a pesar de que presentan cierta variabilidad a la hora de definir una temperatura óptima de crecimiento (33,8-37°C), esta es más próxima a 37°C que a 25°C³²⁵⁻³²⁹. A pesar de ello, los resultados obtenidos en las curvas de crecimiento indican que el efecto de la temperatura en la capacidad de crecimiento de los aislados de Kp-PC estudiados en nuestro trabajo fue discreto y dependiente del medio de cultivo. Por otra parte, la temperatura podría afectar a la estabilidad del biocida siendo menor a 37°C que a 25°C. En el caso de los antimicrobianos, Lallemand y colaboradores estudiaron esta posibilidad y observaron una disminución de la concentración *in vitro* de ciertos antimicrobianos (p. ej. doxicilina, claritromicina, amoxicilina, cefotaxima, eritromicina, ciprofloxacino) tras 24 horas de incubación en MHB a 37°C³³⁰. A pesar de ello, las diferencias observadas en los valores de CMI obtenidas en un aislado de *E. coli* y uno de *S. aureus* utilizando el método estándar o manteniendo constante la concentración de los antimicrobianos mediante adición de los mismos durante el periodo de incubación, no fueron superiores a 1 dilución de diferencia³³⁰. Lallemand y colaboradores concluyeron que el reducido impacto de la degradación de los antimicrobianos en los valores de CMI puede deberse a que la tasa de generación de estas dos especies bacterianas es rápida (25 y 29 minutos respectivamente) en relación con la velocidad de degradación del antimicrobiano³³⁰. En el caso de los biocidas, parece poco probable que las diferencias observadas puedan deberse a una disminución de actividad durante la incubación a 37°C respecto a 25°C, puesto que se han sometido a múltiples estudios para su aprobación, incluyendo los que comprueban su estabilidad en diferentes condiciones. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la variación de temperatura analizada no tiene un efecto importante sobre la actividad de los biocidas estudiados. Aun así, no puede descartarse que la exposición de los biocidas a temperaturas diferentes de las analizadas pueda tener impacto, lo que debería ser tenido en cuenta en el diseño de estrategias de limpieza y desinfección en el entorno hospitalario y socio-sanitario.

A diferencia de lo observado con la temperatura, el medio de cultivo utilizado tuvo un gran impacto sobre los valores de CMI, siendo mayores los obtenidos en MHB que los determinados en M9 para todos los biocidas analizados, a excepción de triclosán. En el caso de los antimicrobianos, el impacto del medio de cultivo fue descrito en los años 70, en diversas técnicas

de estudio de sensibilidad, como la microdilución y la difusión en disco, llevó a la estandarización de las mismas y se asoció a diferencias en la composición de los medios^{331,332}. En el caso de los biocidas, la reducción de la eficacia en MHB puede deberse a una mayor presencia de materia orgánica en este medio respecto al medio mínimo M9 o a una mayor capacidad de crecimiento de Kp-PC en MHB. El medio MHB contiene caldo de carne, hidrolizado de caseína y almidón, mientras que el medio mínimo M9 está compuesto principalmente por sales y glucosa al 20%. La reducción en la eficacia de los biocidas en presencia de materia orgánica ha sido ampliamente descrita, y puede deberse a que a que la materia orgánica actúe como barrera física frente al biocida o a que su interacción química con el biocida genere complejos menos activos^{97,228,333,334}. Un ejemplo de ello se encuentra en el estudio de Kawamura-Sato y colaboradores en el que se observó la reducción en la actividad *in vitro* de cuatro biocidas, incluyendo digluconato de clorhexidina y cloruro de benzalconio, frente a aislados de *A. baumannii* en presencia de materia orgánica³³⁴. Por el contrario, se ha descrito que los compuestos fenólicos como triclosán mantienen su actividad en presencia de sustancias orgánicas, lo que iría en consonancia con el hecho de no observar diferencias en los valores de CMI determinados en MHB y en M9 para este biocida¹¹⁴. Respecto a la capacidad de crecimiento, los resultados de las curvas de crecimiento indican que los aislados de Kp-PC estudiados generan poblaciones de mayor tamaño en medio MHB, aunque requieren más tiempo para alcanzar la fase estacionaria, mientras que en medio M9 la población máxima está más limitada, pero se alcanza en menor tiempo. Esto podría ser debido a que, a pesar de que el medio M9 contiene menor cantidad de nutrientes que el medio MHB, su fuente de carbono (la glucosa) presenta mayor disponibilidad, permitiendo un rápido crecimiento inicial que se vería ralentizado tras el consumo de la glucosa por la limitación de nutrientes en el medio. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la actividad de los biocidas analizados, a excepción de triclosán, puede verse reducida en ambientes que contengan residuos orgánicos, por lo que una correcta limpieza previa a su uso es esencial para mantener su eficacia.

Los resultados de CMI para triclosán obtenidos en este trabajo muestran que es el biocida en el que se observa menor variación en los valores de CMI determinados a diferentes temperaturas o medios de cultivo. Esto podría estar relacionado con la elevada estabilidad de este compuesto, como demuestra su detección en el medio ambiente y bioacumulación en animales y el ser humano (p. ej. muestras de orina)^{130,177,335}. Triclosán es liberado al medio ambiente principalmente desde el ámbito doméstico debido a una eliminación incompleta en el tratamiento de aguas residuales³³⁵. Se ha detectado a diferentes concentraciones en agua potable (p. ej. 2,54 nM en estados Unidos; 0,356 nM en Taiwán), agua de río (p. ej. 18,9 nM en

India; 0,770 nM en España; 0,107 nM en Japón), organismos acuáticos (p. ej. peces, mejillones) o muestras de suelo (p. ej. 331,6–552,6 nM/kg en Estados Unidos)³³⁵. Respecto al ser humano, en un estudio realizado en EEUU en 2003-2004 se detectó triclosán en la orina del 75% de los sujetos estudiados (población civil no institucionalizada), aunque las concentraciones detectadas fueron muy variables (2,4–3.790 µg/l)³³⁶. Además, en un trabajo realizado en personal sanitario, se relacionó el uso de jabones antibacterianos que contenían triclosán con concentraciones más altas de este biocida en orina y concluyeron que su uso puede suponer una exposición laboral a este biocida potencialmente relevante³³⁷. La evidencia acumulada sobre triclosán ha provocado una tendencia creciente en la reducción de su uso ya que se desconoce si esta exposición puede suponer riesgos para la salud, favorecer el desarrollo de tolerancia al biocida y/o generar resistencia cruzada a antimicrobianos^{114,177}. Como se comentó en el apartado de introducción, en 2019 la FDA clasificó a triclosán como compuesto no admisible en productos desinfectantes de manos de uso doméstico, y en la Unión Europea desde 2010 es necesario demostrar que su adición al producto supone un beneficio para la salud para que pueda ser aprobado^{169,170,338}.

Uno de los principales mecanismos de SRB, ya sea innata como adquirida, son las bombas de expulsión¹¹⁴. En este trabajo se estudió la presencia de genes que codifican bombas de expulsión y no se observó asociación con el tipo de clon (epidémico o no epidémico) ni con los valores de CMI de los biocidas que pueden ser sustrato de estas bombas de expulsión. Existe cierta controversia en la literatura sobre la relación entre la presencia de genes que codifican bombas de expulsión y la SRB. Por un lado, en algunos estudios, como en el realizado por Vijayakumar y colaboradores, no se observó asociación entre la presencia de los genes *cepA*, *qacA* o *qacE* y la sensibilidad reducida a cloruro de benzalconio, cetrimida y digluconato de clorhexidina en aislados de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*¹⁹⁷. En un estudio publicado por Azadpour y colaboradores tampoco se encontró relación entre la presencia de los genes *qacED1* y *cepA* y la sensibilidad reducida a compuestos de amonio cuaternario (cloruro de didecil dimetil amonio) en 85 aislados clínicos de *K. pneumoniae*^{197,339}. Por otro lado, en otros trabajos, como el realizado por Abuzaid y colaboradores en aislados clínicos de *K. pneumoniae*, se observó una estrecha asociación entre la actividad de bombas de expulsión y la presencia del gen *cepA*, y la sensibilidad reducida a clorhexidina y productos que lo contienen (Medihex-4)¹⁹⁸. Por el contrario, en ese mismo trabajo no se observó asociación entre la actividad de bombas de expulsión y la sensibilidad reducida a cloruro de benzalconio, clorhidrato de biguanida polimérico (Trigene) y productos que contienen triclosán como principio activo (Mediscrub)¹⁹⁸. Las diferencias observadas en estos trabajos pueden deberse a diferencias metodológicas,

diferencias intrínsecas de los aislados analizados o a la combinación en el mismo aislado de diversos mecanismos relacionados con SRB, como la actividad conjunta de varias bombas de expulsión o el incremento en la expresión de los genes que codifican bombas de expulsión, haciendo que la presencia única de uno de estos genes no sea suficiente para producir un incremento significativo en la CMI de los biocidas.

La mayoría de los genes de bombas de expulsión analizados en este trabajo fueron detectados en todos los aislados (*cepA*, *acrAB*, *kpnEF* y *oqxAB*) o en ninguno de los aislados (*qacA* y *qacE*). Esto sugiere que la presencia o ausencia de estos genes no se relaciona con el tipo de clon ni con los valores de CMI de los biocidas analizados, aunque no puede descartarse que las variaciones en la CMI puedan deberse a diferencias en el nivel de expresión de algunas o varias de estas bombas. La detección de los genes *acrAB*, *kpnEF*, *cepA* y *oqxAB* en todos los aislados estudiados está en línea con resultados obtenidos en trabajos previos realizados en Kp-PC y *K. pneumoniae* no productor de carbapenemasa^{204,216,340-344}. La elevada conservación de las secuencias de estos genes en los aislados analizados en este estudio (100-97,4%) puede deberse a que las bombas de expulsión son elementos filogenéticamente antiguos con múltiples e importantes funciones en la fisiología bacteriana (p. ej. resistencia antimicrobiana, comunicación entre bacterias mediante *quorum sensing* y virulencia)³⁴⁵. En el caso de la bomba AcrAB, se ha demostrado que tiene un papel significativo en la tolerancia y adaptación a las sales biliares en *Enterobacteriales* como *E. coli* y *S. enterica*, lo que podría contribuir a su supervivencia en el tracto gastrointestinal^{346,347}. La bomba de expulsión KpnEF parece estar implicada en la motilidad bacteriana y en la síntesis de la cápsula de *K. pneumoniae*, estando posiblemente implicada en el transporte de los polisacáridos necesarios para su formación y, por tanto, podría tener un papel relevante en la virulencia de esta especie bacteriana²⁰⁰. Además, esta bomba también está involucrada en la respuesta al estrés osmótico o a las sales biliares en *K. pneumoniae*, facilitando su supervivencia en el tracto digestivo superior²⁰⁰. Por otro lado, la hipótesis de que las bombas de expulsión CepA y OqxAB pueden suponer una ventaja para las bacterias que las expresan, estaría respaldada por la elevada prevalencia de los genes que las codifican. El gen *cepA* está ampliamente distribuido en *K. pneumoniae* (87-100% de los aislados en función del estudio), y se han identificado proteínas homólogas a CepA (83-85% de homología) en múltiples especies de *Enterobacteriales* (p. ej. *Shigella flexneri*, *E. coli* o *Salmonella* spp.)^{197,198,348}. Finalmente, *oqxAB* se ha convertido en un determinante de resistencia a quinolonas mediado por plásmidos muy prevalente en *Enterobacteriales* que se sospecha que fue adquirido por plásmidos del cromosoma de *K. pneumoniae*³⁴⁹. Wong y colaboradores

estudiaron una colección de más de 90 aislados de *K. pneumoniae*, algunos de ellos aislados hace más de 30 años, y el operón *oqxAB* fue detectado en todos ellos³⁴⁹.

Por otro lado, los genes *smvA* y *smvR* se detectaron en casi todos los aislados estudiados, lo que sugiere que esta bomba de expulsión también está altamente conservada en Kp-PC. La alta prevalencia observada en nuestro estudio está en la línea con lo observado por Slipski y colaboradores, los cuales detectaron *smvA* en más del 75% de las secuencias de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* depositadas en la base de datos de nucleótidos de NCBI, utilizando tBLASTn³⁵⁰. Entre las funciones de esta bomba se ha descrito su implicación en la sensibilidad reducida a clorhexidina en otras especies de *Enterobacterales* (p. ej. *Enterobacter* spp. and *S. entérica* serovar Typhimurium)^{202,351}.

La prevalencia de los genes de resistencia a QAC en *K. pneumoniae* es variable, según indican diversos estudios^{180,197,198,216,352}. En nuestro trabajo no se detectaron los genes *qacA* y *qacE* en ninguno de los aislados analizados. La ausencia de *qacA* está en consonancia con lo descrito por Chen y colaboradores en cuyo trabajo no se detectó el gen *qacA/B* en ninguno de los aislados de *K. pneumoniae* o de *E. coli* productores de carbapenemasa analizados³⁵². Por el contrario, los resultados de nuestro estudio se contraponen a los obtenidos por otros autores que describen prevalencias del 41 al 44% en aislados clínicos de *K. pneumoniae*^{197,216}. Las diferencias observadas entre estos trabajos podrían deberse a diferencias metodológicas o a sesgos de selección entre las colecciones de aislados estudiadas, lo que sugiere que la presencia o ausencia del gen *qacA* pueda ser dependiente del aislado. Por otro lado, la ausencia del gen *qacE* en los aislados estudiados en nuestro trabajo concuerda con la baja prevalencia descrita previamente en aislados de *K. pneumoniae* por diversos autores (1/64 en el trabajo de Abuzaid y colaboradores y 1/9 en el de Vijayakumar y colaboradores) o la ausencia de este gen descrita por Wand y colaboradores, tanto en aislados de *K. pneumoniae* de la era previa al descubrimiento de los antibióticos como en aislados más modernos, lo que sugiere que la adquisición de *qacE* no supone una ventaja evolutiva para este microorganismo^{180,197,198}. El gen *qacEΔ1* solo se detectó en el 47% de los aislados, en línea con los resultados obtenidos por Guo y colaboradores que detectaron este gen en el 59% de los aislados de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos²¹⁶. Aunque en ninguno de los 17 aislados de Kp-PC analizados en nuestro estudio se observó asociación entre la presencia del gen *qacEΔ1* y los valores de CMI de los biocidas que esta bomba puede expulsar (digluconato de clorhexidina y cloruro de benzalconio), es importante resaltar que la presencia del gen *qacEΔ1* se asoció con la del gen *bla_{VIM-1}*. Esto podría explicarse por la posible co-movilización de estos dos determinantes genéticos de

resistencia en un mismo EGM, probablemente en integrones de clase I. La presencia conjunta de *qacEΔ1* y *bla_{VIM-1}* en integrones de clase I se ha descrito en aislados de *Enterobacterales* procedentes de hospitales españoles en 2009, incluyendo *K. pneumoniae*³⁵³. Estos integrones típicamente contienen los genes *qacEΔ1* y *sul1* en el segmento 3' y son capaces de integrar casetes de genes de resistencia en su región variable, siendo frecuentes los genes de carbapenemasas de tipo IMP y VIM³⁵³⁻³⁵⁵. Los resultados obtenidos en este trabajo apuntan a que estos determinantes genéticos de resistencia pueden haber sido adquiridos por los aislados de Kp-PC de forma conjunta, y sugieren que la presión selectiva ejercida por cloruro de benzalconio, biocida expulsado por la bomba *qacEΔ1*, podría tener cierto papel en la co-selección de resistencia a carbapenémicos mediada por carbapenemasas de tipo IMP y VIM.

El análisis de las secuencias de los genomas de los aislados de Kp-PC permitió determinar que la identidad de las secuencias de los genes que codifican las bombas de expulsión analizadas está bastante conservada, a excepción del aislado ST899/OXA-48. Este aislado es filogenéticamente el más lejano de la colección y, tras el análisis de la secuencia, fue reclasificado como *K. quasipneumoniae*. El análisis de las secuencias obtenidas también nos permitió detectar una inserción de 21 nucleótidos en la secuencia del gen *kpnF* del aislado ST101/KPC-2. En la base de datos de secuencias de referencia de NCBI (RefSeq) hay 22 entradas del gen *kpnF* que presentan la misma inserción, además de la obtenida en nuestro estudio. De estos 22 aislados, se conoce el secuenciotipo en 19 aislados y 15 pertenecen al ST101³⁵⁶.

Otro mecanismo que podría tener un papel relevante en la persistencia y diseminación de clones epidémicos de Kp-PC es la formación de biopelícula. La biopelícula bacteriana constituye un mecanismo de defensa muy efectivo frente a sustancias y compuestos tóxicos, como los antimicrobianos y los biocidas, favoreciendo la diseminación y persistencia bacteriana durante períodos prolongados en ambientes adversos, como por ejemplo el medio hospitalario. La producción de biopelícula dificulta la eliminación de bacterias nosocomiales que la producen del entorno, reduciendo la eficacia de los procesos de limpieza habituales, y facilitando el establecimiento de reservorios ambientales de bacterias resistentes^{96,357,358}.

En este trabajo se utilizaron cuatro aproximaciones diferentes para el estudio de las biopelículas formadas por Kp-PC: (i) capacidad de formación de biopelícula tras 18-24 horas de formación mediante tinción con cristal violeta, (ii) recuento de células viables durante el proceso de formación de la biopelícula, (iii) análisis de la dinámica de formación de biopelículas mediante microscopía láser confocal (CLSM), y (iv) detección del operón *mrkABCD* y expresión relativa del gen *mrkA*. Además, se analizó el efecto de diferentes condiciones de temperatura y/o

humedad en la capacidad de formación de biopelículas y en la viabilidad de las mismas, debido a que la capacidad de formación de las biopelículas puede verse afectada por factores o condiciones ambientales^{359,360}. Los estudios de biopelículas se realizaron en 2 medios pobres o con una mínima cantidad de nutrientes, como el medio M9 (formación y viabilidad de biopelículas) y el FAB (dinámica de formación de biopelículas) con la finalidad de tener unas condiciones experimentales similares a algunas condiciones del entorno hospitalario, como las que pueden darse por ejemplo sobre las superficies del entorno del paciente o de diversos aparatos y dispositivos médicos.

Los resultados de los estudios de biopelículas obtenidos en las tres primeras aproximaciones con los 4 aislados representativos de clones epidémicos (ST15/OXA-48, ST258/KPC-3, ST512/KPC-3 y ST11/OXA-48) mostraron que ST15/OXA-48 es el aislado con la mejor capacidad de formación de biopelícula, los mayores recuentos de bacterias viables durante los primeros días de formación de biopelícula, y en el que se observó una mayor cantidad de biomasa y grosor máximo mediante CLSM. Los aislados productores de KPC-3 presentaron una capacidad de formación de biopelícula, viabilidad y cantidad de biomasa y grosor medio similares entre ellos e inferiores a ST15/OXA-48. El aislado ST11/OXA-48 fue el que presentó una menor capacidad de formación de biopelícula y viabilidad en la misma, y se caracterizó por no ser capaz de formar biopelícula en el sistema "Flow cell" para CLSM.

Los resultados obtenidos en este trabajo mediante tinción con cristal violeta sugieren que la capacidad de formación de biopelícula tras 18-24h en los 17 aislados de Kp-PC es muy variable, destacando las diferencias observadas entre aislados pertenecientes al mismo secuenciotipo (ST11 y ST15). Estas diferencias fueron más llamativas entre los aislados pertenecientes al clon ST11, dado que hubo 2 aislados no formadores de biopelícula en ninguna de las condiciones estudiadas (ST11/OXA-48 y ST11/VIM-1), y un aislado con una gran capacidad de formación de biopelícula (ST11/OXA-245). A pesar de que la relación entre la capacidad de formación de biopelícula con ciertos secuenciotipos no se ha estudiado con mucho detalle en *K. pneumoniae*, nuestros resultados están en línea con los obtenidos por otros autores que, utilizando la misma metodología, observaron una capacidad de formación de biopelícula variable entre diferentes aislados pertenecientes a los clones ST11 y ST15^{361,362}.

Por otra parte, en la literatura hay pocas publicaciones que analicen la relación entre el comportamiento epidémico o no epidémico del clon y la capacidad de formación de biopelícula en *K. pneumoniae*, y generalmente sugieren que los aislados de clones epidémicos presentan una menor capacidad de formación de biopelícula que los aislados de clones no

epidémicos^{82,361,363}. Naparstek y colaboradores, describieron que la capacidad de formación de biopelículas en aislados de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasas del grupo KPC pertenecientes al clon epidémico ST258 fue significativamente inferior que la de aislados de clones no epidémicos (p. ej. ST327, ST376, ST277, ST340)³⁶³. Del mismo modo, en un trabajo realizado por Bruchmann y colaboradores se observó que los aislados que presentaron mayor capacidad de formación de biopelícula generalmente pertenecían a clones no epidémicos (p.ej. ST38, ST134). Estos autores describieron la baja capacidad de formación de biopelícula como una característica común entre los aislados pertenecientes al clon ST258, asociado a un perfil de expresión génica característico, lo que podría suponer una ventaja en el establecimiento y mantenimiento de la infección en el huésped humano³⁶¹. Por el contrario, los aislados pertenecientes a otros clones epidémicos presentaron una capacidad de formación de biopelícula elevada (p. ej. ST405 y ST147) o variable entre aislados del mismo secuenciotipo (p. ej. ST512, ST101 y ST15)³⁶¹. Al igual que lo observado en estos dos trabajos, nuestros resultados muestran que la capacidad de formación de biopelícula del aislado perteneciente al clon ST258 es escasa o nula, en función de las condiciones de humedad y temperatura^{361,363}. Los aislados pertenecientes a clones epidémicos de nuestro estudio que presentan mayor capacidad de formación de biopelícula pertenecen a clones en los que en estos trabajos previos se ha observado mayor variabilidad (p. ej. ST101) o mayor capacidad de formación de biopelícula (p. ej. ST405, ST147)³⁶¹. Por el contrario, en nuestro trabajo el aislado perteneciente al clon ST512 presentó una capacidad de formación de biopelícula escasa o nula en función de las condiciones, mientras que en trabajos previos esta capacidad fue más variable³⁶¹. Todo esto sugiere que la capacidad de formación de biopelícula depende del aislado, aunque en algunos clones como ST258 pueda suponer un rasgo característico.

Los resultados obtenidos mediante recuento de bacterias viables muestran que, en mayor o menor medida, fue posible la recuperación de bacterias viables de las biopelículas formadas por los aislados de Kp-PC de clones epidémicos tras 1 o 2 meses, dependiendo de la temperatura de incubación. Esto parece indicar que los aislados de estos clones son capaces de mantenerse viables en biopelículas durante largos periodos de tiempo, lo que les permitiría persistir y diseminarse en el entorno hospitalario. La elevada capacidad de supervivencia a lo largo del tiempo de las biopelículas formadas por ST512/KPC-2 a ambas temperaturas podría explicar por qué este clon es uno de los más exitosos a nivel mundial, detectándose incluso en reservorios ambientales relacionados con brotes nosocomiales^{37,364,365}. Las biopelículas formadas por ST258/KPC-3 y ST15/OXA-48 también se mantuvieron viables durante todo el periodo de tiempo estudiado a ambas temperaturas, lo que pone de manifiesto su potencial capacidad para formar

reservorios ambientales en el entorno hospitalario^{16,17,364,366}. La viabilidad de aislado ST11/OXA-48 fue algo inferior que la del resto de aislados pertenecientes a los clones epidémicos estudiados, aunque fue posible la recuperación de bacterias viables durante el primer mes de incubación de la biopelícula a 37°C y hasta los 2 meses a 25°C. Liu y colaboradores también observaron que aislados pertenecientes al clon ST11 son capaces de permanecer viables largos periodos de tiempo (entre 14 y 29 días), superiores a la del resto de aislados analizados (ST1, ST15, ST37 y ST45), aunque no presentaron una mayor capacidad de formación de biopelícula, determinada mediante tinción con cristal violeta³⁶⁷. A diferencia de lo observado en nuestro trabajo, estos autores observaron que los aislados estudiados pertenecientes al clon ST11 permanecieron viables durante más tiempo que un aislado del clon ST15 analizado (diferencia de 9 días)³⁶⁷. Algunas publicaciones sugieren que el éxito del clon ST11 podría deberse a su amplia diversidad genética, asociada con la existencia de diferentes sublinajes filogenéticos con múltiples mecanismos de resistencia antimicrobiana y de virulencia diferentes, lo que podría explicar las diferencias observadas entre estos trabajos^{368,369}.

En este trabajo también se ha evaluado el efecto de la temperatura en la formación y supervivencia de la biopelícula y de la humedad en la formación de biopelículas. En cuanto al efecto de la temperatura en la formación de las biopelículas, los resultados obtenidos en este trabajo usando la técnica del cristal violeta muestran que la capacidad de formación de biopelícula tras 24 horas de incubación es superior a 37°C que a 25°C. Esto podría deberse a que, tal y como se observó en las curvas de crecimiento realizadas en M9 (medio en el que se formaron las biopelículas), los aislados de Kp-PC presentaron mayor capacidad de crecimiento a 37°C que a 25°C. Este efecto de la temperatura en la determinación de la formación de biopelículas mediante tinción con cristal violeta se ha estudiado poco en aislados de *K. pneumoniae* y los resultados publicados son discordantes^{359,360}. En línea con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, Nicolau Korres y colaboradores observaron que el incremento de temperatura (de 35 a 40°C) favorecía la formación de biopelícula en los dos aislados de *K. pneumoniae* analizados³⁶⁰. Por el contrario, Hošťacká y colaboradores observaron que el incremento de temperatura (de 30 a 37°C) favorecía la capacidad de formación de biopelículas en 3 de los 5 aislados de *K. pneumoniae* analizados mientras que en los otros dos la capacidad de formación de biopelículas se vio reducida³⁵⁹. En ambos trabajos se observan múltiples diferencias metodológicas que dificultan la comparación de los resultados con los obtenidos en nuestro estudio, como las temperaturas analizadas y el medio de cultivo (TSB) utilizado. Además, las diferencias observadas en estos trabajos no siempre fueron significativas y el número de aislados estudiados fue reducido y no estaban caracterizados a nivel de secuenciotipo^{359,360}.

Respecto al efecto de la temperatura en función del tipo de clon (epidémico o no epidémico), se observó que la capacidad de formación de biopelícula a 37°C fue similar entre ambos tipos de clones, como se ha observado en estudios previos, comentados anteriormente y realizados únicamente a esta temperatura^{361,363}. Por el contrario, en nuestro trabajo se observó que a 25°C los aislados pertenecientes a clones epidémicos presentaron una mayor capacidad de formación de biopelícula que los pertenecientes a clones no epidémicos, lo que sugiere que esta capacidad podría representar una ventaja competitiva de los aislados pertenecientes a clones epidémicos, especialmente en entornos nosocomiales adversos (p. ej. sifones de desagües y superficies). Este trabajo sería el primero en sugerir que los aislados pertenecientes a clones epidémicos de Kp-PC tienen una capacidad superior a los no epidémicos para formar biopelículas a temperatura ambiente. Además, los resultados obtenidos sobre el efecto de la temperatura sobre la viabilidad de las biopelículas de 4 aislados pertenecientes a clones epidémicos muestran que la supervivencia es relativamente estable a 25°C durante los dos meses de estudio, mientras que a 37°C se reduce a partir del día 14 o 21, dependiendo del aislado. Estos resultados sugieren que a una temperatura próxima a la presente en el huésped humano (37°C), los clones epidémicos y no epidémicos presentan una capacidad de formación de biopelículas similar. En cambio, a una temperatura que representa a la de las superficies del entorno hospitalario (25°C), los aislados pertenecientes a clones epidémicos podrían presentar una mayor capacidad para formar biopelícula, así como una mayor supervivencia, lo que puede representar una ventaja para estos clones para competir en el entorno hospitalario y formar reservorios ambientales. La formación de biopelícula es un mecanismo que está altamente regulado por complejos mecanismos que implican a reguladores transcripcionales (p. ej. RpoS, H-NS, OmpR, Crl, MlrA, CpxR), el mensajero secundario c-di-GMP y diferentes estímulos ambientales (p. ej. temperatura, presencia o ausencia de nutrientes, pH, presencia de antimicrobianos y biocidas)³⁷⁰⁻³⁷⁵. La mayor capacidad de formación de biopelícula a 25°C y el incremento en la supervivencia en las biopelículas formadas a 25°C respecto 37°C observada en los aislados pertenecientes a clones epidémicos en nuestro estudio podría estar mediado por mecanismos de regulación dependientes de RpoS (descrito en *E. coli*) y H-NS, los cuales se ha descrito que son sensibles a los cambios de temperatura en *E. coli* y *K. pneumoniae*, respectivamente^{372,373,376}.

En relación con el efecto de la humedad en la formación de biopelícula, los resultados obtenidos mediante tinción con cristal violeta en este trabajo indican que la humedad no afecta la capacidad de formación de biopelículas a las 18-24 horas. Esto puede deberse a que el medio de cultivo M9 disponible en cada uno de los pocillos durante el periodo de incubación supuso un aporte de humedad suficiente para la formación de biopelículas. En este trabajo no se ha

evaluado el papel de la humedad en la formación y supervivencia de biopelículas de Kp-PC a largo plazo, aunque los resultados obtenidos por otros autores sugieren que *K. pneumoniae* es capaz de formar biopelículas sobre superficies abióticas secas, favoreciendo la formación de reservorios ambientales en el entorno sanitario, lo que debería tenerse en cuenta en las estrategias de control de infección. Ejemplo de ello es el trabajo de Costa y colaboradores, quienes observaron la existencia de biopelículas sobre superficies secas con alta frecuencia de contacto en unidades de cuidados intensivos en las que detectaron microorganismos del grupo ESKAPE, incluyendo *K. pneumoniae*, mediante cultivo, secuenciación masiva y microscopía (CLSM y SEM)³⁵⁸.

Los resultados de los estudios de dinámica de formación de biopelícula de los 4 aislados pertenecientes a clones epidémicos (ST512/KPC-3, ST258/KPC-3, ST15/OXA-48 y ST11/OXA-48) muestran que el aislado ST15/OXA-48 fue el que presentó mayor cantidad de biomasa y grosor máximo, seguido de los aislados productores de KPC-3, que presentaron una cantidad de biomasa y grosor medio similares entre ellos. Por el contrario, el aislado ST11/OXA-48 no fue capaz de formar biopelícula en este modelo. Estos resultados estarían en consonancia con algunos estudios previamente mencionados que relacionan la capacidad de formación de biopelícula con ciertos secuenciotipos en aislados de *K. pneumoniae*. Bruchmann y colaboradores describieron que la capacidad de formación de biopelícula, de aislados pertenecientes al clon ST15 era superior a la de los aislados pertenecientes a los clones ST512/KPC-3 y ST258/KPC-2 y Naparstek y colaboradores describieron que aislados productores de KPC-3 que pertenecían al secuenciotipo ST258 tenían menor capacidad de formación biopelículas que los que pertenecían a otros secuenciotipos (ST327, ST376, ST277 y ST340)^{361,363}. La ausencia de formación de biopelícula por el aislado ST11/OXA-48 está en consonancia con los resultados obtenidos por Liu y colaboradores, quienes estudiaron la capacidad de formación de biopelícula de aislados de *K. pneumoniae* productores de KPC del entorno hospitalario, y describieron que los aislados pertenecientes al clon ST11 fueron los que presentaron una menor capacidad para formar biopelículas (mediante tinción con cristal violeta tras 18-24 horas de incubación a 37°C) en comparación con aislados de otros secuenciotipos, incluyendo el ST15 y el ST147³⁶². Las imágenes tridimensionales obtenidas en nuestro trabajo mostraron como la dinámica de formación de biopelícula del aislado ST15/OXA-48 es diferente a la de los otros dos aislados. Mientras que la biopelícula formada por el aislado ST15/OXA-48 cubre toda la superficie desde el primer día y gana en altura hasta el día 6, en las biopelículas formadas por los aislados ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3 pudo observarse la formación de microcolonias el primer día, seguido de un crecimiento que recubrió toda la superficie, sin un aumento de grosor

importante. Esto podría deberse a que la formación de la biopelícula por parte de estos aislados se produzca de forma más lenta o que la estructura que forman sea más friable y que el flujo de medio de cultivo en el sistema impida que la biopelícula incremente de grosor.

Otra de las aproximaciones utilizadas en este trabajo para determinar la capacidad de formación de biopelícula en Kp-PC fue el estudio de la fimbria de tipo 3. Esta estructura, codificada por el operón *mrkABCDF*, está implicada en la adherencia y la formación de biopelículas sobre superficies inertes, además de participar en la unión a diversos tipos de células^{258,262,265,270,272}. El operón *mrkABCDF* se detectó en los 17 aislados de Kp-PC, lo que está en línea con estudios previos en los que se describe que los genes que codifican esta fimbria están presentes en el 96-100% de los aislados de *K. pneumoniae*^{49,262,300,377,378}. Además, se observó que las secuencias de los genes de este operón estaban altamente conservadas. Puesto que este operón se detectó en todos los aislados, no fue posible analizar ningún tipo de relación entre su presencia y otras variables como el tipo de carbapenemasa producida, el tipo de clon (epidémico o no epidémico) o la capacidad de formación de biopelícula de los aislados. Por ello, en este trabajo también se determinó la expresión relativa del gen *mrkA*, que codifica la subunidad estructural principal de la fimbria de tipo 3, necesaria para la formación de la misma, por lo que su expresión está directamente relacionada con la capacidad de formación de biopelícula en *K. pneumoniae*^{271,361,378}. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la expresión relativa del gen *mrkA* en los aislados de Kp-PC analizados es variable y se relaciona con la capacidad de formación de biopelículas (determinada mediante tinción con cristal de violeta a las 18-24h a 37°C), lo que está en línea con los trabajos publicados previamente por otros autores. Bruchmann y colaboradores, observaron mediante transcriptómica en 37 aislados clínicos de *K. pneumoniae* que *mrkA* se sobreexpresaba en los aislados clasificados como formadores fuertes de biopelícula³⁶¹. En otro estudio, Vuotto y colaboradores, observaron un incremento en la expresión relativa del gen *mrkA* en biopelículas respecto a la de bacterias plantónicas en la mayoría de los aislados de *K. pneumoniae* estudiados³⁷⁸. En nuestro trabajo, la mayoría de aislados de Kp-PC que presentaron niveles elevados de expresión relativa de *mrkA* pertenecían a clones epidémicos formadores fuertes de biopelícula. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de *mrkA* entre aislados de clones epidémicos y aislados de clones no epidémicos, posiblemente debido al relativamente reducido tamaño muestral, estos resultados sugieren que la fimbria de tipo 3 puede tener un papel fundamental en la formación de biopelícula de aislados de clones epidémicos. Por el contrario, otros autores han descrito asociación entre ciertos clones epidémicos y mecanismos implicados en la adhesión bacteriana a superficies vivas y abióticas. Gato y colaboradores observaron una

asociación entre la fimbria Kpi, codificada por el operón *kpiABCDEFG*, y el clon epidémico ST15³⁷⁹. Estos autores demostraron que esta fimbria está implicada en la adherencia a las células del tracto digestivo, necesaria para colonización intestinal, y a superficies abióticas, lo que puede favorecer su persistencia en el entorno hospitalario y contribuir al comportamiento epidémico del clon ST15 de *K. pneumoniae*³⁷⁹. Por otro lado, Adler y colaboradores observaron una asociación entre los secuenciotipos ST258 y ST512 y el EGM ICEKp258.2, que alberga genes que codifican el *pilus* de tipo IV, implicado en la adherencia a superficies vivas y abióticas y que podría estar relacionado con el éxito de estos clones³⁸⁰.

El uso de biocidas es una de las estrategias más utilizadas en los programas de vigilancia y control de las infecciones nosocomiales. Sin embargo, hay que tener presente que la exposición a concentraciones subletales de estos productos tóxicos, posiblemente como consecuencia de un uso o una preparación inadecuada de los mismos, puede reducir su eficacia, favoreciendo la formación de biopelículas, como sugieren los resultados obtenidos en diversos estudios^{158,381-385}. Esto justificaría la realización de estudios más ambiciosos que permitan evaluar el impacto de estos productos a largo plazo en aislados multirresistentes y con capacidad para sobrevivir en reservorios ambientales. La información sería de gran utilidad para diseñar estrategias efectivas para la vigilancia y el control de la diseminación de patógenos nosocomiales.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que los aislados de Kp-PC pertenecientes a los clones epidémicos estudiados fueron capaces de permanecer viables bajo la presión de concentraciones subletales de biocidas en biopelículas formadas a temperatura ambiente durante un período relativamente largo (hasta 60 días). Esta capacidad puede representar una ventaja competitiva en algunos entornos hospitalarios, permitiendo el establecimiento de reservorios ambientales, y pudiendo causar brotes nosocomiales^{16,17,364,366,386-388}. Según nuestro conocimiento este trabajo es el primero en analizar el efecto a largo plazo en la supervivencia de biopelículas de Kp-PC formadas a temperatura ambiente.

Además, este trabajo muestra que la povidona yodada es el biocida con mayor efecto en la reducción de la formación y viabilidad de las biopelículas de Kp-PC en todas las condiciones estudiadas. Estos resultados están en línea con los obtenidos en estudios similares realizados en diferentes especies bacterianas y que sugieren que la povidona yodada es un buen biocida para prevenir o reducir la formación de biopelículas. Oduwole y colaboradores observaron que concentraciones subletales de povidona yodada inhibían la formación de biopelículas de *S. epidermidis* y *S. aureus* formadas a 37°C¹⁴⁹. Hoekstra y colaboradores, estudiaron la eficacia de diferentes diluciones de antisépticos (incluyendo clorhexidina y productos con povidona

yodada) en la eliminación de biopelículas de diferentes especies bacterianas (*P. aeruginosa* y biopelículas mixtas de *C. albicans* y *S. aureus* meticilin resistente), simulando la dilución que pueden sufrir estos productos en el exudado presente en las heridas crónicas¹⁴⁸. La povidona yodada en ungüento, fue el biocida más eficaz en la eliminación de las biopelículas en todas las diluciones analizadas (3,3-10%)¹⁴⁸. Puesto que en nuestro estudio la povidona yodada fue el biocida que produjo la mayor reducción en la capacidad de formación y viabilidad de los aislados analizados, se estudió su efecto sobre la dinámica de formación de biopelículas mediante CLSM. Los datos obtenidos a lo largo de una semana de incubación muestran que, en general, la presencia de este biocida se asocia con una disminución del grosor de la biopelícula producida. En general, en los aislados ST512/KPC-3 y ST258/KPC-3 la exposición a povidona yodada redujo el grosor máximo de las biopelículas, aunque no afectó a la cantidad de biomasa, observándose que tanto en ausencia como en presencia de este biocida estos aislados formaron una monocapa de bacterias recubriendo toda la superficie sin un incremento del grosor. En el aislado ST15/OXA-48, que es el que mostró mayor capacidad de formación de biopelícula, parece que la exposición a povidona yodada retrasó la formación de biopelícula, aunque finalmente alcanzó un grosor máximo similar y una biomasa mayor que la formada en ausencia de povidona yodada. Este aislado formó una estructura tridimensional tanto en ausencia como en presencia de povidona yodada. Estos resultados sugieren que frente a ciertos aislados las concentraciones subletales de povidona yodada podrían no ser suficientes para prevenir, o que incluso podrían favorecer, la persistencia de los mismos en el entorno. Se necesitan más estudios para explorar esta posibilidad, aunque es importante insistir en la necesidad de hacer un uso correcto de los biocidas para evitar efectos no deseados (p. ej. incremento en la formación de biopelícula, generación de resistencia)^{389,390}. En general, los resultados obtenidos sugieren que la povidona yodada es un biocida eficaz frente a biopelículas, lo que puede tener una aplicación relevante en el control de la diseminación de Kp-PC. Una posible aplicación puede ser el tratamiento con povidona yodada de biopelículas bacterianas formadas en heridas crónicas, ya que este producto parece eficaz frente a biopelículas, promueve la cicatrización y presenta baja citotoxicidad y alta tolerabilidad; aunque hay que monitorizar la posible afectación en la función tiroidea en tratamientos prolongados¹⁴⁷.

Para el resto de los biocidas estudiados, los resultados obtenidos mediante tinción con cristal violeta mostraron un efecto variable sobre la capacidad de formación de biopelícula. Únicamente fue significativo el incremento en la categoría de formación de biopelícula observado en las biopelículas formadas a 25°C expuestas a digluconato de clorhexidina y triclosán en ciertas condiciones humedad. Este trabajo sería el primero en analizar el efecto de

concentraciones subletales de biocidas en la capacidad de formación de biopelícula en aislados de Kp-PC a temperatura ambiente, y en sugerir que la exposición de Kp-PC a digluconato de clorhexidina y triclosán pueden incrementar su capacidad de formar biopelícula²⁹⁸. Dado que mediante la tinción con cristal violeta se estudia la biomasa de la biopelícula, sin hacer distinción entre las bacterias y los componentes de la matriz extracelular, ni entre las bacterias viables y no viables que forman la biopelícula, los resultados obtenidos podrían indicar que la exposición de Kp-PC a concentraciones subletales de estos biocidas podría fomentar en cierto modo la producción de EPS, posiblemente como mecanismo de protección frente al biocida^{298,391}. Esta hipótesis está en consonancia con los resultados obtenidos por Suzuki y colaboradores, quienes mediante recuento de bacterias viables y microscopía (CLSM y SEM) observaron un incremento en la biomasa total de la biopelícula y de cantidad de EPS, pero no del grosor o la viabilidad en biopelículas mixtas (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus oralis*, y *Actinomyces naeslundii*) formadas a 37°C expuestas a clorhexidina, respecto a las biopelículas no expuestas³⁹². Por otra parte, Dynes y colaboradores estudiaron mediante diversas técnicas (p. ej. recuento, CLSM, tinción mediante lectinas fluorescentes) el efecto de concentraciones subletales de biocidas sobre biopelículas formadas por un aislado de *Pseudomonas fluorescens* a 21°C durante 24-96h³⁹¹. Estos autores observaron un incremento en la producción de EPS en biopelículas expuestas a concentraciones subletales de triclosán que no se acompañó de un incremento en la viabilidad ni la biomasa de la biopelícula³⁹¹. Por el contrario, estos autores no observaron un incremento en la producción de EPS en las biopelículas expuestas a digluconato de clorhexidina³⁹¹. En nuestro trabajo, únicamente se estudió el efecto de los biocidas sobre la viabilidad de las biopelículas en cuatro aislados epidémicos. En estos aislados, se observó que la exposición a concentraciones subletales de digluconato de clorhexidina y triclosán no tuvo efecto o redujo la viabilidad de las biopelículas. Puesto que la exposición a biocidas de estos aislados no produjo ningún efecto sobre su capacidad de formación de biopelícula, sería interesante estudiar el efecto de digluconato de clorhexidina y triclosán sobre la viabilidad de las biopelículas formadas por el resto de aislados de Kp-PC de la colección. Los resultados obtenidos sugieren que concentraciones subletales de algunos biocidas ampliamente utilizados como el digluconato de clorhexidina o que pueden acumularse en el medio ambiente como triclosán, podrían presentar efectos no deseados sobre la capacidad de formación de biopelículas en Kp-PC, como por ejemplo favorecer la formación de EPS en las biopelículas formadas a temperatura ambiente, lo que ayudaría en el establecimiento de reservorios ambientales de Kp-PC, aunque son necesarios más estudios para confirmar esta posibilidad¹¹⁴.

La ausencia de efecto de los biocidas evaluados sobre la capacidad de formación de biopelícula a 37°C observada en nuestro trabajo está en línea con los resultados obtenidos en otros estudios que analizan el efecto de los biocidas en la formación de biopelícula a esta temperatura. Al igual que en nuestro trabajo, Houari y Di Martino, no observaron diferencias en la capacidad de formación de biopelícula determinada por tinción con cristal violeta en un asilado de *E. coli* y uno de *K. pneumoniae* al ser expuestos a concentraciones subletales de diacetato de clorhexidina y cloruro de benzalconio similares a las utilizadas en nuestro estudio (1/4 de la CMI)¹⁵⁸. Estos autores observaron en *E. coli* y *K. pneumoniae* una reducción significativa en la capacidad de formación de biopelículas al ser expuestas a concentraciones más elevadas, equivalentes a la mitad de la CMI de diacetato de clorhexidina y cloruro de benzalconio, respectivamente¹⁵⁸. Del mismo modo, Forbes y colaboradores, estudiaron la capacidad de adaptación de aislados de diversas especies bacterianas a diferentes biocidas (p. ej. clorhexidina, triclosán, ceftrimida) y no observaron diferencias significativas en la capacidad de formación de biopelículas en aislados de *K. pneumoniae* adaptados a triclosán. En cambio, sí observaron un incremento de la capacidad de formación de biopelícula en aislados de *E. coli* y una reducción significativa en aislados de *S. aureus* y *Staphylococcus lugdunensis* adaptados a este biocida³⁸². A diferencia de lo observado en este trabajo, otros autores han descrito incrementos en la capacidad de formación de biopelícula tras la exposición a concentraciones subletales de biocidas a 37°C, aunque utilizando metodologías muy diversas. Por un lado, algunos estudios analizan la capacidad de formación de biopelícula mediante tinción con cristal violeta en aislados adaptados o tolerantes a biocidas por exposición a los mismos. Forbes y colaboradores, en el trabajo comentado anteriormente, observaron que la adaptación a clorhexidina en aislados de *K. pneumoniae* y *S. marcescens* produjo un incremento en la capacidad de formación de las biopelículas³⁸². En este sentido, Elekhaway y colaboradores, observaron un incremento en el porcentaje de aislados capaces de formar biopelículas tras la adaptación de 50 aislados clínicos de *K. pneumoniae* a cloruro de benzalconio, aunque no observaron diferencias en la viabilidad de las biopelículas³⁹³. Por otra parte, diversos estudios han demostrado que concentraciones subletales de hipoclorito de sodio inducen la formación de biopelículas, aunque son estudios realizados en especies bacterianas diferentes a *K. pneumoniae* y las técnicas utilizadas son muy diversas. Ejemplo de ello es el estudio de Capita y colaboradores, en el que se observó mediante CLSM que la adaptación de un aislado de *E. coli* a concentraciones subletales de hipoclorito favorecen la formación de biopelícula tanto en presencia como ausencia del biocida³⁸¹. En este trabajo postulan que el incremento en la hidrofobicidad celular y modificaciones en la membrana externa podrían ser las responsables del incremento de formación de biopelícula³⁸¹. Del mismo modo, Stempel y colaboradores utilizando tinción con cristal violeta y microscopía

de fluorescencia describieron como concentraciones subletales de este biocida favorecían la adhesión inicial en biopelículas formadas por *P. aeruginosa* y postularon que se debe al aumento de los niveles de c-di-GMP, un mensajero secundario intracelular, que promueve la producción de polisacáridos implicados en la formación de biopelícula (p. ej. Pel y Psl)³⁸³.

Limitaciones del estudio

Este estudio tiene algunas limitaciones importantes que interesa comentar. En primer lugar, el número de aislados analizados en este trabajo podría considerarse insuficiente; no obstante refleja los clones y carbapenemasas más prevalentes en España durante el periodo de selección de los aislados³¹⁴. Entre los clones más importantes no estudiados destacan por ejemplo el ST307, formado por una gran número de linajes, asociados a diversas carbapenemasas (p. ej. del grupo KPC, NDM, OXA-48) y que están mostrando un gran capacidad de diseminación³⁹⁴. Respecto a las carbapenemasas no se incluyen variantes de NDM que se están diseminando con gran rapidez y eficacia a nivel mundial, así como otras carbapenemasas, como las de tipo IMP que son más frecuentes en otras especies bacterianas como *P. aeruginosa* o *A. baumannii*^{63,395,396}.

En segundo lugar, es importante destacar que no existe un método estándar para estudiar la actividad *in vitro* de los biocidas, lo que dificulta comparar los resultados obtenidos con los de otros estudios. Tampoco existe un método estándar para estudiar la capacidad de formación de biopelícula, lo que también limita la comparación entre diferentes estudios y dificulta la interpretación de los resultados obtenidos en las diferentes aproximaciones experimentales utilizadas en este trabajo. Las diferencias observadas en la formación de biopelícula determinada con las distintas técnicas utilizadas pueden deberse a que cada método estudia diferentes propiedades (p. ej. biomasa o viabilidad) que contribuyen de forma conjunta a la formación de la biopelícula.

En tercer lugar, en este trabajo no se han analizado las posibles diferencias en el nivel de expresión de los genes que codifican bombas de expulsión a biocidas y su relación con la SRB. Como se ha comentado, existe cierta controversia en la asociación entre la expresión de una bomba de expulsión y la sensibilidad reducida al biocida que es capaz de expulsar¹⁹⁸. Sin duda es necesario realizar nuevos estudios en este sentido, utilizando una metodología potente y sensible que permita determinar la expresión génica global (transcriptómica) de genes que pudieran estar relacionados con SRB, analizando con especial interés la expresión de los genes de bombas de expulsión.

Finalmente, la viabilidad y dinámica de formación de las biopelículas únicamente se ha estudiado en aislados pertenecientes a clones epidémicos, impidiendo que se pueda asociar esta capacidad con el éxito o la capacidad epidémica que han mostrado estos clones. En ambos casos el factor limitante fue el tiempo disponible para desarrollar los experimentos. El estudio de la viabilidad de las biopelículas diseñado en este proyecto requiere una gran inversión de tiempo,

puesto que los análisis se realizaron a lo largo de 2 meses usando dos temperaturas diferentes, mientras que la dinámica de formación de biopelículas se realizó durante una estancia de 2 meses en otro centro (IdISBa-Son Espases, Mallorca). En este trabajo se optó por concentrar los esfuerzos en conocer el comportamiento de las biopelículas formadas por aislados pertenecientes a clones epidémicos dado que son de mayor interés clínico y epidemiológico que los aislados de clones no epidémicos.

6. Conclusiones

De los resultados obtenidos en los trabajos expuestos en este proyecto de Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Los aislados de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasa incluidos en este estudio tienen una sensibilidad variable a los biocidas estudiados, siendo los de mayor actividad *in vitro* triclosán, digluconato de clorhexidina, cloruro de benzalconio y etanol.
2. La actividad de los biocidas evaluados es independiente del tipo de clon (epidémico o no epidémico) y el tipo de carbapenemasa, por lo que la SRB no puede asociarse con ninguno de estos factores.
3. El tipo de medio de cultivo usado para determinar la actividad de los biocidas mediante microdilución afecta a los valores de CMI obtenidos, con excepción del triclosán, siendo las CMIs determinadas en medio mínimo M9 inferiores a las obtenidas en MHB.
4. La temperatura de crecimiento afecta discretamente a los valores de CMI de algunos de los biocidas evaluados. En esos casos, las CMIs determinadas a 25°C son inferiores a las determinadas a 37°C.
5. La presencia de los genes de bombas de expulsión evaluados no se relaciona con los valores de CMI de los biocidas estudiados, por lo que la SRB es independiente de la presencia o la ausencia de los genes de las bombas de expulsión analizadas. Esto sugiere que la presencia de estos genes, por sí solos, no debe tener un papel relevante en la adquisición o desarrollo de SRB.
6. A temperatura ambiente (25°C), los aislados de clones epidémicos tienen una capacidad de formación de biopelículas superior a la de los aislados de clones no epidémicos.
7. A temperatura ambiente (25°C), los aislados estudiados, pertenecientes a clones epidémicos, permanecen viables durante 2 meses.
8. Los aislados de los clones epidémicos estudiados presentan diferentes dinámicas de formación de biopelícula. El aislado ST15/OXA-48 es el que produce mayor cantidad de biomasa y presenta el mayor grosor máximo.
9. El operón *mrkABCDF* está altamente conservado en los aislados de *Klebsiella pneumoniae* productor de carbapenemasa estudiados, y la expresión relativa del gen *mrkA* está asociada con la capacidad de formación de biopelícula.

-
10. Las concentraciones subletales estudiadas de digluconato de clorhexidina y triclosán pueden favorecer la formación de biopelícula en aislados de *K. pneumoniae* productor de carbapenemasa a temperatura ambiente.
 11. La povidona yodada es el biocida con mayor efecto en la reducción de la capacidad de formación de biopelículas y de la viabilidad en las mismas. En general, la exposición a povidona yodada reduce el grosor de la biopelícula.
 12. Los aislados de clones epidémicos analizados son capaces de permanecer viables hasta 2 meses en biopelículas expuestas a las concentraciones subletales de los biocidas estudiados a temperatura ambiente.

7. Bibliografía

1. Etymologia: *Klebsiella*. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 1418 (2010).
2. Parte, A. C., Sardà Carbasse, J., Meier-Kolthoff, J. P., Reimer, L. C. & Göker, M. LPSN — List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* vol. 68 1825–1829 <http://www.bacterio.net/> (2018).
3. Wyres, K. L., Lam, M. M. C. & Holt, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat. Rev. Microbiol.* **18**, 344–359 (2020).
4. Caputo, A., Fournier, P.-E. & Raoult, D. Genome and pan-genome analysis to classify emerging bacteria. *Biol. Direct* **14**, (2019).
5. Podschun, R. & Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **11**, 589–603 (1998).
6. Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. & Rousselier, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 925–932 (2001).
7. Tindall, B. J., Sutton, G. & Garrity, G. M. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved Lists 1980) and *Klebsiella mobilis* Bascomb *et al.* 1971 (Approved Lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the Approved Lists and are homotypic synonyms, . *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 502–504 (2017).
8. Carrol, K. *et al. Manual of Clinical Microbiology*. (American Society of Microbiology, 2019). doi:10.1128/9781555819842.
9. Bennett, J. E., Dolin, R. & Blaser, M. J. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. (Elsevier, 2019). doi:10.1016/C2012-1-00075-6.
10. Botelho-Nevers, E. *et al.* Chronic nasal infection caused by *Klebsiella rhinoscleromatis* or *Klebsiella ozaenae*: two forgotten infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.* **11**, 423–429 (2007).
11. Wyres, K. L. & Holt, K. E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 131–139 (2018).
12. Gorrie, C. L. *et al.* Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin. Infect. Dis.* **208**, 208–215 (2017).
13. Russo, T. A. & Marr, C. M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, (2019).
14. Rice, L. B. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **197**, 1079–1081 (2008).
15. Boucher, H. W. *et al.* Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 1–12 (2009).
16. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K. & Carattoli, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 252–275 (2017).
17. Paczosa, M. K. & Meccas, J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **80**, 629–661 (2016).
18. Lin, W. H. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1533–1539 (2014).
19. Martin, R. M. & Bachman, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **8**, (2018).
20. European Centre for Disease Prevention and Control. *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011-2012*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/point-prevalence-survey-healthcare-associated-infections-and-antimicrobial-use-0> (2013) doi:10.2900/86011.
21. European Centre for Disease Prevention and Control. *Most frequently isolated microorganisms. 2017* <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/healthcare-associated-infections-long-term-care-facilities/surveillance-and-disease-5> (2017).
22. Martin, R. M. *et al.* Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* **1**, (2016).
23. Shon, A. S., Bajwa, R. P. S. & Russo, T. A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence* **4**, 107–118 (2013).
24. Choby, J. E., Howard-Anderson, J. & Weiss, D. S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *J. Intern. Med.* **287**, 283–300 (2020).
25. O'Neill, J. *Tackling drug-resistant infections globally. Review on Antimicrobial Resistance* (2016) doi:10.4103/2045-080x.186181.
26. World Health Organization Regional Office for Europe and European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 (2020 data)* *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 (2020 data)*. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/ECDC-WHO-AMR-report.pdf> (2022).
27. Marín, M. & Gudiol, F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21**, 42–55 (2003).
28. Aminov, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front. Microbiol.* **1**, (2010).
29. Holt, K. E. *et al.* Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance

-
- in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, E3574–E3581 (2015).
30. Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K.-A. & Matsumura, Y. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, e00102-19 (2020).
 31. Martínez-Martínez, L. & González-López, J. J. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **32**, 4–9 (2014).
 32. European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017> (2017) doi:10.2900/797061.
 33. Cantón, R. *et al.* Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **14**, 144–153 (2008).
 34. Kazmierczak, K. M., De Jonge, B. L. M., Stone, G. G. & Sahm, D. F. Longitudinal analysis of ESBL and carbapenemase carriage among *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Europe as part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) global surveillance progr. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1165–1173 (2020).
 35. Rodríguez-Guerrero, E., Callejas-Rodelas, J. C., Navarro-Marí, J. M. & Gutiérrez-Fernández, J. Systematic Review of Plasmid AmpC Type Resistances in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and Preliminary Proposal of a Simplified Screening Method for *ampC*. *Microorganisms* **10**, 1–24 (2022).
 36. Rodríguez-Baño, J., Gutiérrez-Gutiérrez, B., Machuca, I. & Pascual, A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, 1–42 (2018).
 37. David, S. *et al.* Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat. Microbiol.* **4**, (2019).
 38. Queenan, A. M. & Bush, K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440–458 (2007).
 39. Naas, T., Dortet, L. & Iorga, B. I. Structural and Functional Aspects of Class A Carbapenemases. *Curr. Drug Targets* **17**, 1006–1028 (2016).
 40. Lee, C. R. *et al.* Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front. Microbiol.* **7**, 895 (2016).
 41. Tzouvelekis, L. S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P. T. & Daikos, G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: An evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 682–707 (2012).
 42. Nordmann, P., Cuzon, G. & Naas, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet. Infect. Dis.* **9**, 228–36 (2009).
 43. Ramos-Castañeda, J. A. *et al.* Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. *J. Infect.* **76**, 438–448 (2018).
 44. Papp-Wallace, K. M. & Bonomo, R. A. New β -Lactamase Inhibitors in the Clinic. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **30**, 441–464 (2016).
 45. Giddins, M. J. *et al.* Successive emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in *blaKPC-2*-harboring *Klebsiella pneumoniae* sequence type 307 isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, (2018).
 46. Humphries, R. M. *et al.* First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 6605–6607 (2015).
 47. Yigit, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1151–1161 (2001).
 48. Oueslati, S. *et al.* Unravelling ceftazidime/avibactam resistance of KPC-28, a KPC-2 variant lacking carbapenemase activity. *J. Antimicrob. Chemother.* **74**, 2239–2246 (2019).
 49. Becker, L. *et al.* Genome-based analysis of Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008-2014. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **7**, (2018).
 50. Soria-Segarra, C. *et al.* Tracking KPC-3-producing ST-258 *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a third-level hospital in Granada (Andalusia, Spain) by risk factors and molecular characteristics. *Mol. Biol. Rep.* **47**, 1089–1097 (2020).
 51. Palacios-Baena, Z. R. *et al.* Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain. *J. Infect.* **72**, 152–160 (2016).
 52. López-Cerero, L. *et al.* Characterisation of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* **44**, 538–540 (2014).
 53. Yong, D. *et al.* Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, *blaNDM-1*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 5046–5054 (2009).
 54. Poirrel, L., Dortet, L., Bernabeu, S. & Nordmann, P. Genetic features of *blaNDM-1*-positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 5403–5407 (2011).
 55. Shields, R. K. & Doi, Y. Aztreonam Combination Therapy: An Answer to Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria? *Clin. Infect. Dis.* **14**, 1–3 (2020).

56. Delgado-Valverde, M., Del Carmen Conejo, M., Serrano, L., Fernandez-Cuenca, F. & Pascual, A. Activity of cefiderocol against high-risk clones of multidrug-resistant *Enterobacterales*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 1840–1849 (2020).
57. Diene, S. M. & Rolain, J. M. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 831–838 (2014).
58. Nordmann, P., Naas, T. & Poirel, L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 1791–1798 (2011).
59. Matsumura, Y. *et al.* Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 2249–2258 (2017).
60. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf> (2015) doi:10.2900/6928.
61. Mojica, M. F., Bonomo, R. A. & Fast, W. B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand? *Curr. Drug Targets* **17**, 1029–1050 (2015).
62. Matsumura, Y. *et al.* Global molecular epidemiology of IMP-producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
63. Wu, W. *et al.* NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clin. Microbiol. Rev.* **32**, e00115-18 (2019).
64. Bush, K. & Bradford, P. A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, (2020).
65. Machuca, J. *et al.* Molecular characterisation of an outbreak of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* reveals ST11 clone expansion combined with interclonal plasmid dissemination. *Int. J. Antimicrob. Agents* **59**, 3–9 (2022).
66. Walther-Rasmussen, J. & Høiby, N. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 373–383 (2006).
67. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V. & Nordmann, P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 15–22 (2004).
68. Carrër, A. *et al.* Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2950–2954 (2008).
69. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*-second update Event background Current situation of CRE in EU/EEA countries. *Eur. Cent. Dis. Prev. Control* 1–17 (2019).
70. van Duin, D. & Doi, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence* **8**, 460–469 (2017).
71. Kidd, J. M., Livermore, D. M. & Nicolau, D. P. The difficulties of identifying and treating *Enterobacterales* with OXA-48-like carbapenemases. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 401–403 (2020).
72. Aghamali, M., Zahedi Bialvaei, A., Aghazadeh, M., Asgharzadeh, M. & Samadi Kafil, H. Carbapenemase inhibitors. *Rev. Med. Microbiol.* **28**, 104–113 (2017).
73. Giske, C. G. *et al.* *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance*. https://aurosan.de/images/mediathek/servicematerial/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms.pdf (2017).
74. Brolund, A. *et al.* Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance* **24**, 1–8 (2019).
75. López-Hernández, I. *et al.* Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria in Andalusia, Spain, 2014–2018. *Emerg. Infect. Dis.* **26**, 2218–2222 (2020).
76. Noster, J., Thelen, P. & Hamprecht, A. Detection of multidrug-resistant *Enterobacterales*—from ESBLs to carbapenemases. *Antibiotics* **10**, 1–27 (2021).
77. Sellera, F. P., Da Silva, L. C. B. A. & Lincopan, N. Rapid spread of critical priority carbapenemase-producing pathogens in companion animals: A One Health challenge for a post-pandemic world. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 2225–2229 (2021).
78. Dancer, S. J. Controlling hospital-acquired infection: Focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 665–690 (2014).
79. Pitout, J. D. D., Nordmann, P. & Poirel, L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5873–5884 (2015).
80. Guet-Revillet, H. *et al.* Environmental contamination with extended-spectrum β -lactamases: Is there any difference between *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp? *Am. J. Infect. Control* **40**, 845–848 (2012).
81. Wyres, K. L. *et al.* Distinct evolutionary dynamics of horizontal gene transfer in drug resistant and virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS Genet.* **15**, 1–25 (2019).
82. López-Cerero, L. Control of the spread of resistant pathogens in health centers: Beyond the standard prevention measures. *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)* **36**, 207–208 (2018).
83. French, C. E. *et al.* Control of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* outbreaks in acute settings: an

-
- evidence review. *J. Hosp. Infect.* **95**, 3–45 (2017).
84. Köck, R. *et al.* Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 1241–1250 (2018).
 85. Ahlstrom, C. A. *et al.* Genomically diverse carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* from wild birds provide insight into global patterns of spatiotemporal dissemination. *Sci. Total Environ.* **824**, 153632 (2022).
 86. McEwen, S. A. & Collignon, P. J. Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. *Microbiol. Spectr.* **6**, 1–26 (2018).
 87. Liu, B. T. *et al.* Characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in ready-to-eat vegetables in China. *Front. Microbiol.* **9**, 1147 (2018).
 88. Mairi, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J. P. & Touati, A. OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 587–604 (2018).
 89. Zurfluh, K. *et al.* Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing *Enterobacteriaceae*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **50**, 436–440 (2017).
 90. Frost, I., Van Boeckel, T. P., Pires, J., Craig, J. & Laxminarayan, R. Global geographic trends in antimicrobial resistance: The role of international travel. *J. Travel Med.* **26**, 1–13 (2019).
 91. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. & Jensen, S. O. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **31**, (2018).
 92. Butler, D. A. *et al.* Optimizing aminoglycoside selection for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with the aminoglycoside-modifying enzyme (AME) gene *aac(6′)-Ib*. *J. Antimicrob. Chemother.* **76**, 671–679 (2021).
 93. Bahr, G., González, L. J. & Vila, A. J. Metallo- β -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design. *Chem. Rev.* **121**, 7957–8094 (2021).
 94. Nordmann, P., Poirel, L., Walsh, T. R. & Livermore, D. M. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* **19**, 588–595 (2011).
 95. Woodford, N., Turton, J. F. & Livermore, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 35 736–755 (2011).
 96. Mathers, A. J., Peirano, G. & Pitout, J. D. D. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 565–591 (2015).
 97. Rutala, W. A. & Weber, D. J. *Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008*. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/pdf/guidelines/disinfection-guidelines-H.pdf> (2019).
 98. Calbo, E. & Garau, J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: The CTX-M-15 type consolidation. *Future Microbiol.* **10**, 1063–1075 (2015).
 99. Xercavins, M. *et al.* High clonal diversity of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples in a non-outbreak situation. A cohort study. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **9**, (2020).
 100. Lai, Y. C., Lu, M. C. & Hsueh, P. R. Hypervirulence and carbapenem resistance: two distinct evolutionary directions that led high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones to epidemic success. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **19**, 825–837 (2019).
 101. Oteo, J. *et al.* Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high *in vitro* susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3406–3412 (2015).
 102. Esteban-Cantos, A. *et al.* The carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* population is distinct and more clonal than the carbapenem-susceptible population. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
 103. Grundmann, H. *et al.* Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect. Dis.* **17**, 153–163 (2017).
 104. Tompkins, K. & van Duin, D. Treatment for carbapenem-resistant *Enterobacteriales* infections: recent advances and future directions. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **40**, 2053–2068 (2021).
 105. Doi, Y. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* **69**, S565–S575 (2019).
 106. European Parliament and the Council of the European Union. DIRECTIVA 98/8/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 16 de febrero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas. *D. Of. las Comunidades Eur.* 1–63 (1998).
 107. Mc Carlie, S., Boucher, C. E. & Bragg, R. R. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance. *Drug Resist. Updat.* **48**, (2020).
 108. Siani, H. & Maillard, J. Y. Best practice in healthcare environment decontamination. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1–11 (2014).
 109. Otter, J. A. *et al.* Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection. *J. Hosp. Infect.* **89**, 16–27 (2015).
 110. Bearman, G., Munoz-Price, S., Morgan, D. J. & Murthy, R. K. *Infection Prevention: New Perspectives and Controversies*. (Springer International Publishing, 2018). doi:10.1007/978-3-319-60980-5.
 111. Kramer, A., Schwebke, I. & Kampf, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC* **6**, (2006).
 112. Weber, D. J., Rutala, W. A., Kanamori, H., Gergen, M. F. & Sickbert-Bennett, E. E. Carbapenem-Resistant

- Enterobacteriaceae*: Frequency of Hospital Room Contamination and Survival on Various Inoculated Surfaces. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **36**, (2015).
113. Munoz-Price, L. S. *et al.* Successful Control of an Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase—Producing *K. pneumoniae* at a Long-Term Acute Care Hospital. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **31**, 341–347 (2010).
 114. McDonnell, G. E. *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization. Types, action, and resistance.* (ASM Press, 2017).
 115. Russell, A. D. & McDonnell, G. E. Concentration : a major factor in studying biocidal action. *J. Hosp. Infect.* **44**, 1–3 (2000).
 116. Wiemken, T. L. Skin antiseptics in healthcare facilities: Is a targeted approach necessary? *BMC Public Health* **19**, 10–13 (2019).
 117. Kampf, G., Löffler, H. & Gastmeier, P. Hand Hygiene for the Prevention of Nosocomial Infections. *Dtsch. Arztebl. Int.* **106**, 649–55 (2009).
 118. European Centre for Disease Prevention and Control. *Systematic review of the effectiveness of infection control measures to prevent the transmission of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae through cross-border transfer of patients.* <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/systematic-review-effectiveness-infection-control-measures-prevent-transmission-0> (2014) doi:10.2900/850536.
 119. Septimus, E. J. & Schweizer, M. L. Decolonization in prevention of health care-associated infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **29**, 201–221 (2016).
 120. Schweizer, M. L. *et al.* Association of a bundled intervention with surgical site infections among patients undergoing cardiac, hip, or knee surgery. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **313**, 2162–2171 (2015).
 121. Derde, L. P. G. *et al.* Interventions to reduce colonisation and transmission of antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: An interrupted time series study and cluster randomised trial. *Lancet Infect. Dis.* **14**, 31–39 (2014).
 122. Climo, M. W. *et al.* Effect of Daily Chlorhexidine Bathing on Hospital-Acquired Infection. *N. Engl. J. Med.* **368**, 533–575 (2013).
 123. Tacconelli, E. *et al.* ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 1–55 (2014).
 124. Borer, A. *et al.* Impact of 4% chlorhexidine whole-body washing on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* skin colonisation among patients in a medical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* **67**, 149–155 (2007).
 125. Noto, M. J. *et al.* Chlorhexidine bathing and health care-associated infections: A randomized clinical trial. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **313**, 369–378 (2015).
 126. Yan, Z. *et al.* Prospective investigation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* transmission among the staff, environment and patients in five major intensive care units, Beijing. *J. Hosp. Infect.* **101**, 150–157 (2019).
 127. Bassetti, M. *et al.* Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **24**, 133–144 (2018).
 128. Savard, P. & Perl, T. M. Combating the spread of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: A battle that infection prevention should not lose. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**, 854–861 (2014).
 129. Hilliquin, D. *et al.* Risk factors for acquisition of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* among contact patients: a multicentre study. *J. Hosp. Infect.* **98**, 253–259 (2018).
 130. Kampf, G. *Antiseptic Stewardship.* (Springer, 2018). doi:10.1007/978-3-319-98785-9.
 131. Bischofberger Valdés, C. *et al.* Guía de uso de desinfectantes en el ámbito sanitario de la Sociedad Española de Medicina Preventiva, Salud Pública e Higiene. *Soc. Española Med. Prev. Salud Pública e Hig.* **24**, 17–1011 (2019).
 132. European Chemicals Agency. List of active substances and suppliers. *Artic. 95 List* **95**, 1–109 (2019).
 133. European Centre for Disease Prevention and Control. *Disinfection of environments in healthcare and non-healthcare settings potentially contaminated with SARS-CoV-2. European Centre for Disease Prevention and Control* https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Environmental-persistence-of-SARS_CoV_2-virus-Options-for-cleaning2020-03-26_0.pdf (2020).
 134. Boyce, J. M. Alcohols as Surface Disinfectants in Healthcare Settings. *Infect Control Hosp Epidemiol* **39**, 323–328 (2021).
 135. European Chemicals Agency. *Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products. Active chlorine released from sodium hypochlorite.* <https://echa.europa.eu/documents/10162/a1ed9c2c-7df0-b950-7aab-3c4103ceae0a> (2017).
 136. Romanowski, E. G., Yates, K. A., Shanks, R. M. Q. & Kowalski, R. P. Benzalkonium Chloride Demonstrates Concentration-Dependent Antiviral Activity Against Adenovirus *in vitro*. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* **35**, 311 (2019).
 137. World Health Organization. *Cleaning and Disinfection of Environmental Surfaces in the context of COVID-19. World Health Organisation* <https://www.who.int/publications/i/item/cleaning-and-disinfection-of-environmental-surfaces-inthe-context-of-covid-19> (2020).

-
138. Lee, J. D. *et al.* Risk Assessment of Triclosan, a Cosmetic Preservative. *Toxicol. Res* **35**, 137–154 (2019).
 139. Song, X., Vossebein, L. & Zille, A. Efficacy of disinfectant-impregnated wipes used for surface disinfection in hospitals: A review. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **8**, 1–14 (2019).
 140. Lachapelle, J. M. *et al.* Antiseptics in the era of bacterial resistance: A focus on povidone iodine. *Clin. Pract.* **10**, 579–592 (2013).
 141. McDonnell, G. E. & Russell, A. D. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 147–179 (1999).
 142. Fraise, A. P., Maillard, J.-Y. & Sattar, S. *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*. (Wiley-Blackwell, 2012). doi:10.1002/9781118425831.ch2.
 143. Schweizer, H. P. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**, 1–7 (2001).
 144. Rutala, W. A. & Weber, D. J. Disinfection, sterilization, and antisepsis: An overview. *Am. J. Infect. Control* **47**, A3–A9 (2019).
 145. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CIDs 410087, 23665760, 702, 9552081, 21988052 and 5564. *National Library of Medicine (US)* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (2021).
 146. Eggers, M. Infectious Disease Management and Control with Povidone Iodine. *Infect. Dis. Ther.* **8**, 581–593 (2019).
 147. Barreto, R. *et al.* Addressing the challenges in antisepsis: focus on povidone iodine. *Int. J. Antimicrob. Agents* **56**, (2020).
 148. Hoekstra, M. J., Westgate, S. J. & Mueller, S. Povidone-iodine ointment demonstrates *in vitro* efficacy against biofilm formation. *Int. Wound J.* **14**, 172–179 (2017).
 149. Oduwole, K. O. *et al.* Anti-biofilm activity of sub-inhibitory povidone-iodine concentrations against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J. Orthop. Res.* **28**, 1252–1256 (2010).
 150. McDonnell, G. E. *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization. Types, action, and resistance*. (ASM Press, 2007).
 151. Rutala, W. A. & Weber, D. J. Uses of Inorganic Hypochlorite (Bleach) in Health-Care Facilities. *Clin. Microb* **10**, 597–610 (1997).
 152. Bruch, M. K. Toxicity and safety of topical sodium hypochlorite. *Contrib. Nephrol.* **154**, 24–38 (2007).
 153. Basrani, B. & Haapasalo, M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod. Top.* **27**, 74–102 (2012).
 154. Mangum, L. C., Franklin, N. A., Garcia, G. R., Akers, K. S. & Wenke, J. C. Rapid degradation and non-selectivity of Dakin's solution prevents effectiveness in contaminated musculoskeletal wound models. *Injury* **49**, 1763–1773 (2018).
 155. Ekizoglu, M. T. & Özalp, M. An Investigation of the Bactericidal Effect of Certain Antiseptics and Disinfectants on Some Hospital Isolates of Gram-Negative Bacteria. *Infect. Control* **24**, 225–227 (2014).
 156. Huang, C., Tao, S., Yuan, J. & Li, X. Effect of sodium hypochlorite on biofilm of *Klebsiella pneumoniae* with different drug resistance. *Am. J. Infect. Control* **000**, 1–7 (2022).
 157. Öztürk, A. *et al.* Evaluation of the Bactericidal Activity of Some Disinfectant Agents against Carbapenem - Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Int. J. Environ. Health Eng.* **9**, 1–6 (2020).
 158. Houari, A. & Di Martino, P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Letts. Appl. Microbiol.* **45**, 652–656 (2007).
 159. López-Rojas, R., Fernández-Cuenca, F., Serrano-Rocha, L. & Pascual, Á. *In vitro* activity of a polyhexanide–betaine solution against high-risk clones of multidrug-resistant nosocomial pathogens. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **35**, 12–19 (2017).
 160. Machuca, J., Lopez-Rojas, R., Fernandez-Cuenca, F. & Pascual. Comparative activity of a polyhexanide–betaine solution against biofilms produced by multidrug-resistant bacteria belonging to high-risk clones. *J. Hosp. Infect.* **103**, e92–e96 (2019).
 161. Pereira, B. M. P. & Tagkopoulos, I. Benzalkonium chlorides: Uses, regulatory status, and microbial resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 1–13 (2019).
 162. Mc Naught, A. D. & Wilkinson, A. *Compendium of Chemical Terminology. IUPAC* (International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), 2019). doi:10.1351/goldbook.
 163. European Chemicals Agency. Ethanol - Information on biocides - ECHA. <https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/biocidal-active-substances/-/disas/substance/100.000.526> (2020).
 164. World Health Organization. *Model List of Essential Medicines*. <https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-use-of-https://www.who.int/publications/i/item/WHOMVPEMPIAU2019.06> (2019).
 165. Chambers, S. T., Peddie, B. & Pithie, A. Ethanol disinfection of plastic-adherent micro-organisms. *J. Hosp. Infect.* **63**, 193–196 (2006).
 166. Kampf, G. Challenging biocide tolerance with antiseptic stewardship. *J. Hosp. Infect.* **100**, e37–e39 (2018).
 167. Suchomel, M., Steinmann, J. & Kampf, G. Efficacies of the original and modified World Health Organization-recommended hand-rub formulations. *J. Hosp. Infect.* **106**, 264–270 (2020).
 168. Kampf, G. & Hollingsworth, A. Comprehensive bactericidal activity of an ethanol-based hand gel in 15 seconds. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **22**, 2 (2008).

169. European Comission. DECISIÓN DE EJECUCIÓN DE LA COMISIÓN - de 24 de abril de 2014 - sobre la no aprobación de determinadas sustancias activas biocidas de conformidad con el Reglamento (UE) no 528/2012 del Parlamento europeo y del Consejo. *D. Of. la Unión Eur.* 27–29 (2014).
170. United States. Food and Drug Administration. Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptic Rubs; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use. *Fed. Regist.* **84**, 3–20 (2019).
171. Heath, R. J. *et al.* Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *J. Biol. Chem.* **274**, 11110–11114 (1999).
172. Russell, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *J. Hosp. Infect.* **57**, 97–104 (2004).
173. Li Jones, G., Muller, C. T. & Stickler, D. J. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 266–272 (2006).
174. European Chemicals Agency. *Guidance on the Biocidal Products Regulation. Volume II Efficacy - Assessment and Evaluation (Parts B+C)*. (2018) doi:10.2823/31176.
175. Morrissey, I. *et al.* Evaluation of Epidemiological Cut-Off Values Indicates that Biocide Resistant Subpopulations Are Uncommon in Natural Isolates of Clinically-Relevant Microorganisms. *PLoS One* **9**, 1–10 (2014).
176. Köhler, A. T. *et al.* Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *J. Hosp. Infect.* **100**, e40–e46 (2018).
177. Westfall, C. *et al.* The Widely Used Antimicrobial Triclosan Induces High Levels of Antibiotic Tolerance *in vitro* and Reduces Antibiotic Efficacy up to 100-Fold *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **63**, (2019).
178. Kim, S. A., Moon, H., Lee, K. & Rhee, M. S. Bactericidal effects of triclosan in soap both *in vitro* and *in vivo*. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 3345–3352 (2015).
179. Hurst, C. J. *Modeling the Transmission and Prevention of Infectious Disease. Advances in Environmental Microbiology* vol. 4 (Springer, 2017).
180. Wand, M. E. *et al.* Characterization of Pre-Antibiotic Era *Klebsiella pneumoniae* Isolates with Respect to Antibiotic/Disinfectant Susceptibility and Virulence in *Galleria mellonella*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3966– (2015).
181. Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O. & Balaban, N. Q. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 320–330 (2016).
182. Bleriot, I. *et al.* Mechanisms of tolerance and resistance to chlorhexidine in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* producers of carbapenemase: Role of new type II toxin-antitoxin system, PemIK. *Toxins (Basel)*. **12**, 566 (2020).
183. Weber, D. J., Rutala, W. A. & Sickbert-Bennett, E. E. Use of germicides in health care settings—is there a relationship between germicide use and antimicrobial resistance: A concise review. *Am. J. Infect. Control* **47**, A106–A109 (2019).
184. Vijayakumar, R. & Sande, T. A review on biocide reduced susceptibility due to plasmid- borne antiseptic-resistant genes — special notes on pharmaceutical environmental isolates. *J. Appl. Microbiol.* **126**, 1011–1022 (2018).
185. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 42–51 (2015).
186. Tong, C. *et al.* Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. *Environmental Research* vol. 195 110897 (2021).
187. Denyer, S. P. & Maillard, J.-Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J. Appl. Microbiol. Symp. Supplement* **92**, 35S-45S (2002).
188. Kim, M. *et al.* Genomic and transcriptomic insights into how bacteria withstand high concentrations of benzalkonium chloride biocides. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, (2018).
189. Fernández-Cuenca, F. *et al.* Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behaviour, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**, 3222–3229 (2015).
190. Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M. & Jolivet-Gougeon, A. Emergence of resistance to antibacterial agents: The role of quaternary ammonium compounds - A critical review. *Int. J. Antimicrob. Agents* **39**, 381–389 (2012).
191. Tabata, A. *et al.* Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2093–2099 (2003).
192. Srinivasan, V. B. *et al.* Functional characterization of a novel outer membrane porin *KpnO*, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. *PLoS One* **7**, (2012).
193. Kim, M. *et al.* Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. *Appl. Environ. Microbiol.* **84**, 1–14 (2018).
194. Nadell, C. D., Drescher, K. & Foster, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 589–600 (2016).
195. Fernando, D. M., Xu, W., Loewen, P. C., Zhanel, G. G. & Kumar, A. Triclosan can select for an AdelJK-overexpressing mutant of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 that displays reduced susceptibility to

-
- multiple antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 6424–6431 (2014).
196. Piddock, L. J. V. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 382–402 (2006).
197. Vijayakumar, R. *et al.* Distribution of biocide resistant genes and biocides susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* — A first report from the Kingdom of Saudi Arabia. *J. Infect. Public Health* **11**, 812–816 (2018).
198. Abuzaid, A., Hamouda, A. & Amyes, S. G. B. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *J. Hosp. Infect.* **81**, 87–91 (2012).
199. McMurry, L. M., Oethinger, M. & Levy, S. B. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**, 305–309 (1998).
200. Srinivasan, V. B. & Rajamohan, G. *KpnEF*, a New Member of the *Klebsiella pneumoniae* Cell Envelope Stress Response Regulon, Is an SMR-Type Efflux Pump Involved in Broad-Spectrum Antimicrobial Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 4449–4462 (2013).
201. Hansen, L. H., Bogø Jensen, L., Sørensen, H. I. & Sørensen, S. J. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 145–147 (2007).
202. Wand, M. E., Jamshidi, S., Bock, L. J., Rahman, K. M. & Sutton, J. M. *SmvA* is an important efflux pump for cationic biocides in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
203. Furi, L. *et al.* Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 3488–3497 (2013).
204. Li, J. *et al.* The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **8**, 1–13 (2019).
205. Curiao, T. *et al.* Polymorphic Variation in Susceptibility and Metabolism of Triclosan-Resistant Mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Obtained after Exposure to Biocides and Antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3413–3423 (2015).
206. Webber, M. A., Randall, L. P., Cooles, S., Woodward, M. J. & Piddock, L. J. V. Triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 83–91 (2008).
207. McMurry, L. M., Oethinger, M. & Levy, S. B. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* **394**, 531–532 (1998).
208. Chuanchuen, R., Karkhoff-Schweizer, R. A. R. & Schweizer, H. P. High-level triclosan resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is solely a result of efflux. *Am. J. Infect. Control* **31**, 124–127 (2003).
209. Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M. & Schweizer, H. P. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J. Bacteriol.* **189**, 7600–7609 (2007).
210. Rajamohan, G., Srinivasan, V. B. & Gebreyes, W. A. Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 228–232 (2009).
211. Coyne, S., Courvalin, P. & Périchon, B. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 947–953 (2011).
212. Zhang, L., Li, X. Z. & Poole, K. SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3497–3503 (2001).
213. Chen, J., Kuroda, T., Huda, M. N., Mizushima, T. & Tsuchiya, T. An RND-type multidrug efflux pump SdeXY from *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 176–179 (2003).
214. Rajamohan, G., Srinivasan, V. B. & Gebreyes, W. A. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1919–1925 (2010).
215. Guo, W. *et al.* Determining the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms. *Pathog. Glob. Health* **109**, 88 (2015).
216. Guo, W., Shan, K., Xu, B. & Li, J. Determining the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms. *Pathog. Glob. Health* **109**, (2015).
217. Schwartz, T. Detection of Antibiotic Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water and Drinking Water Biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* **43**, 325–335 (2003).
218. Su, X. Z., Chen, J., Mizushima, T., Kuroda, T. & Tsuchiya, T. AbeM, an H⁺-coupled *Acinetobacter baumannii* multidrug efflux pump belonging to the MATE family of transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4362–4364 (2005).
219. Dixit, S. & Garg, S. Biodegradation of Environmentally Hazardous Azo Dyes and Aromatic Amines Using *Klebsiella pneumoniae*. *J. Environ. Eng.* **144**, 04018035 (2018).
220. Bilen Ozyurek, S. & Seyis Bilkay, I. Biodegradation of petroleum by *Klebsiella pneumoniae* isolated from drilling fluid. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* **15**, 2107–2116 (2018).
221. Khan, R. *et al.* Biochemical and Structural Basis of Triclosan Resistance in a Novel Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **62**, e00648-18 (2018).
222. Zhu, L., Lin, J., Ma, J., Cronan, J. E. & Wang, H. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due

- to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 689–698 (2010).
223. Rafi, S. *et al.* Structure of acyl carrier protein bound to FabI, the FASII enoyl reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **281**, 39285–39293 (2006).
 224. Chen, Y., Pi, B., Zhou, H., Yu, N. & Li, L. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Microbiol.* **58**, 1086–1091 (2009).
 225. Fernando, D. M. *et al.* Multi-omics approach to study global changes in a triclosan-resistant mutant strain of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Int. J. Antimicrob. Agents* **49**, 74–80 (2017).
 226. Webber, M. A., Coldham, N. G., Woodward, M. J. & Piddock, L. J. V. Proteomic analysis of triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 92–97 (2008).
 227. Sheridan, Á. *et al.* Proteomic and phenotypic analysis of triclosan tolerant verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157: H19. *J. Proteomics* **80**, 78–90 (2013).
 228. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides*. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihp/docs/scenihp_o_021.pdf (2009).
 229. Murray, A. K., Zhang, L., Snape, J. & Gaze, W. H. Comparing the selective and co-selective effects of different antimicrobials in bacterial communities. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 767–773 (2019).
 230. Deng, Y. *et al.* Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **14**, 1–11 (2015).
 231. Cândido, E. de S., de Barros, E., Cardoso, M. H. & Franco, O. L. Bacterial cross-resistance to anti-infective compounds. Is it a real problem? *Curr. Opin. Pharmacol.* **48**, 76–81 (2019).
 232. Sonbol, F. I., El-Banna, T. E., El-Aziz, A. A. A. & El-Ekhnawy, E. Impact of triclosan adaptation on membrane properties, efflux and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* clinical isolates. *J. Appl. Microbiol.* **126**, 730–739 (2018).
 233. Gnanadhas, D. P., Marathe, S. A. & Chakravorty, D. Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opin. Investig. Drugs* **22**, 191–206 (2013).
 234. Wand, M. E., Bock, L. J., Bonney, L. C. & Sutton, J. M. Mechanisms of Increased Resistance to Chlorhexidine and Cross-Resistance to Colistin following Exposure of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates to Chlorhexidine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, e01162-16 (2017).
 235. Zhang, Y. *et al.* Chlorhexidine exposure of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains leads to acquired resistance to this disinfectant and to colistin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **53**, 864–867 (2019).
 236. Lin, H., Ye, C., Chen, S., Zhang, S. & Yu, X. Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. *Environ. Pollut.* **230**, 242–249 (2017).
 237. Molina-González, D., Alonso-Calleja, C., Alonso-Hernando, A. & Capita, R. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* **40**, 329–334 (2014).
 238. Vali, L., Davies, S. E., Lai, L. L. G., Dave, J. & Amyes, S. G. B. Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 524–532 (2008).
 239. Wesgate, R., Fanning, S., Hu, Y. & Maillard, J. Y. Effect of Exposure to Chlorhexidine Residues at “During Use” Concentrations on Antimicrobial Susceptibility Profile, Efflux, Conjugative Plasmid Transfer, and Metabolism of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, (2020).
 240. Buffet-Bataillon, S. *et al.* Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. *J. Hosp. Infect.* **79**, 141–146 (2011).
 241. Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Casado Muñoz, M. del C., Gálvez, A. & Abriouel, H. Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food Microbiol.* **51**, 33–44 (2015).
 242. Karatzas, K. A. G. *et al.* Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 947–955 (2007).
 243. Gadea, R., Fernández Fuentes, M. Á., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. & Ortega, E. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Res. Int.* **85**, 131–143 (2016).
 244. Braoudaki, M. & Hilton, A. C. Adaptive Resistance to Biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and Cross-Resistance to Antimicrobial Agents. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 73–78 (2004).
 245. Abdelaziz, A., Sonbol, F., Elbanna, T. & El-Ekhnawy, E. Exposure to sublethal concentrations of benzalkonium chloride induces antimicrobial resistance and cellular changes in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Microb. Drug Resist.* **25**, 631–638 (2019).
 246. Flemming, H.-C. *et al.* Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**, 563–575 (2016).
 247. Rabin, N. *et al.* Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **7**, 493–512 (2015).

-
248. De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L. & Hancock, R. E. W. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr. Opin. Microbiol.* **16**, 580–589 (2013).
249. Bandeira, M., Borges, V., Gomes, J., Duarte, A. & Jordao, L. Insights on *Klebsiella pneumoniae* Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches. *Microorganisms* **5**, 16 (2017).
250. Stahlhut, S. G., Struve, C., Krogfelt, K. A. & Reisner, A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **65**, 350–359 (2012).
251. Guilhen, C. *et al.* Colonization and immune modulation properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilm-dispersed cells. *npj Biofilms Microbiomes* **5**, 1–11 (2019).
252. Shen, L. *et al.* Microbiological analysis of endotracheal aspirate and endotracheal tube cultures in mechanically ventilated patients. *BMC Pulm. Med.* **19**, (2019).
253. Alcántar-Curiel, M. D. *et al.* Association of Antibiotic Resistance, Cell Adherence, and Biofilm Production with the Endemicity of Nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed Res. Int.* **2018**, (2018).
254. Ribeiro, S. M., Cardoso, M. H., Cândido, E. D. S. & Franco, O. L. Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiol.* **11**, 527–538 (2016).
255. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 95–108 (2004).
256. Flemming, H. C. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–633 (2010).
257. Renner, L. D. & Weibel, D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull.* **36**, 347–355 (2011).
258. Schroll, C., Barken, K. B., Krogfelt, K. A. & Struve, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol.* **10**, (2010).
259. Zhou, L., Zhang, Y., Ge, Y., Zhu, X. & Pan, J. Regulatory Mechanisms and Promising Applications of Quorum Sensing-Inhibiting Agents in Control of Bacterial Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* **11**, 1–11 (2020).
260. Lazar, V., Holban, A. M., Curutiu, C. & Chifiriuc, M. C. Modulation of Quorum Sensing and Biofilms in Less Investigated Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
261. Garnett, J. A. *et al.* Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 3950–3955 (2012).
262. Alcántar-Curiel, M. D. *et al.* Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* **4**, 129–138 (2013).
263. Schwan, W. R. Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J. Clin. Infect. Dis.* **1**, 1–17 (2011).
264. Alonso-Caballero, A. *et al.* Mechanical architecture and folding of *E. coli* type 1 pilus domains. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
265. Sahly, H. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 3029–3034 (2008).
266. Murphy, C. N., Mortensen, M. S., Krogfelt, K. A. & Clegg, S. Role of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. *Infect. Immun.* **81**, 3009–3017 (2013).
267. Wurple, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K. & Schembri, M. A. Chaperone-Usher Fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One* **8**, (2013).
268. Lozano, C. *et al.* High prevalence of *spa* types associated with the clonal lineage CC398 among tetracycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in a Spanish hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 330–334 (2012).
269. Madsen, J. S. *et al.* Type 3 fimbriae encoded on plasmids are expressed from a unique promoter without affecting host motility, facilitating an exceptional phenotype that enhances conjugal plasmid transfer. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
270. Johnson, J. G., Murphy, C. N., Sippy, J., Johnson, T. J. & Clegg, S. Type 3 fimbriae and biofilm formation are regulated by the transcriptional regulators MrkHI in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **193**, 3453–3460 (2011).
271. Langstraat, J., Bohse, M. & Clegg, S. Type 3 Fimbrial Shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but Not the Fimbrial Adhesin (MrkD), Facilitates Biofilm Formation. *Infect. Immun.* **69**, 5805–5812 (2001).
272. Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B. & Darfeuille-Michaud, A. *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res. Microbiol.* **154**, 9–16 (2003).
273. Murphy, C. N. & Clegg, S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* **7**, 991–1002 (2012).
274. Struve, C. & Krogfelt, K. A. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* studies. *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 149–154 (2003).
275. Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z. & Zhou, D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* **9**, 1071–1081 (2014).
276. Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A. & Klemm, P. Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* **73**, 4626–4633 (2005).
277. Balestrino, D., Ghigo, J. M., Charbonnel, N., Haagensen, J. A. J. & Forestier, C. The characterization of

- functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae in vitro* biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ. Microbiol.* **10**, 685–701 (2008).
278. Singh, A. K. *et al.* Classification of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Based on Their *in vitro* Biofilm Forming Capabilities and Elucidation of the Biofilm Matrix Chemistry With Special Reference to the Protein Content. *Front. Microbiol.* **10**, 669 (2019).
279. Bales, P. M., Renke, E. M., May, S. L., Shen, Y. & Nelson, D. C. Purification and Characterization of Biofilm-Associated EPS Exopolysaccharides from ESKAPE Organisms and Other Pathogens. *PLoS One* **8**, e67950 (2013).
280. Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Molin, S., Givskov, M. & Høiby, N. Applying insights from biofilm biology to drug development-can a new approach be developed? *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 791–808 (2013).
281. Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V. & Dubois-Brissonnet, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* **27**, 1017–1032 (2011).
282. Anderl, J. N., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1818–1824 (2000).
283. Singla, S., Harjai, K. & Chhibber, S. Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **66**, 61–66 (2013).
284. Balcázar, J. L., Subirats, J. & Borrego, C. M. The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
285. Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Stoodley, P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* **13**, 34–40 (2005).
286. Hannan, S. *et al.* Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **59**, 345–349 (2010).
287. Driffield, K., Miller, K., Bostock, J. M., O'Neill, A. J. & Chopra, I. Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1053–1056 (2008).
288. Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 255–261 (2003).
289. Tanner, W. D. *et al.* Horizontal transfer of the *bla*NDM-1 gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.* **364**, (2017).
290. Hausner, M. & Wuertz, S. High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 3710–3713 (1999).
291. Stalder, T. & Top, E. Plasmid transfer in biofilms: A perspective on limitations and opportunities. *npj Biofilms Microbiomes* **2**, 1–5 (2016).
292. Hennequin, C., Aumeran, C., Robin, F., Traore, O. & Forestier, C. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2123–2130 (2012).
293. Warnes, S. L., Highmore, C. J. & Keevil, C. W. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces: Implications for public health. *MBio* **3**, (2012).
294. Perez-Palacios, P. *et al.* Transfer of plasmids harbouring *bla*OXA-48-like carbapenemase genes in biofilm-growing *Klebsiella pneumoniae*: Effect of biocide exposure. *Microbiol. Res.* **254**, 944–5013 (2022).
295. Hall, C. W. & Mah, T.-F. F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, 276–301 (2017).
296. Kouzel, N., Oldewurtel, E. R. & Maier, B. Gene transfer efficiency in gonococcal biofilms: Role of biofilm age, architecture, and pilin antigenic variation. *J. Bacteriol.* **197**, 2422–2431 (2015).
297. Hendrickx, L., Hausner, M. & Wuertz, S. Natural genetic transformation in monoculture *Acinetobacter* sp. strain BD413 biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1721–1727 (2003).
298. Azeredo, J. *et al.* Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* **43**, 313–351 (2017).
299. The International Academy for Production Engineering, Laperrière, L. & Reinhart, G. *CIRP Encyclopedia of Production Engineering*. *CIRP Encyclopedia of Production Engineering* (Springer Berlin Heidelberg, 2014). doi:10.1007/978-3-642-20617-7_6595.
300. Wilksch, J. J. *et al.* MrKH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
301. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0, 2022*. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/. (2022).
302. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. (2022).
303. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th Edition. 112 (2018).
304. Clinical and Laboratory Standards Institute. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 1–94 (2015).
305. Ballester-Télez, M. *et al.* Role of inoculum and mutant frequency on fosfomicin MIC discrepancies by agar dilution and broth microdilution methods in *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Infect.* **23**, 325–331 (2017).
306. Sprouffske, K. & Wagner, A. Growthcurver: An R package for obtaining interpretable metrics from microbial

-
- growth curves. *BMC Bioinformatics* **17**, 172 (2016).
307. Stepanović, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **115**, 891–899 (2007).
308. Rojo-Moliner, E. *et al.* Sequential Treatment of Biofilms with Aztreonam and Tobramycin Is a Novel Strategy for Combating *Pseudomonas aeruginosa* Chronic Respiratory Infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, (2016).
309. Cruz, S. A. *et al.* Bursting the bubble on bacterial biofilms: A flow cell methodology. *Biofouling* **28**, 835–842 (2012).
310. Barraud, N., Moscoso, J. A., Ghigo, J.-M. & Filloux, A. Methods for Studying Biofilm Dispersal in *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods Mol.* **1149**, 643–651 (2014).
311. Heydorn, A. *et al.* Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT. *Microbiology* **146**, 2395–2407 (2000).
312. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
313. Inácio Gomes, É. A. *et al.* Selection and validation of reference genes for gene expression studies in *Klebsiella pneumoniae* using Reverse Transcription Quantitative real-time PCR. *Sci. Rep.* **8**, 1–14 (2018).
314. Oteo, J. *et al.* Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Spain in 2012. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 6344–6347 (2013).
315. Ciufo, S. *et al.* Using average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**, 2386–2392 (2018).
316. Maillard, J. Y. Resistance of Bacteria to Biocides. *Microbiol. Spectr.* **6**, 1–17 (2018).
317. Poole, K. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* **92**, 55S–64S (2002).
318. Feßler, A. T. *et al.* Development and evaluation of a broth macrodilution method to determine the biocide susceptibility of bacteria. *Vet. Microbiol.* **223**, 59–64 (2018).
319. Schug, A. R. *et al.* Biocide susceptibility testing of bacteria: Development of a broth microdilution method. *Vet. Microbiol.* **248**, (2020).
320. Khan, R. *et al.* Triclosan Resistome from Metagenome Reveals Diverse Enoyl Acyl Carrier Protein Reductases and Selective Enrichment of Triclosan Resistance Genes. *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
321. Buckner, M. M. C. *et al.* Clinically relevant plasmid-host interactions indicate that transcriptional and not genomic modifications ameliorate fitness costs of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-carrying plasmids. *MBio* **9**, 2303–2320 (2018).
322. San Millan, A. & MacLean, R. C. Fitness Costs of Plasmids: A Limit to Plasmid Transmission. *Microb. Transm.* **5**, 65–79 (2017).
323. Benenson, S. *et al.* Comparison of two carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones: From a contained outbreak in a paediatric population and from a national epidemic. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 1651–1654 (2012).
324. Gelinas, P., Goulet, J., Tastayre, G. M. & Picard, G. A. Effect of Temperature and Contact Time on the Activity of Eight Disinfectants-A Classification. *J. Food Prot.* **47**, 841–847 (1984).
325. Tsuji, A., Kaneko, Y., Takahashi, K., Ogawa, M. & Goto, S. The Effects of Temperature and pH on the Growth of Eight Enteric and Nine Glucose Non-Fermenting Species of Gram-Negative Rods. *Microbiol. Immunol.* **26**, 15–24 (1982).
326. Bengoechea, J., Pessoa, J. & Whitfield, C. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 123–144 (2019).
327. Esener, A. A., Roels, J. A. & Kossen, N. W. F. The influence of temperature on the maximum specific growth rate of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol. Bioeng.* **23**, 1401–1405 (1981).
328. Abbas, S. Z. *et al.* Isolation and characterization of arsenic resistant bacteria from wastewater. *Brazilian J. Microbiol.* **45**, 1309–1315 (2014).
329. Konopacki, M. *et al.* Single mathematical parameter for evaluation of the microorganisms' growth as the objective function in the optimization by the doe techniques. *Microorganisms* **8**, 1–11 (2020).
330. Lallemand, E. A. *et al.* *In vitro* degradation of antimicrobials during use of broth microdilution method can increase the measured minimal inhibitory and minimal bactericidal concentrations. *Front. Microbiol.* **7**, 2051 (2016).
331. Tilton, R. C., Lieberman, L. & Gerlach, E. H. Microdilution antibiotic susceptibility test: examination of certain variables. *J. Appl. Microbiol.* **26**, 658–665 (1973).
332. Brenner, V. C. & Sherris, J. C. Influence of different media and bloods on results of diffusion antibiotic susceptibility tests. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1**, 116–122 (1972).
333. Lambert, R. J. W. & Johnston, M. D. The effect of interfering substances on the disinfection process: a mathematical model. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 548–555 (2001).
334. Kawamura-Sato, K., Wachino, J. -i., Kondo, T., Ito, H. & Arakawa, Y. Reduction of disinfectant bactericidal activities in clinically isolated *Acinetobacter* species in the presence of organic material. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 568–576 (2008).
335. Milanović, M., Đurić, L., Milošević, N. & Milić, N. Comprehensive insight into triclosan—from widespread

- occurrence to health outcomes. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **1**, 3 (2021).
336. Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A. & Needham, L. L. Urinary concentrations of triclosan in the U.S. population: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* **116**, 303–307 (2008).
337. MacIsaac, J. K. *et al.* Health care worker exposures to the antibacterial agent triclosan. *J. Occup. Environ. Med.* **56**, 834–839 (2014).
338. United States. Food and Drug Administration. Safety and Effectiveness of Health Care Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use; Proposed Amendment of the Tentative Final Monograph; Reopening of Administrative Record. *Fed. Regist.* **80**, 25166–25205 (2015).
339. Azadpour, M., Nowroozi, J., Goudarzi, G. & Mahmoudvand, H. Presence of *qacED1* and *cepA* genes and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Iran. *Trop. Biomed.* **32**, 109–115 (2015).
340. Sonnevend, Á. *et al.* Multihospital Occurrence of Pan-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 147 with an *ISEcp1*-Directed *blaOXA-181* Insertion in the *mgrB* Gene in the United Arab Emirates. *Antibiotics* **61**, (2017).
341. Yazgan, B., Türkel, I., Güçkan, R., Kılıç, K. & Yıldırım, T. Comparison of biofilm formation and efflux pumps in ESBL and carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Infect. Dev. Ctries.* **12**, 156–163 (2018).
342. Türkel, I., Yıldırım, T., Yazgan, B., Bilgin, M. & Başbulut, E. Relationship between antibiotic resistance, efflux pumps, and biofilm formation in extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Chemother.* **30**, 354–363 (2018).
343. Abuzaid, A. & Amyes, S. G. B. The genetic environment of the antiseptic resistance genes *qacED* and *cepA* in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Chemother.* **27**, 139–145 (2015).
344. Ferreira, R. L. *et al.* High prevalence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a Brazilian intensive care unit. *Front. Microbiol.* **10**, 15 (2019).
345. Alcalde-Rico, M., Hernando-Amado, S., Blanco, P. & Martinez, J. L. Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. *Front. Microbiol.* **7**, 1483 (2016).
346. Thanassi, D. G., Cheng, L. W. & Nikaido, H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 2512–2518 (1997).
347. Urdaneta, V. & Casadesús, J. Adaptation of *Salmonella enterica* to bile: essential role of AcrAB-mediated efflux. *Environ. Microbiol.* **20**, 1405–1418 (2018).
348. Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 20–51 (2005).
349. Wong, M. H. Y., Chan, E. W. C. & Chen, S. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 3290–3297 (2015).
350. Sliński, C. J., Zhanel, G. G. & Bay, D. C. Biocide Selective TolC-Independent Efflux Pumps in *Enterobacteriaceae*. *J. Membr. Biol.* **251**, 15–33 (2018).
351. Yu, B. J., Kim, J. A. & Pan, J. G. Signature gene expression profile of triclosan-resistant *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 1171–1177 (2010).
352. Chen, Y. *et al.* Determining the susceptibility of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains against common disinfectants at a tertiary hospital in China. *BMC Infect. Dis.* **20**, 88 (2020).
353. Zamorano, L. *et al.* Mobile genetic elements related to the diffusion of plasmid-mediated AmpC β -lactamases or carbapenemases from *Enterobacteriaceae*: Findings from a multicenter study in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 5260–5266 (2015).
354. Domingues, S. *et al.* Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLoS Pathog.* **8**, 1002837 (2012).
355. Amos, G. C. A. *et al.* The widespread dissemination of integrons throughout bacterial communities in a riverine system. *ISME J.* **12**, 681–691 (2018).
356. Osei Sekyere, J. & Amoako, D. G. Genomic and phenotypic characterisation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* in Durban, South Africa. *PLoS One* **12**, (2017).
357. Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B. & Burrows, L. L. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr. Opin. Microbiol.* **45**, 164–169 (2018).
358. Costa, D. *et al.* Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Lett. Appl. Microbiol.* **68**, 269–276 (2019).
359. Hošťacká, A., Čížnár, I. & Štefkovičová, M. Temperature and pH affect the production of bacterial biofilm. *Folia Microbiol. (Praha)*. **55**, 75–78 (2010).
360. Nicolau Korres, A. M. *et al.* Comparison of biofilm and attachment mechanisms of a phytopathological and clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* Subsp. *pneumoniae*. *Sci. World J.* 1–6 (2013) doi:10.1155/2013/925375.
361. Bruchmann, S. *et al.* Deep transcriptome profiling of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals strain and sequence type-specific adaptation. *Environ. Microbiol.* **17**, 4690–4710 (2015).
362. Liu, Y. *et al.* Capsular Polysaccharide Types and Virulence-Related Traits of Epidemic KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Chinese University Hospital. *Microb. Drug Resist.* **23**, 901–907 (2017).
363. Naparstek, L., Carmeli, Y., Navon-Venezia, S. & Banin, E. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**,

-
- 1027–1034 (2014).
364. van Beek, J. *et al.* Tracing local and regional clusters of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST512 with whole genome sequencing, Finland, 2013 to 2018. *Eurosurveillance* **24**, 1800522 (2019).
365. Lerner, A. *et al.* Environmental contamination by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 177–181 (2013).
366. Heireman, L. *et al.* Toilet drain water as a potential source of hospital room-to-room transmission of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Hosp. Infect.* **106**, 232–239 (2020).
367. Liu, Y., Zhang, X., Cai, L. & Zong, Z. Enhanced survival of ST-11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **41**, 740–742 (2020).
368. Liao, W., Liu, Y. & Zhang, W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **23**, 174–180 (2020).
369. Zhao, J. *et al.* Genomic characteristics of clinically important ST11 *Klebsiella pneumoniae* strains worldwide. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **22**, 519–526 (2020).
370. White-Ziegler, C. A. *et al.* Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **154**, 148–166 (2008).
371. Król, J. E. *et al.* Genome rearrangements induce biofilm formation in *Escherichia coli* C - An old model organism with a new application in biofilm research. *BMC Genomics* **20**, 1–18 (2019).
372. Repoila, F. & Gottesman, S. Signal transduction cascade for regulation of RpoS: Temperature regulation of DsrA. *J. Bacteriol.* **183**, 4012–4023 (2001).
373. Ares, M. A. *et al.* H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of *Klebsiella pneumoniae* by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **6**, (2016).
374. Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.* **45**, 502–531 (2012).
375. Liu, Z., Niu, H., Wu, S. & Huang, R. CsgD regulatory network in a bacterial trait-altering biofilm formation. *Emerg. Microbes Infect.* **3**, 1–5 (2014).
376. Schellhorn, H. E. Elucidating the function of the RpoS regulon. *Future Microbiol.* **9**, 497–507 (2014).
377. Struve, C., Bojer, M. & Krogfelt, K. A. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect. Immun.* **77**, 5016–5024 (2009).
378. Vuotto, C. *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *J. Appl. Microbiol.* **123**, 1003–1018 (2017).
379. Gato, E. *et al.* Kpi, a chaperone-usher pili system associated with the worldwide-disseminated high-risk clone *Klebsiella pneumoniae* ST-15. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, (2020).
380. Adler, A. *et al.* Development and validation of a multiplex PCR assay for identification of the epidemic ST-258/512 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **78**, 12–5 (2014).
381. Capita, R., Riesco-Peláez, F., Alonso-Hernando, A. & Alonso-Calleja, C. Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to Sublethal Concentrations of Food-Grade Biocides Influences Its Ability To Form Biofilm, Resistance to Antimicrobials, and Ultrastructure. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1268–1280 (2014).
382. Forbes, S., Dobson, C. B., Humphreys, G. J. & McBain, A. J. Transient and Sustained Bacterial Adaptation following Repeated Sublethal Exposure to Microbicides and a Novel Human Antimicrobial Peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5809–5817 (2014).
383. Stempel, N., Nusser, M., Neidig, A., Brenner-Weiss, G. & Overhage, J. The oxidative stress agent hypochlorite stimulates c-di-GMP synthesis and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* **8**, 1–15 (2017).
384. Romeu, M. J., Rodrigues, D. & Azeredo, J. Effect of sub-lethal chemical disinfection on the biofilm forming ability, resistance to antibiotics and expression of virulence genes of *Salmonella* Enteritidis biofilm-surviving cells. *Biofouling* **36**, 101–112 (2020).
385. Condell, O. *et al.* Efficacy of Biocides Used in the Modern Food Industry To Control *Salmonella enterica*, and Links between Biocide Tolerance and Resistance to Clinically Relevant Antimicrobial Compounds. *Applied* **78**, 3087–97 (2012).
386. Weterings, V. *et al.* An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July to December 2013), with inter-institutional spread. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **34**, 1647–1655 (2015).
387. Tofteland, S., Naseer, U., Lislevand, J. H., Sundsfjord, A. & Samuelsen, Ø. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. *PLoS One* **8**, e59015 (2013).
388. Kaiser, T. *et al.* Stalking a lethal superbug by whole-genome sequencing and phylogenetics: Influence on unraveling a major hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Am. J. Infect. Control* **46**, 54–59 (2018).
389. Kampf, G. Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. *Antibiotics* **7**, (2018).
390. Bock, L. J. Bacterial biocide resistance: A new scourge of the infectious disease world? *Arch. Dis. Child.* **104**,

- 1029–1033 (2019).
391. Dynes, J. J. *et al.* Morphological and biochemical changes in *Pseudomonas fluorescens* biofilms induced by sub-inhibitory exposure to antimicrobial agents. *Can. J. Microbiol.* **55**, 163–178 (2009).
392. Suzuki, Y. *et al.* Effects of a sub-minimum inhibitory concentration of chlorhexidine gluconate on the development of *in vitro* multi-species biofilms. *Biofouling* **36**, 146–158 (2020).
393. Elekhawy, E. A., Sonbol, F. I., Elbanna, T. E. & Abdelaziz, A. A. Evaluation of the impact of adaptation of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to benzalkonium chloride on biofilm formation. *Egypt. J. Med. Hum. Genet.* **22**, (2021).
394. Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N. & Pitouta, J. D. D. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, (2020).
395. Bonomo, R. A. *et al.* Carbapenemase-Producing Organisms : A Global Scourge. *Clin. Infect. Dis.* **66**, (2018).
396. Logan, L. K. & Weinstein, R. A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J. Infect. Di* **215**, S28–S36 (2017).

8. Anexos

Anexo 1: Secuencias de referencia de genes que codifican bombas de expulsión y genes del operón *mrkABCDF*.

A1.1. Secuencias de referencia de genes que codifican bombas de expulsión

Gen	Fuente	Aa	Origen	Nombre de la secuencia
<i>cepA</i>	NCBI Protein	300	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BAB89353. Cation efflux pump A [<i>Klebsiella pneumoniae</i>].
<i>acrA</i>	Blastp	397	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> HS11286	WP_002892072.1 multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit AcrA
<i>acrB</i>	Blastp	1048	<i>Klebsiella pneumoniae</i> P12	WP_150074312.1 multidrug efflux RND transporter permease subunit AcrB [<i>Klebsiella pneumoniae</i>]
<i>KpnE</i>	Blastp	120	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578, ATCC 700721	WP_002903681.1 MULTISPECIES: multidrug efflux SMR transporter subunit KpnE [<i>Klebsiella</i>]
<i>KpnF</i>	Blastp	109	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578, ATCC 700721	WP_002903683.1 MULTISPECIES: multidrug efflux SMR transporter subunit KpnF [Enterobacteriaceae]
<i>oqxA</i>	UniProt	391	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	tr A0A1Y0PW27 A0A1Y0PW27_KLEPN Multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit OqxA
<i>oqxB</i>	UniProt	1050	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	tr A0A3N0P613 A0A3N0P613_KLEPN Multidrug efflux RND transporter permease subunit OqxB
<i>SmvA</i>	UniProt	494	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (strain ATCC 700721 / MGH 78578)	tr A6T9N7 A6T9N7_KLEP7 Methyl viologen resistance energy-dependent efflux. Gene smvA
<i>SmvR</i>	Blastp	191	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_004888643.1 MULTISPECIES: TetR family transcriptional regulator [Enterobacteriaceae]
<i>qacED1</i>	UniProt	115	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	tr Q7BK05 Q7BK05_KLEPN Multidrug efflux protein GN=qacEdelta1
<i>qacE</i>	UniProt	110	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	tr F8T8V5 F8T8V5_KLEPN QacE
<i>qacA</i>	Blastp	520	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	WP_015958439.1 MULTISPECIES: DHA2 family efflux MFS transporter permease subunit [<i>Klebsiella</i>]

Aa: número de aminoácidos.

A1.2. Secuencias de referencia de genes del operón *mrkABCDF*.

Gen	Fuente	Aa	Origen	Nombre de la secuencia
<i>mrkA</i>	Blastp	202	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 ATCC 700721	WP_002916128.1 MULTISPECIES: type 3 fimbria major subunit MrkA
<i>mrkB</i>	Blastp	233	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 ATCC 700721	WP_000820818.1 MULTISPECIES: type 3 fimbria chaperone MrkB
<i>mrkC</i>	Blastp	828	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 ATCC 700721	WP_000813718.1 MULTISPECIES: type 3 fimbria usher protein MrkC
<i>mrkD</i>	Blastp	331	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 ATCC 700721	WP_002916123.1 MULTISPECIES: type 3 fimbria adhesin subunit MrkD
<i>mrkF</i>	Blastp	211	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578 ATCC 700721	WP_002916122.1 MULTISPECIES: type 3 fimbria minor subunit MrkF

Aa: número de aminoácidos.

Anexo 2: producción científica

Publicaciones directamente derivadas de esta Tesis:

- **Gual-de-Torrella, A.**, Delgado-Valverde, M., Pérez-Palacios, P., Oteo-Iglesias, J., Pascual, Á., & Fernández-Cuenca, F. (2021). *In vitro* activity of six biocides against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and presence of genes encoding efflux pumps. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2021.05.004>. doi:10.1016/j.eimc.2021.05.004. In Press
- **Gual-de-Torrella A.**, Delgado-Valverde M, Pérez-Palacios P., Oteo-Iglesias J., Rojo-Molinero E., Macià MD., Oliver A., Pascual A., Fernández-Cuenca F. Prevalence of the fimbrial operon *mrkABCD*, *mrkA* expression, biofilm formation and effect of biocides on biofilm formation in carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging or not to high-risk clones pneumoniae isolates belonging or not to high-risk clones. **En revisión en “International Journal of Antimicrobial Agents”**.

Otras publicaciones relacionadas con esta Tesis:

- Bleriot I. Blasco L., Delgado-Valverde M., **Gual-de-Torrella A.**, Ambroa A., Fernandez-Garcia L., Lopez M., Oteo-Iglesias J., Wood T. K., Pascual A., Bou G., Fernandez-Cuenca F., Tomas M. Mechanisms of tolerance and resistance to chlorhexidine in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* producers of carbapenemase: Role of new type II toxin-antitoxin system, PemIK. *Toxins (Basel)*. 12, 566 (2020). doi: 10.3390/toxins12090566.
- Perez-Palacios, P. Delgado-Valverde, M. **Gual-de-Torrella, A.** Oteo-Iglesias, J. Pascual, A. Fernández-Cuenca, F. Co-transfer of plasmid-encoded *bla* carbapenemases genes and mercury resistance operon in high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2021) doi:10.1007/S00253-021-11684-2. Online
- Perez-Palacios, P., **Gual-de-Torrella A.**, Delgado-Valverde M., Oteo-Iglesias J., Hidalgo-Díaz C., Pascual A., Fernandez-Cuenca F. Transfer of plasmids harbouring *bla* OXA-48-like carbapenemase genes in biofilm-growing *Klebsiella pneumoniae*: Effect of biocide exposure. *Microbiol. Res.* 254, 944–5013 (2022). doi: 10.1016/j.micres.2021.126894.

