

## Tesis de grado.

Caracterización genética y fenotípica de aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* con fenotipo de resistencia a múltiples drogas.

Carrera: Licenciatura en Química

Estudiante : Ana Claudia Fagúndez

Tutora: Dra. Carolina Márquez

## RESUMEN

*Klebsiella pneumoniae* (Kp) es una enterobacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, en el ambiente hospitalario Kp es un patógeno oportunista, que causa con frecuencia diversas infecciones y ha sido exitosa en el desarrollo de resistencia a diversas clases de antimicrobianos y en la diseminación por contacto.

En éste trabajo de tesis se estudiaron aislamientos de Kp pertenecientes al secuenciotipo ST258 y a diferentes pulsotipos, resistentes a múltiples drogas (RMD) incluida la colistina, provenientes de infecciones intra-hospitalarias previamente secuenciados por el grupo de investigación.

El objetivo de este estudio fue contribuir al entendimiento de la resistencia a los antibióticos (ATB) de interés clínico, con especial énfasis en los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, cefalosporinas de espectro extendido y los carbapenemes, y aportar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas causadas por Kp.

Se realizó una caracterización fenotípica basada en la producción e inhibición de biofilm frente a la acción de diferentes compuestos químicos. Por otra parte, se realizó la caracterización del genoma completo y la búsqueda de genes de resistencia, tipos de plásmidos y tipos capsulares.

Todos los aislamientos fueron productores de biofilm en las condiciones ensayadas. El polipéptido colistina fue capaz de inhibir la formación de biofilm a concentraciones sub inhibitorias. Los complejos polioles tendrían el potencial para ser utilizados in vivo como agentes antibiofilm en combinación con el uso de antibióticos, debiéndose seguir estudiando. Se detectaron genes involucrados en la resistencia a diferentes antibióticos y elementos de cápsula, estos hallazgos podrían explicar el fenotipo de resistencia a múltiples drogas presentado por los aislamientos en estudio. Se observaron tanto, mutaciones en genes codificantes del sitio blanco de acción del antibiótico y de proteínas de transporte de membrana externa como, la adquisición de genes exógenos codificantes de beta-lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Se detectaron plásmidos pertenecientes a una gran variedad de grupos de incompatibilidad, identificados con frecuencia en Enterobacterias, y co-residentes en algunos aislamientos. Se observaron diferentes tipos de locus capsulares.

## Introducción

### *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* (Kp) es una Enterobacteria ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándose en aguas superficiales, aguas de desecho, suelo, vegetación, en las membranas mucosas de mamíferos y como saprófito en la nasofaringe e intestino del hombre, siendo estos y especialmente el tracto gastrointestinal sus principales reservorios (1). Kp es un bacilo gram negativo, capaz de fermentar la lactosa, puede utilizar el citrato como única fuente de carbono, no produce ácido sulfhídrico, no produce indol, produce la enzima ureasa y puede descarboxilar la lisina (2).

En el ambiente hospitalario Kp es un patógeno oportunista, que causa con frecuencia diversas infecciones siendo importante como patógeno urinario, abdominal y respiratorio. Kp ha sido exitosa en el desarrollo de resistencia a diversas clases de antimicrobianos y en la diseminación por contacto (3).

Naturalmente Kp contiene en su ADN cromosomal el gen codificante de la enzima  $\beta$ -lactamasa SHV-1, la cual le confiere resistencia a la ampicilina, ticarcilina y piperacilina, por lo tanto este perfil de resistencia corresponde al fenotipo salvaje de Kp (4).

El grado de colonización de los pacientes hospitalizados por cepas multirresistentes aumenta al aumentar el tiempo de permanencia en el hospital. Además del tiempo de hospitalización, otros factores que favorecen la colonización son procedimientos quirúrgicos, diabetes, problemas renales, cáncer, el uso de catéteres y la administración de antimicrobianos (5). La morbi-mortalidad producida por Kp está relacionada en gran medida a la capacidad de formación de biofilm y a la resistencia adquirida a los antimicrobianos utilizados para combatirla, especialmente debido a la expresión de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y de carbapenemasas del tipo KPC (6) (estas últimas son conocidas como Kp-KPC, *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC). Una de las estrategias de sobrevivencia primordiales que presenta Kp es la facilidad para adquirir resistencia a varios antibióticos químicamente no relacionados y diseminarla.

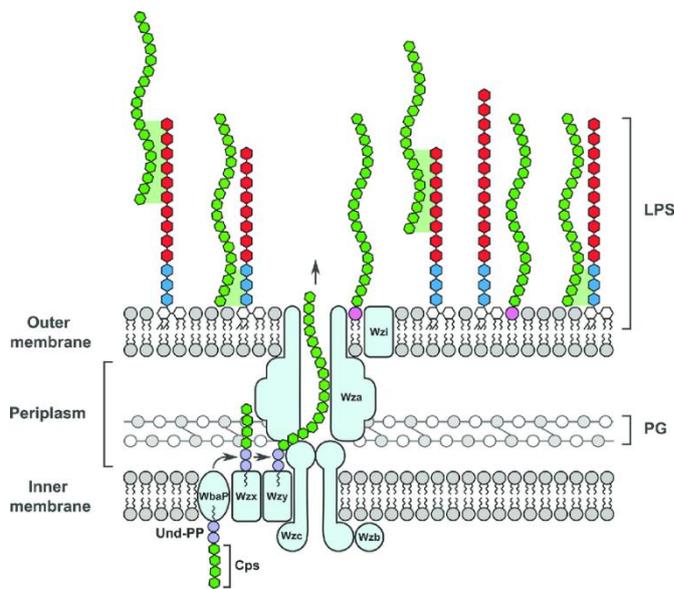
Las infecciones serias causadas por Kp son habitualmente tratadas con los antibióticos betalactámicos, cefalosporinas y carbapenemes, quinolonas, aminoglucósidos, colistina y tigeciclina. La colistina y la tigeciclina son los últimos recursos frente a la emergencia de Kp productoras de carbapenemasas con fenotipo RMD.

Desde el año 2008, el equipo de investigación del Laboratorio de Microbiología Clínica de Facultad de Química viene identificando diferentes clases de carbapenemasas como son *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub> y *bla*<sub>NDM-1</sub>. En el año 2011 se identificó por primera vez en Uruguay aislamientos clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa del tipo KPC-2 proveniente de infecciones en pacientes graves, en un centro de tratamiento intensivo de Maldonado (7), (8). Los aislamientos presentaron un fenotipo de resistencia a múltiples drogas (RMD) incluyendo la colistina lo que derivó en tratamientos con regímenes antimicrobianos alternativos sin eficiencia terapéutica demostrada.

Kp tiene diferentes mecanismos para lograr su sobrevivencia, entre los que se encuentran:

- 1) Adquisición de genes de resistencia a antibióticos mediante la transferencia de plásmidos
- 2) Mutaciones puntuales en genes cromosomales que codifican resistencia a antibióticos
- 3) Expresión de diferentes factores de virulencia como ser la producción de cápsula, fimbrias y ureasa
- 4) Capacidad de formación de biofilms

### Factor de virulencia: producción de cápsula



**Figura 1** . Modelo de cápsulas por *K. pneumoniae*.

La *Figura 1* muestra un modelo de cápsula de Kp. La asociación entre el antígeno O en el LPS y la cápsula de polisacárido se produce posiblemente por un simple entrelazamiento de las fibrillas. El antígeno O se muestra en rojo y el oligosacárido central en azul. Algunos tipos de cápsulas pueden usar un portador acilado (rosa) para unir la fibrilla de la cápsula a la superficie bacteriana. La ligadura del antígeno LPS - O es necesaria para una retención máxima de la cápsula, y Wzi desempeña un papel menor en la retención de la cápsula, posiblemente a través de sus propiedades como lectina.

### Formación de biofilm

La capacidad de Kp para formar biofilms es un mecanismo importante en las infecciones persistentes y en las adquiridas en el ámbito hospitalario. Las bacterias en el biofilm están protegidas de los mecanismos de la respuesta inmune innata del huésped y tienen una mayor resistencia a los antimicrobianos que sus formas planctónicas, lo que favorece la producción de infecciones crónicas.

Es importante buscar nuevos blancos que inhiban los mecanismos de virulencia que puedan ayudar en forma cooperativa a mejorar el tratamiento de esas infecciones.

Estudios recientes, han demostrado la eficacia de varios compuestos para inhibir o erradicar el biofilm, entre los que se destacan los compuestos metálicos, y los péptidos antimicrobianos. La colistina es un antibiótico peptídico utilizado en combinación con otros, como último recurso para el tratamiento de infecciones serias causadas por Kp-KPC y varios estudios han demostrado su capacidad como agente anti biofilm.(9)

**Principales mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos betalactámicos en bacterias gram negativas.**

Los Betalactámicos constituyen una familia extensa de ATB y son los más utilizados en la práctica clínica. Son ATB bactericidas y de amplio espectro.

BETALACTÁMICOS		
<b>PENICILINAS</b>	<b>NATURALES</b>	Penicilina G sódica, Penicilina Benzatínica, Penicilina V
	<b>AMINOPENICILINAS</b>	Ampicilina, Amoxicilina
	<b>ANTIESTAFOCÓCICAS</b>	Meticilina, Cloxacilina, Nafcilina
	<b>CARBOXIPENICILINAS</b>	Ticarcilina, Carbenicilina
	<b>UREIDOPENICILINAS</b>	Piperacilina
<b>CEFALOSPORINAS</b>	<b>CEFALOSPORINAS DE 1ª GENERACIÓN</b>	Cefaclor, Cefalexina, Cefalotina, Cefazolina
	<b>CEFALOSPORINAS DE 2ª GENERACIÓN</b>	Cefuroxima, Cefoxitina
	<b>CEFALOSPORINAS DE 3ª GENERACIÓN</b>	Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefixima
	<b>CEFALOPORINAS DE 4ª GENERACIÓN</b>	Cefepime
	<b>CEFALOSPORINAS DE 5ª GENERACIÓN</b>	Ceftarolina, Ceftobiprole
	<b>NUEVAS CEFALOSPORINAS</b>	Cefiderocol
<b>MONOBACTAMES</b>	Aztreonam	
<b>CARBAPENEMES</b>	Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem	
<b>COMBINACIÓN CON INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS</b>	Ampicilina-Sulbactam, Amoxicilina-Clavulánico, Piperacilina-Tazobactam, Ceftolozano-Tazobactam, Cefatazidima-Avibactam	

**Figura 2.** Antibióticos betalactámicos

Los betalactámicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana. El mecanismo de acción se basa en la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular. Estos ATB se unen a enzimas conocidas como PLP (proteínas ligadoras de penicilina), necesarias para la síntesis del peptidoglucano e interrumpen la síntesis de la pared celular. Además, activan enzimas líticas (autolisinas) que llevan a la muerte bacteriana. (10)

A continuación, se presentan los diferentes tipos de mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos que pueden actuar de forma cooperativa o individualmente:

- 1) Alteración del sitio blanco de acción, las proteínas de unión a las penicilinas
- 2) Disminución de la permeabilidad de la membrana externa por pérdida o modificación de porinas
- 3) Mecanismos que disminuyen la concentración del antimicrobiano en el interior celular bacteriano.
- 4) Producción de enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico ( $\beta$ -lactamasas). (11)

Los mecanismos de resistencia que representan un riesgo clínico significativo en el tratamiento de las infecciones con ATB betalactámicos son los mecanismos 2 y 4.

*Disminución de la permeabilidad de la membrana externa por pérdida o modificación de porinas*

La membrana externa de *K. pneumoniae* forma una barrera de permeabilidad que modula la capacidad de los antibióticos para alcanzar su objetivo intracelular. Mediante las porinas es que atraviesan los antibióticos betalactámicos la barrera exterior bacteriana. Las mutaciones en estos genes llevan a la pérdida casi total de porinas en las bacterias, impidiendo totalmente el ingreso de los antibióticos beta-lactámicos.

Ompk35, Ompk36, Ompk37, Ompk38, PhoE y Ompk26 son porinas en la membrana externa de *K. pneumoniae*, y tienen una relación causal con los fenotipos de resistencia a los medicamentos en un contexto fisiológico (12). En particular Ompk35 y Ompk36 / Ompk37 pueden estar modificadas en bacterias resistentes a cefalosporinas de tercera generación y carbapenems, respectivamente.

*Producción de enzimas que hidrolizan el anillo betalactámico ( $\beta$ -lactamasas): betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas*

Las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) tienen la particularidad de conferir resistencia a las penicilinas, a todas las cefalosporinas y al aztreonam, excepto a las cefamicinas y a los carbapenemas, y pueden ser inhibidas por el ácido clavulánico u otro inhibidor de  $\beta$ -lactamasas.

Las principales BLEE identificadas en enterobacterias pertenecen a las familias TEM, SHV y principalmente a CTX-M, y el éxito de su diseminación está relacionado con la ubicación de los genes correspondientes en plásmidos conjugativos que se pueden transferir a cepas de la misma especie o especies diferentes, aspecto que complica la terapia de algunas infecciones causadas por bacterias productoras de BLEE. (13)

El mecanismo más importante de resistencia a carbapenémicos en enterobacterias es la producción de carbapenemasas, aunque dicha resistencia también puede deberse a la combinación de betalactamasas tipo AmpC o, en menor medida, de espectro extendido, combinadas con disminución de la permeabilidad de la membrana externa. Se conocen 3 tipos moleculares de carbapenemasas: A, B y D. Las de las clases A y D son betalactamasas de serina y son inhibidas por ácido clavulánico mientras que las de clase B son metalobetalactamasas, no afectan a los monobactámicos y son inhibidas por quelantes del zinc. Actualmente, las carbapenemasas más importantes de clase A son KPC, las de clase B son VIM, IMP, y en especial NDM, y las de clase D, OXA-48. Frecuentemente las Enterobacterias productoras de carbapenemasas contienen genes de resistencia a quinolonas, aminoglucósidos, tetraciclinas, sulfonamidas y otros antimicrobianos, causando multiresistencia o incluso panresistencia. Aunque algunas enzimas están codificadas por genes cromosómicos, la mayoría están mediadas por plásmidos lo cual favorece la diseminación de estas enzimas (14).

***Principales mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos fluoroquinolonas (ciprofloxacina).***

1. mutación a nivel de la ADN girasa, gyrA, gyrB, parC .
2. bombas de eflujo

Las fluoroquinolonas actúan en el ADN cromosómico bacteriano, uniéndose a algunas de las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, por desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico.

*Alteración del sitio blanco de acción: ADN girasa y topoisomerasa IV*

El mecanismo más importante de resistencia es por alteración de su diana. Alteraciones en alguna de las subunidades de la ADN-girasa o de la topoisomerasa IV son los mecanismos más prevalentes.

- Gen gyrA : codifica para la subunidad A de la ADN girasa, una mutación provoca una susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas. El mecanismo de resistencia determinado por mutaciones en el gen gyrA ha sido descrito en *K. pneumoniae*. (15)
- Gen parC : codifica para la topoisomerasa IV, mutaciones en el gen parC se asocia al aumento de resistencia a quinolonas (16).
- Gen gyrB : codifica para la subunidad B de la ADN girasa. Una mutación provoca una susceptibilidad disminuida a las fluoroquinolonas (15).

*Protección del sitio blanco: ADN-girasa y de la topoisomerasa IV*

Es un mecanismo de resistencia localizado en plásmidos y mediado por proteínas Qnr, pertenecientes a la familia de los pentapéptidos repetidos, que protegen el sitio diana y están codificadas por los genes qnrA, qnrB, qnrC y qnrS.

*Producción de enzimas que modifican las quinolonas*

Otro mecanismo plasmídico es la enzima AAC(6')-Ib-cr, variante de una aminoglucósido acetiltransferasa AAC(6')-Ib, capaz de modificar simultáneamente a las quinolonas y a aminoglucósidos como la amikacina.

Ambos mecanismos mediados por plásmidos proporcionan un bajo nivel de resistencia que facilita el surgimiento y selección de niveles mayores de resistencia en presencia de quinolonas.

*Sobreexpresión de bombas de expulsión activa puede llevar a resistencia a quinolona.*

La magnitud de los aumentos de concentración inhibitoria mínima (CIM) que resultan de la sobreexpresión de genes que codifican proteínas de bombas de expulsión depende de cada quinolona y de cada sistema de expulsión.

El gen *acrR* codifica para un represor local que regula la bomba de eflujo *AcrAB*. Al inhibirse el represor, se sobreexpresa la bomba, lo que permite mayor expulsión de la droga hacia el exterior. Esta mutación está reportada en la resistencia a fluoroquinolonas. (17)

### ***Principales mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos aminoglucósidos, gentamicina y amikacina***

Los aminoglucósidos son antibióticos de gran interés para el tratamiento de infecciones graves o sospechosas de estar provocadas por bacterias multirresistentes. Los aminoglucósidos se unen a la subunidad 30S del ribosoma, provocando una alteración de la síntesis de proteínas.

#### *Producción de enzimas que modifican los aminoglucósidos (EMA)*

El mecanismo más frecuente corresponde a la inactivación de los compuestos por enzimas modificantes de aminoglucósidos siendo las de mayor relevancia clínica las EMAS: AAC(3)-II y AAC(6')-Ib. Se tratan de aminoglucósido-acetiltransferasas (AAC), que acetilan grupos amino utilizando como cofactor la acetilcoenzima A. La enzima AAC(3)-II inactiva gentamicina, pero no amikacina, mientras que la AAC(6')-Ib, inactiva amikacina, pero no gentamicina. (18)

#### *Protección del sitio blanco subunidad 30S del ribosoma*

Este mecanismo consiste en la adición de un grupo metilo por una enzima metiltransferasa en el ARNr 16S, lo cual bloquea la unión del aminoglucósido al ribosoma. El gen *rmtF* codifica para la enzima RmtF, una 16S rRNA metiltransferasa se caracteriza por conferir un elevado nivel de resistencia a todos los aminoglucósidos disponibles en la práctica clínica. Por ello su descubrimiento fue alarmante para la Salud Pública.

### ***Principales mecanismos de resistencia vinculados a la colistina***

Actualmente, sólo dos polimixinas, polimixina E (colistina) y polimixina B, están disponibles comercialmente. La colistina ha resurgido como tratamiento de última línea a mediados de la década de los 90 para el tratamiento de infecciones severas ocasionadas por bacilos gramnegativos resistentes a múltiples antimicrobianos. El blanco principal de la colistina es el LPS de la membrana externa donde ejerce su acción antibacteriana a través de la interacción directa con el componente lípido A del LPS. Desafortunadamente, el aumento de la utilización de este antibiótico trajo como consecuencia el incremento de la resistencia global a la colistina.

Los mecanismos de resistencia se producen debido a las modificaciones en la integridad de la membrana celular y afectan el anclaje con la bacteria, ya sea a nivel del lipopolisacárido o por alteración iónica de la misma membrana (por cambios en el Mg<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup>). Estas modificaciones pueden deberse tanto por las mutaciones en los genes cromosomales y en los genes de resistencia móviles transmisibles a través de plásmido (*mcr*).

**Importancia epidemiológica de evaluar la presencia de plásmidos conjugativos en *Kp* multiresistentes**

Los plásmidos portadores de determinantes de resistencia, con capacidad conjugativa o de movilización, son las estructuras extracromosomales de mayor relevancia epidemiológica, por su capacidad de promover la diseminación horizontal de un gran número de genes de resistencia, contribuyendo al incremento de las poblaciones bacterianas resistentes y promoviendo la aparición de cepas patógenas multiresistentes. La necesidad de rastrear plásmidos que confieren resistencia a los medicamentos llevó a desarrollar un método de tipificación basado en PCR de inc/rep. En este método, se diseñaron 18 pares de cebadores para realizar 5 PCRs multiplex y 3 simplex, reconociendo los replicones FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-Iy, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F y FIIA, representativos de los principales grupos de incompatibilidad de plásmidos que circulan entre Enterobacteriaceae.

Los plásmidos IncFIIK están asociados con la adquisición y diseminación de resistencia a múltiples antimicrobianos en *Klebsiella pneumoniae*. Los plásmidos IncFIIK prevalecen en *K. pneumoniae* pero son escasos en otras enterobacterias. Los replicones IncFIIK tienen tres linajes. (19)

En este trabajo de tesis se propone, sobre una selección de aislamientos de *K. pneumoniae* previamente caracterizados por el grupo de investigación, analizar la capacidad para formar biofilm, la inhibición de formación del biofilm frente a la acción de diferentes compuestos químicos y analizar el contenido de genes de resistencia, tipo de plásmidos, tipo cápsula.

## Objetivos General

Contribuir al entendimiento de factores de supervivencia de *Klebsiella pneumoniae* de origen hospitalario y aportar nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas.

## Objetivos específicos.

1. Analizar la capacidad de producción de biofilm de aislamientos de Kp con fenotipo RMD
2. Evaluar la capacidad de inhibición de biofilm por los siguientes compuestos mediante la determinación de la CIMB (concentración inhibitoria mínima de biofilm):  
Zn-xilytol :  $[Zn_4(xylH-4)_2(H_2O)_2] \cdot NaCl \cdot 3H_2O$   
Cu-xilytol :  $Na_2[Cu_3(xylH-4)_2] \cdot NaCl \cdot 4.5H_2O$   
Sulfacloropiridazina-Plata (Ag-SCP)  
Sulfamoxol-Plata (Ag-SMX)  $[Ag_2(SMX)_2] \cdot H_2O$  y  $[Ag_4(SCN)_3(SMX)] \cdot H_2O$   
Colistina
3. Estudiar la presencia de genes de resistencia, plásmidos, tipo de cápsula, mediante el uso de herramientas bioinformáticas y de bases de datos, basado en la secuencias de los genomas obtenidos con anterioridad.

## Materiales y métodos.

### Aislamientos estudiados.

Se analizaron una selección de aislamientos de *K. pneumoniae* previamente caracterizados por el grupo de investigación, que presentaban resistencia a múltiples drogas (RMD) incluida la colistina, pertenecientes a diferentes pulsotipos y al mismo secuenciotipo ST258.

En la *Tabla 1* se muestra la caracterización fenotípica y genotípica ya realizada por el grupo de investigación para los aislamientos estudiados y para la cepa de referencia local KP 1124. (20)

**Tabla 1: Caracterización fenotípica de aislamientos de *K. pneumoniae* ST258**

Aislamiento	Año de aislamiento	Origen de la muestra	Clona <sup>a</sup>	CIMs (mg/L) por Vitek <sup>b</sup>								CIM (mg/L) por MDC <sup>c</sup>
				TZP	CTX	CAZ	GM	AMK	CIP	IMP	MEM	
KP 666	2011	Orina <sup>d</sup>	I	≥128 (R)	16 (R)	16 (R)	SD	16 (R)	≥4 (R)	8 (R)	4 (R)	256 (R)
M 1366	2016	Orina <sup>d</sup>	II	≥128 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	4 (R)	≥64 (R)	≥4 (R)	2 (I)	4 (R)	32 (R)
FQ 1180366	2017	Orina <sup>d</sup>	III	≥128 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	16 (R)	≥64 (R)	≥4 (R)	≥16 (R)	8 (R)	≥128 (R)
FQ 38879	2017	SD	IV	≥128 (R)	8 (R)	16 (R)	2 (I)	16 (R)	≥4 (R)	≥16 (R)	≥16 (R)	64 (R)
M 1604	2017	Hisopado rectal <sup>e</sup>	V	≥128 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	≤1 (S)	16 (R)	≥4 (R)	4 (R)	4 (R)	16 (R)
KP 09	2018	Hisopado rectal <sup>e</sup>	VI	≥128 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	≤1 (S)	8 (S)	≥4 (R)	≤0.25 (S)	≤0.25 (S)	16 (R)

**Aclaraciones:** <sup>a</sup> determinado por electroforesis en gel por campo pulsante; <sup>b</sup> CIM: concentración inhibitoria mínima, TZP: Piperacillin/tazobactam, CTX: Cefotaxime, CAZ: Ceftazidime, GM: Gentamicin, AMK: Amikacin, CIP: Ciprofloxacina, IMP: Imipenem, MEM: Meropenem, COL: colistina, <sup>c</sup>MDC: método de referencia de microdilución en caldo, S: susceptible, R: resistente, I: intermedio, SD: sin datos; <sup>d</sup> Las muestras de orina corresponden a infecciones; <sup>e</sup> las muestras de hisopado rectal son de colonización.

Los antibióticos ensayados corresponden a 5 clases diferentes en el antibiograma de la *Tabla 1*. En clases según su tipo, podemos identificar 6 clases:

**Clase I: TZP (Piperacillin/tazobactam)** : fármaco compuesto por un antibiótico betalactámico (PIP) y un inhibidor de betalactamasa (TZ)

**Clase II:** cefalosporinas de 3ra generación (subtipo de antibiótico betalactámico): **CTX (Cefotaxime) y CAZ (Ceftazidime)**

**Clase III:** aminoglucósidos: **GM (Gentamicin) y AMK (Amikacin)**

**Clase IV:** fluoroquinolonas: **CIP (Ciprofloxacina)**

**Clase V:** carbapenems: **IMP (Imipenem) y MEM (Meropenem)**

Un aislamiento presenta un fenotipo de resistencia a múltiples drogas cuando es resistente al menos a 1 antibiótico de 3 clases diferentes de antibióticos (21). De acuerdo a esta última definición todos los aislamientos en estudio presentan fenotipo RDM.

## **Materiales y métodos para alcanzar el objetivo 1.**

### **Evaluación de capacidad de formación de biofilms estáticos**

Para analizar la capacidad de producción de biofilm de los aislamientos se utilizó un método basado en la capacidad bacteriana de adherirse a las paredes de una policubeta de poliestireno y luego mediante tinción con cristal violeta medir de manera indirecta el biofilm formado. Se realizó un experimento con siete réplicas. Se eligió como control positivo para la producción de biofilm la cepa Ec ATCC 25922 y como control negativo el medio de cultivo sin el agregado de bacterias. En el anexo A se describe el protocolo que se utilizó el cual está basado en lo establecido por Villegas y col., 2013. mediante un experimento semicuantitativo de cuantificación de la biomasa de biofilms con el uso de cristal violeta.

Los aislamientos se clasifican teniendo en cuenta su capacidad de producción de biofilm dentro de distintas categorías según el valor de DO obtenido en los experimentos. Se consideraron como *no productores* cuando la  $DO \leq DO_c$ , siendo la  $DO_c = DO \text{ control negativo} + 3 \text{ desviaciones standard}$ , *débil productor de biofilm* cuando  $DO_c < DO \leq 2xDO_c$ , *moderado productor de biofilm* cuando  $2xDO_c < DO \leq 4xDO_c$  y *fuerte productor de biofilm* cuando  $DO > 4xDO_c$  (22).

Los datos se analizaron y graficaron usando el programa estadístico *GraphPad Prism 10.1.0*.

## **Materiales y métodos para alcanzar el objetivo 2.**

### **Evaluación la capacidad de inhibición de biofilm por diferentes compuestos químicos**

Se analizaron 2 complejos metálicos con azúcares alcohólicos (Zn-xilytol y Cu-xilytol), 2 complejos de Ag con variantes de sulfonamidas (Ag-SCP y Ag-SMX) y el polipéptido colistina (Tabla 2). Todos los complejos metálicos fueron disueltos en Dimetilsulfóxido (debido a su baja polaridad). La inhibición de un biofilm de 48 hs se ensayó mediante técnica estática con tinción de cristal violeta en placas de 96 pocillos a concentraciones sub inhibitorias en las cuales el DMSO no superó el 1%. En el anexo A se describe el protocolo que se utilizó el cual está basado en lo establecido por Blango y Mulvey, 2010.

Los conjuntos de datos se analizaron considerando un coeficiente de variación (CV) menor al 30%. Mediante la determinación de la desviación estándar (DE), se determinó el intervalo de confianza (IC) para cada grupo de datos. Se consideró  $\pm 2 \text{ DE}$  para poder afirmar con un 95% de certeza que el resultado es estadísticamente significativo. Se evaluaron dependencia o independencia entre grupos de datos en función del solapamiento o no de los IC. Si éstos se solapan se consideró dependencia de datos y por lo tanto los resultados serán no significativos. En caso contrario los datos serán de significancia para el estudio.

Se tabularon todos los resultados obtenidos.

Los resultados y análisis de los mismos pueden verse en el Anexo B.

Los posibles resultados a obtener son: inhibición, sobreexpresión o sin cambios, y esto se concluye comparando el crecimiento post incubación con el agente inhibidor vs el crecimiento del control positivo. Ver protocolo en *Anexo B*.

**Tabla 2:** Propiedades químicas de los compuestos a ensayar en su capacidad de inhibir la producción de biofilm.

Compuesto químico	Solvente	Concentraciones en estudio ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Tipo de compuesto químico
Zn-xilytol	DMSO	1 , 2	Polioles
Cu-xilytol	DMSO	1 , 2	Polioles
Ag-SCP	DMSO	1 , 2	Polioles
Ag-SMX	DMSO	1 , 2	Polioles
Colistina	Agua	2 , 4 , 8 , 16 , 32 , 64	Polipéptido

*Aclaraciones:* DMSO : dimetilsulfóxido ; SCP : Sulfacloropiridazina ; SMX : Sulfamoxol.

### **Materiales y métodos para alcanzar el objetivo 3.**

Los genomas totales fueron secuenciados previamente por el grupo de trabajo, utilizando la tecnología de Ilumina y/o Nanopore tal como se indica en *Tabla 3*.

### **Caracterización genómica**

La caracterización del genoma se obtuvo mediante la anotación de los archivos .fasta en RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology) para acceder a los datos sobre su: tamaño, % GC, N50 , L50.

El N50 indica cuán buena es la calidad del ensamblado. N50 se define como una estadística mediana ponderada tal que el 50% de todo el conjunto está contenido en contigs que son iguales o mayores que este valor. Cuanto mayor es N50 más preciso es el ensamblaje y para este estudio consideramos que un N50 mayor a 150.000 determina un buen ensamblado.

El L50 es el número del contig cuya suma de longitud es el valor N50. Si el valor de L50 es 8 (a modo de ejemplo), quiere decir que en 8 contigs (que son los más grandes) está el 50% del total del largo del ADN.

Se identificaron los genes de resistencia, genes de virulencia y elementos genéticos móviles mediante el uso de las siguientes bases de datos y herramientas bioinformáticas:

- *Center of Genomic Epidemiology: ResFinder* : <http://genepi.food.dtu.dk/resfinder> :

por comparación con una referencia de una base de datos ya precargada al programa de enterobacterias halla genes de resistencia a antibióticos, pueden ser tanto mutaciones puntuales en genes cromosomales que generen resistencia a algún antibiótico como ungen entero adquirido de resistencia.

- *Center of Genomic Epidemiology: PlasmidFinder* : <https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/> : encuentra plásmidos presentes indicando de qué otra bacteria posiblemente lo adquirió

- *Institute Pasteur: Bigsdb* : [https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst\\_klebsiella\\_seqdef](https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef) : se utiliza para identificar diferentes elementos de cápsula, particularmente en este caso se buscan los genes : wzi/wzc.

**Tabla 3. Tecnologías utilizadas en la secuenciación de los genomas.**

<b>Aislado clínico</b>	<b>Método de secuenciación</b>
FQ1180366	Nanopore +Illumina
M1366	Illumina
FQ38879	Nanopore+Illumina
M1604	Illumina
KP 09	Illumina
KP 666	Illumina

## Resultados y conclusiones

- **Resultados y conclusiones con respecto al objetivo 1**

### **Conclusiones del estudio de formación de biofilm.**

La planificación del ensayo se muestra en *Tabla 1* y los datos obtenidos de DO se muestran en la *Tabla 2*, del anexo B.

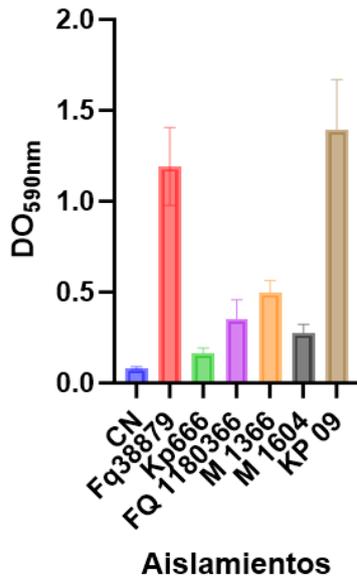
Se evaluaron los pre-inóculos y todos crecieron de igual forma y llegando a fase estacionaria.

Se realizó un único ensayo con 7 réplicas.

Se determinó que todos los aislamientos producen biofilm según la clasificación de Stepanovi (22).

**Tabla 4.** Resultados en la producción de biofilm, según la clasificación de Stepanovi.

<b>Aislamiento</b>	<b>Interpretación de resultados</b>
<b>FQ 1180366</b>	<b>FUERTE</b>
<b>FQ 38879</b>	<b>FUERTE</b>
<b>M 1366</b>	<b>FUERTE</b>
<b>M 1604</b>	<b>MODERADA</b>
<b>KP 09</b>	<b>FUERTE</b>
<b>KP 666</b>	<b>DÉBIL</b>



**Figura 1.** Estudio de formación de biofilm de los aislamientos FQ38879 , Kp666 , FQ1180366 , M1366 , M1604 , KP09.

Los aislamientos se clasificaron teniendo en cuenta su capacidad de producción de biofilm en categorías según el valor de DO obtenido. Se consideran como no productores cuando la DO es  $\leq$  DOc (siendo DOc= DOcontrol negativo + 3 desviaciones estándar), débil productor de biofilm cuando  $\text{DOc} < \text{DO} \leq 2\text{xDOc}$ , moderado productor de biofilm cuando  $2\text{xDOc} < \text{DO} \leq 4\text{xDOc}$  y fuerte productor de biofilm cuando  $\text{DO} > 4\text{xDOc}$ .

Se compararon los resultados de formación de biofilm respecto al Control Negativo y en todos los casos se obtuvo que existía una diferencia significativa respecto al mismo, siendo el aislamiento KP 09 el que produjo mayor cantidad de biofilm (*Figura 1*).

Para el análisis de datos se asumió una distribución no normal de datos y se analizaron los mismos mediante el test no paramétrico *one way ANOVA ( and nonparametric or mixed)* mediante el programa *GraphPad Prism 10.1.0* de forma de evaluar si existía dependencia entre los grupos de datos.

Se pudo corroborar no dependencia entre los grupos de datos.

Todos los aislados son productores de biofilm, lo que permitió seguir adelante con la evaluación de inhibición de biofilm con los agentes inhibidores seleccionados.

- **Resultados y conclusiones con respecto al objetivo 2**

**Conclusiones sobre el estudio inhibición de la formación de biofilm usando Colistina como agente inhibidor**

En las tablas 4 a 11 del Anexo B se pueden ver las planificaciones de los ensayos, los resultados obtenidos de DO a 590 nm, las correcciones de las medidas respecto al control negativo y el estudio de SD, promedio y CV.

Para las concentraciones de 16 µg/mL y 8 µg/mL el CN presenta crecimiento por lo que los resultados no fueron tomados en cuenta.

**Tabla 5.** Porcentajes de inhibición o sobreexpresión obtenidos a las diferentes concentraciones ensayadas de colistin.

Concentración de colistina	Aislado	% inhibición o sobreexpresión	¿Es estadísticamente significativo?
4µg/mL	24Kp09	97	No
2µg/mL	24Kp09	94	No
1µg/mL	24Kp09	39	No
0,5µg/mL	24Kp09	10	No
0,25µg/mL	24Kp09	23	No
0,125µg/mL	24Kp09	9	No
<b>2µg/mL</b>	<b>FQ1180366</b>	<b>96</b>	<b>Sí</b>
<b>1µg/mL</b>	<b>FQ1180366</b>	<b>72</b>	<b>Sí</b>
0,25µg/mL	FQ1180366	22	No
0,125µg/mL	FQ1180366	36	No
<b>2µg/mL</b>	<b>FQ38879</b>	<b>92</b>	<b>Sí</b>
1µg/mL	FQ38879	65	No
0,5µg/mL	FQ38879	54	No
0,25µg/mL	FQ38879	32	No
0,125µg/mL	FQ38879	16	No
1µg/mL	M1366	80	No
0,5µg/mL	M1366	10	No
0,25µg/mL	M1366	-34	No
0,125µg/mL	M1366	-9	No
<b>1µg/mL</b>	<b>M1604</b>	<b>73</b>	<b>Sí</b>
0,5µg/mL	M1604	39	No
0,25µg/mL	M1604	31	No
0,125µg/mL	M1604	-5	No
4µg/mL	Kp666	-384	No
2µg/mL	Kp666	-295	No
1µg/mL	Kp666	-603	No
0,5µg/mL	Kp666	-206	No
0,25µg/mL	Kp666	-261	No
0,125µg/mL	Kp666	-157	No

Aclaración: un porcentaje negativo indica sobreexpresión en la formación de biofilm.

Se observan variaciones en el porcentaje de inhibición según el aislado, usando colistina como agente inhibidor. FQ1180366 , FQ38879 , M1604 fueron las que presentaron inhibición significativa estadísticamente.

Por razones que escapan al análisis actual, a determinadas concentraciones de colistina y dependiendo del aislado, se sobre expresa el crecimiento bacteriano. (ver *Tabla 5*).

Basado en la C.I.M que presentan los aislamientos en estudio a la colistina se planteó evaluar la concentración inhibitoria de formación de biofilm en diferentes rangos de concentración de colistina.

**Tabla 6.** Concentraciones ensayadas de colistina para determinación de la concentración inhibitoria mínima de formación de biofilm (C.I.M.B.)

Aislado	C.I.M. al colistin	Rango de concentraciones de colistin ensayado
FQ 1180366	$\geq 128$ (R) $\mu\text{g/mL}$	0.125 $\mu\text{g/mL}$ - 16 $\mu\text{g/mL}$
FQ 38879	64 ( R ) $\mu\text{g/mL}$	0.125 $\mu\text{g/mL}$ - 16 $\mu\text{g/mL}$
M 1366	32 ( R ) $\mu\text{g/mL}$	0.125 $\mu\text{g/mL}$ - 16 $\mu\text{g/mL}$
M 1604	16 ( R ) $\mu\text{g/mL}$	0.125 $\mu\text{g/mL}$ - 16 $\mu\text{g/mL}$
KP 09	16 ( R ) $\mu\text{g/mL}$	0.125 $\mu\text{g/mL}$ - 16 $\mu\text{g/mL}$
KP 666	256 ( R ) $\mu\text{g/mL}$	0.125 $\mu\text{g/mL}$ - 16 $\mu\text{g/mL}$

**Tabla 7.** Concentración inhibitoria mínima de formación de biofilm (CIMB) usando colistina como agente inhibidor.

Aislado	Concentración inhibitoria mínima de biofilm
FQ 1180366	2 $\mu\text{g/mL}$
FQ 38879	2 $\mu\text{g/mL}$
M 1604	1 $\mu\text{g/mL}$

En la *Tabla 7* se muestran la CIMB para los aislados, teniendo en cuenta el mayor porcentaje de inhibición obtenido. Considerando la nefrotoxicidad de la colistina a concentraciones mayores a 2  $\mu\text{g/mL}$ , las concentraciones de 1 y 2  $\mu\text{g/mL}$  obtenidas son promisorias para su uso en conjunto con un antimicrobiano.

No se pudo establecer la CIMB para los aislados 24Kp09 y M1366 dado que los resultados obtenidos no tuvieron significancia estadística. En el caso de la Kp666 para todas las concentraciones ensayadas sobre expresó la formación de biofilm.

### **Conclusiones sobre el estudio de inhibición de la formación de biofilm usando Zn-xilytol y Cu- xilitol como agente inhibidor.**

El rango de concentraciones utilizado para el Zn-xilytol y Cu- xilitol fue de 1.0 a 2.0  $\mu\text{g/mL}$ ; los aislamientos utilizados fueron Kp 09, Kp 666 , FQ 1180366, FQ 38879 , M1366 y M1604.

En las tablas 14 a 17 del Anexo B se pueden ver las planificaciones de los ensayos, los resultados obtenidos de DO a 590 nm, las correcciones de las medidas respecto al control negativo y el estudio de DV, promedio y CV.

**Tabla 8.** Porcentajes de inhibición o sobreexpresión obtenidos a las diferentes concentraciones ensayadas de Cu - xilytol.

Concentración de Cu - xilytol	Aislado	% inhibición o sobreexpresión	¿Es estadísticamente significativo?
1 µg/mL	24Kp09	-31	No
2 µg/mL	24Kp09	-98	No
1 µg/mL	FQ1180366	-146	No
2 µg/mL	FQ1180366	-153	No
<b>1 µg/mL</b>	<b>FQ38879</b>	<b>87</b>	<b>Sí</b>
<b>2 µg/mL</b>	<b>FQ38879</b>	<b>68</b>	<b>Sí</b>
<b>1 µg/mL</b>	<b>M1366</b>	<b>-113</b>	<b>Sí</b>
<b>2 µg/mL</b>	<b>M1366</b>	<b>-1167</b>	<b>Sí</b>
1 µg/mL	M1604	79	No
2 µg/mL	M1604	65	No
<b>1 µg/mL</b>	<b>Kp666</b>	<b>67</b>	<b>Sí</b>
<b>2 µg/mL</b>	<b>Kp666</b>	<b>90</b>	<b>Sí</b>

Aclaración: un porcentaje negativo indica sobreexpresión en la formación de biofilm.

Usando Cu - xilytol como agente inhibidor se observan variaciones en el porcentaje de inhibición según el aislado. FQ38879 , M1366 y Kp666 fueron los aislados que presentaron resultados significativos estadísticamente. El mayor porcentaje de inhibición varía según el aislado.

La M1366 sobre expresa la formación de biofilm a ambas concentraciones ensayadas. Por razones que escapan al análisis actual, a determinadas concentraciones de Cu - xilytol y dependiendo del aislado, se sobre expresa el crecimiento bacteriano. (ver *Tabla 8*).

El hecho de haberse logrado inhibir el biofilm con ambas concentraciones ensayadas para los aislados FQ38879 y Kp666 convierte a Cu- xilytol en buena opción para seguir siendo investigada en el uso en infecciones bacterianas por *Klebsiella pneumoniae*.

**Tabla 9.** Porcentajes de inhibición o sobreexpresión obtenidos a las diferentes concentraciones ensayadas de Zn - xilytol.

Concentración de Zn - xilytol	Aislado	% inhibición o sobreexpresión	¿Es estadísticamente significativo?
1 µg/mL	24Kp09	-45	No
2 µg/mL	24Kp09	-46	No
1 µg/mL	FQ1180366	-163	No
2 µg/mL	FQ1180366	-193	No
1 µg/mL	FQ38879	76	No
2 µg/mL	FQ38879	80	No
1 µg/mL	M1366	-415	No
2 µg/mL	M1366	-938	No
1 µg/mL	M1604	60	No
2 µg/mL	M1604	66	No
1 µg/mL	Kp666	74	No
2 µg/mL	Kp666	84	No

Aclaración: un porcentaje negativo indica sobreexpresión del biofilm.

Usando Zn - xilytol como agente inhibidor no fue posible determinar porcentaje de inhibición de formación de biofilm con significancia estadística.

No es posible establecer concentraciones inhibitorias mínimas de formación de biofilm en el uso de Zn - xilytol y Cu - xilytol ya que el rango de concentraciones ensayados fue acotado, en un futuro trabajo se podrían trabajar más concentraciones para determinarlo.

**Conclusiones sobre el estudio de inhibición de la formación de biofilm usando Ag-SCP y Ag-SMX como agentes inhibidores.**

El rango de concentraciones utilizado para el Ag-SCP y Ag-SMX fue de 1.0 a 2.0 µg/mL; los aislamientos utilizados fueron Kp 09, Kp 666 , FQ 1180366, FQ 38879 , M1366 y M1604.

En las tablas 19 a 22 del Anexo B se pueden ver las planificaciones de los ensayos, los resultados obtenidos de DO a 590 nm, las correcciones de las medidas respecto al control negativo y el estudio de DV, promedio y CV .

**Tabla 10.** Porcentajes de inhibición o sobreexpresión obtenidos a las diferentes concentraciones ensayadas de Ag - SCP.

Concentración de Ag -SCP	Aislado	% inhibición o sobreexpresión	¿Es estadísticamente significativo?
1 µg/mL	24Kp09	-74	No
2 µg/mL	24Kp09	-34	No
1 µg/mL	FQ1180366	-239	No
2 µg/mL	FQ1180366	-187	No
1 µg/mL	FQ38879	31	No
2 µg/mL	FQ38879	34	No
1 µg/mL	M1366	-587	No
2 µg/mL	M1366	-1146	No
1 µg/mL	M1604	56	No
2 µg/mL	M1604	44	No
<b>1 µg/mL</b>	<b>Kp666</b>	<b>73</b>	<b>Sí</b>
<b>2 µg/mL</b>	<b>Kp666</b>	<b>86</b>	<b>Sí</b>

Aclaración: un porcentaje negativo indica sobreexpresión de la formación biofilm.

**Tabla 11.** Porcentajes de inhibición o sobreexpresión obtenidos a las diferentes concentraciones ensayadas de Ag - SMX.

Concentración de Ag -SMX	Aislado	% inhibición o sobreexpresión	¿Es estadísticamente significativo?
1 µg/mL	24Kp09	-69	No
2 µg/mL	24Kp09	-74	No
1 µg/mL	FQ1180366	-213	No
2 µg/mL	FQ1180366	-177	No
1 µg/mL	FQ38879	46	No
2 µg/mL	FQ38879	39	No
1 µg/mL	M1366	-975	No
2 µg/mL	M1366	-1861	No
1 µg/mL	M1604	43	No
2 µg/mL	M1604	55	No

1 µg/mL	Kp666	75	Sí
2 µg/mL	Kp666	93	Sí

Aclaración: un porcentaje negativo indica sobreexpresión de la formación de biofilm.

Usando Ag -SCP y Ag -SMX como agentes inhibidores se logró inhibir la formación de biofilm con significancia estadística únicamente en el aislado Kp666. El mayor porcentaje para ambos compuestos se dio a 2 µg/mL. Esto convierte al Ag-SCP y a Ag-SMX en buenas opciones para seguir siendo investigadas en el uso en infecciones bacterianas por *Klebsiella pneumoniae*.

Por razones que escapan al análisis actual, a determinadas concentraciones de los inhibidores y dependiendo del aislado, se sobre expresa el crecimiento bacteriano. (ver Tablas 10 y 11).

No es posible en estos casos establecer concentraciones inhibitorias mínimas ya que el rango de concentraciones ensayados fue acotado, en un futuro trabajo se podrían trabajar más concentraciones para determinarlo.

- **Resultados y conclusiones con respecto al objetivo 3**

- 1. Caracterización genómica**

La información que nos aporta RAST se puede dividir en 2 subgrupos: información que nos permite una caracterización genómica comparando los resultados obtenidos vs la referencia, e información que nos da indicio cuán bueno fue el ensamblado del material genético de la bacteria para hacer el estudio.

Los datos que aportan a la caracterización genómica son principalmente: tamaño y porcentaje de GC.

La información de RAST que indica calidad del ensamblado son 2 estadísticos : N50 y L50.

En la *tabla N° 11* se muestra la caracterización genómica de los aislados con los cuales se trabajaron. Todos ellos se comparan con la cepa de referencia local para *Klebsiella pneumoniae*, la Kp 1124.

**Tabla 11.** Caracterización genómica utilizando RAST.

	AISLADOS					
	<b>FQ 1180366</b>	<b>FQ 38879</b>	<b>M 1366</b>	<b>M 1604</b>	<b>KP09</b>	<b>KP 666</b>
<b>Tamaño</b>	5,676,739	5,718,594	5,756,644	5,555,764	5,701,233	5,421,329
<b>Contenido GC (%)</b>	57.0	57.4	57.2	57.3	57.0	57.4
<b>N50</b>	152874	206546	156636	199245	199278	225298
<b>L50</b>	11	11	12	10	10	10
<b>Clona</b>	III	IV	II	V	VI	I

Todos los aislados tienen las características genómicas presentadas por la referencia *ST258 reference genome NJST258\_1 (GenBank CP006923)*, por lo que se puede afirmar que corresponden a *Klebsiella pneumoniae*.

Se considera que un N50 mayor a 150.000 determina un buen ensamblado, por lo que todos los ensamblados son de buena calidad.

Para la totalidad de los aislados, el valor de L50 es muy bueno.

Por lo tanto, se puede concluir que la calidad de los ensamblados es buena.

## 2. Perfil genómico:

- **Detección de plásmidos.**

**Tabla 12** . Plásmidos presentes en cada aislado, detectados utilizando la herramienta PlasmidFinder

Plásmido	Aislados					
	Kp09	FQ38879	FQ1180366	KP666	M1366	M1604
IncFII(K)	SI	SI	SI	SI	SI	SI
IncFIB(K)	NO	SI	SI	SI	SI	SI
IncR	NO	SI	SI	SI	SI	NO
IncFIB(pQil)	SI	SI	NO	NO	SI	SI
Col440I	NO	SI	SI	NO	SI	NO
ColRNAI	NO	SI	NO	NO	SI	SI
IncFIA(HI1)	NO	NO	SI	NO	NO	NO
IncFII(pKP91)	NO	SI	NO	NO	NO	NO
IncI1-I(Alpha)	SI	NO	NO	NO	NO	NO
IncC	SI	NO	NO	NO	NO	NO

*Aclaraciones* : Color verde: plásmido presente, identidad entre un 95 y 100% de coincidencia en pares de bases . Color Rosa : plásmido no presente

En los aislados estudiados se encontraron plásmidos pertenecientes a 10 grupos de incompatibilidad (Inc) diferentes (ver *Tabla 12*). Todos los aislados presentaron plásmidos pertenecientes al menos a 3 grupos Inc. El grupo de incompatibilidad IncFII(K) fue hallado en todos los aislados. Se han descrito plásmidos de Kp que tienen más de un replicón y por lo tanto pertenecen a más de un grupo Inc. Debido a que la secuencia de los plásmidos no está cerrada no podemos sacar conclusiones respecto a si presentan o no múltiples replicones.

- **Detección de genes de resistencia**

Tabla 13 : Genes de resistencia adquiridos en los diferentes aislados, determinados utilizando la herramienta ResFinder.		
AISLADO	CLASE DE ANTIBIÓTICO	GEN DE RESISTENCIA
FQ1180366	AMINOGLUCÓSIDOS	<i>rmtF</i>
		<i>aph(3'')-Ib</i>
		<i>aph(6)-Ia</i>
	BETA-LACTÁMICOS	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>
		<i>bla<sub>SHV-182</sub></i>
		<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>
FLUOROQUINOLONAS	<i>acrR</i>	
FQ38879	AMINOGLUCÓSIDOS	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-Ib</i>

		<i>aadA2</i>
	BETA-LACTÁMICOS	<i>blaKPC-2</i>
	FLUOROQUINOLONAS	<i>aac(6')-Ib-cr, acrR</i>
Kp09	AMINOGLUCÓSIDOS	<i>aadA2</i>
		<i>aac(6')-Ib-cr</i>
		<i>aph(3'')-Ib</i>
		<i>aph(6)-Id</i>
	BETA-LACTÁMICOS	<i>blaCTX-M-14</i>
		<i>blaSHV-5</i>
		<i>blaOXA-1</i>
FLUOROQUINOLONAS	<i>aac(6')-Ib-cr ; acrR</i>	
M1604	AMINOGLUCÓSIDOS	<i>aadA2</i>
	BETA-LACTÁMICOS	<i>blaCTX-M-15</i>
		<i>ompK36</i>
		<i>blaSHV-182</i>
FLUOROQUINOLONAS	<i>acrR</i>	
M1366	AMINOGLUCÓSIDOS	<i>aadA2</i>
		<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	BETA-LACTÁMICOS	<i>ompK36 ; ompK37</i>
		<i>blaKPC-2</i>
		<i>blaTEM-55</i>
		<i>blaTEM-122</i>
		<i>blaSHV-75</i>
		<i>blaTEM-93</i>
		<i>blaTEM-168</i>
		<i>blaTEM-183</i>
		<i>blaTEM-79</i>
		<i>blaTEM-181</i>
		<i>blaTEM-163</i>
		<i>blaTEM-54</i>
		<i>blaTEM-135</i>
<i>blaTEM-1A</i>		
<i>blaCTX-M-15</i>		
FLUOROQUINOLONAS	<i>acrR</i>	
Kp666	AMINOGLUCÓSIDOS	<i>aac(3)-IV</i>
		<i>aac(6')-Ib</i>

BETA-LACTÁMICOS	<i>aadA2b</i>
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
	<i>aph(4)-Ia</i>
	<i>blaKPC-2</i>
	<i>blaOXA-9</i>
	<i>blaTEM-1A</i>
	<i>blaSHV-182</i>
FLUOROQUINOLONAS	<i>aac(6')-Ib-cr, acrR</i>

**Tabla 14** : Resultados obtenidos al analizar mutaciones puntuales en cromosomas que puedan generar resistencia a diferentes antibióticos, utilizando la herramienta ResFinder .

GENES / AISLADOS	Kp09	FQ38879	FQ1180366	KP666	M1366	M1604
<i>ompK36</i>	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen
<i>ompK37</i>	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen
<i>parC</i>	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen
<i>acr-r</i>	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen
<i>gyrA</i>	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen
<i>gyrB</i>	Mutación encontrada en gen	Gen encontrado sin mutaciones	Gen encontrado sin mutaciones	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen
<i>ompK35</i>	Mutación encontrada en gen	Gen encontrado sin mutaciones	Gen encontrado sin mutaciones	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen	Mutación encontrada en gen

#### Discusión sobre los genes de resistencia detectados en los aislamientos en estudio para los antibióticos betalactámicos del subtipo carbapenems: imipenem y menopenem

Según el fenotipo de resistencia dado para los carbapenémicos (imipenem y menopenem) observado en la *Tabla 1* , 5 de 6 aislados fueron resistentes.

En todos los aislados se encontraron mutaciones puntuales en los genes *ompK36* y *ompK37*; estas mutaciones no son de relevancia clínica por sí solas, pero sí adquieren mayor relevancia cuando van acompañadas de otros mecanismos de resistencia, como la adquisición de carbapenemasas (Ver *Tabla 16* ). De los 5 aislados que presentan resistencia a carbapenémicos, 4 presentaron genes codificantes de carbapenemasas pertenecientes a la familia KPC, NDM. Ningún aislado presentó carbapenemasas de la familia oxacilinasas las cuales son frecuentes

en la región. El aislado M1604, no demostró genes codificantes de carbapenemasa, aunque pudo haberse perdido la información genética por tratarse de una secuenciación por el método Illumina. Se propone evaluar la producción de carbapenemasas en el laboratorio por el método de sinergia de discos, específico para la detección de carbapenemasas del tipo KPC y metalbetalactamasas previa confirmación de su ausencia. De confirmarse su ausencia el fenotipo de resistencia a los carbapenems estaría explicada por las mutaciones en los genes codificantes de las porinas OMPK36 y OMPK37.

El presente estudio no permite vincular si los genes adquiridos están ubicados en los plásmidos encontrados.

El aislado KP09 si bien presenta únicamente mutaciones en los genes codificantes de las porinas OMPK36 y OMPK37, el antibiograma corresponde a un fenotipo sensible. Es sabido que las mutaciones en estas porinas generan leves aumentos en la C.I.M. a los carbapenems, siendo insuficientes para alcanzar un fenotipo resistente. En este caso, seguramente las mutaciones no fueron clínicamente significativas como para generar resistencia.

### **Discusión sobre los genes de resistencia detectados en los aislamientos en estudio para los antibióticos betalactámicos del subtipo cefalosporinas de tercera generación : Cefotaxime y Ceftazidime**

Todos los aislados estudiados presentan resistencia a las cefalosporinas estudiadas en el antibiograma (CTX Y CAZ) (ver *Tabla 1*). Cuatro aislados son positivos para la carbapenemasa KPC-2 la cual hidroliza también a las cefalosporinas, explicando de esta manera el fenotipo de resistencia a estas últimas. Los dos aislados restantes, M1604 y Kp09 no son productores de carbapenemasas pero presentaron genes de resistencia codificantes de BLEE, de la familia SHV y CTX-M, explicando el fenotipo de resistencia a CAZ y CTX. Cuatro de los 6 aislados presentaron mutaciones en el gen codificante para la porina OPK35, que está involucrada en una resistencia de baja significancia clínica.

Cinco de los seis aislados presentan adquisición de genes codificantes de BLEE de la familia blaCTX y blaSHV. Se detectó la presencia del gen blaTEM-1 pero no codifica para BLEE, por lo que no explica la resistencia a CAZ y CTX.

Llama la atención el aislado M1366 que presentó 12 BLEE (blaTEM-55 , blaTEM-122 , blaSHV-75 , blaTEM-93 , blaTEM-168 , blaTEM-183 , blaTEM-79 , blaTEM-181 , blaTEM-163 , blaTEM-54 , blaTEM-135 , blaCTX-M-15) lo cual refleja la plasticidad genómica de esta bacteria.

FQ38879 no muestra ni mutaciones puntuales ni presencia de genes adquiridos relacionados a la resistencia de cefalosporinas; dado que fue secuenciado por Illumina, podría haber pérdida de información por pérdida de material genético.

El único de los aislados que presentó un grupo de incompatibilidad vinculado a la resistencia a las cefalosporinas fue el KP09 , con el grupo Incl 1 - I (Aplha).

### **Discusión sobre los genes de resistencia detectados en los aislamientos en estudio para los antibióticos quinolonas del subtipo fluoroquinolonas: ciprofloxacina**

La Ciprofloxacina pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, todos los aislados estudiados presentan resistencia a la misma, lo cual podría quedar explicado al menos parcialmente por las mutaciones en los genes *acrR* , *gyrA* , *parC* , encontrados con mutaciones para todos los aislados y *gyrB* (encontrado mutado en 4 de los 6 aislados).

Todos los aislados presentaron mutaciones en varios de genes vinculados a la resistencia a fluoroquinolonas, observándose en todos los aislados, el gen *acrR* mutado, codificante para un represor local que regula la bomba de eflujo AcrAB. Se detectó en 3 de 6 aislados el gen adquirido *aac(6')-Ib-cr*, asociado a la resistencia a las fluoroquinolonas.

### Discusión sobre los genes de resistencia detectados en los aislamientos en estudio para los antibióticos aminoglucósidos: gentamicina y amikacina

En la *Tabla 1* se puede observar la resistencia a los aminoglucósidos estudiados, gentamicina y amikacina. Todos los aislados excepto Kp09 fueron resistentes a amikacina y quedaría explicado por la detección de los genes codificantes de las enzimas EMA *aac(6')-Ib-cr* o *aac(6')-Ib* o del gen *rmtF* en estos aislados. El gen *rmtF* fue encontrado como único gen en F11180366, y es responsable de la resistencia a todos los aminoglucósidos explicando la resistencia a gentamicina y amikacina en este aislado.

La Kp09 a pesar de presentar sensibilidad a ambos aminoglucósidos ensayados, presenta un gen de resistencia vinculado a la amikacina, el *aac(6')-Ib-cr*, el cual podría encontrarse sub expresado.

### Discusión sobre los genes de resistencia detectados en los aislamientos en estudio para la colistina

En cuanto a la resistencia a la colistina, presentada por todos los aislados en estudio, se descarta la resistencia plasmídica codificada por *mcr-1* pero es necesario analizar la presencia de mutaciones en otros genes de resistencia a la colistina que no están contempladas en la base de datos del ResFinder.

- **Detección de genes codificantes de la cápsula.**

En la *Tabla 15* se puede observar que en todos los aislados se encuentran genes codificantes para cápsula, uno de los mecanismos de virulencias más conocidos en *K. pneumoniae*. Esto puede explicar por qué la *K. pneumoniae* nosocomial se ha vuelto más virulenta con el paso del tiempo.

<i>Tabla 15. Elementos de cápsula estudiados mediante la herramienta BigsDB del Instituto Pasteur</i>				
	Elementos de cápsula			
	wzc (CD1-VR2-CD2 region of wzc)	wzc_CR2 (CR2 region of wzc)	wzi (Wzi outer membrane protein of cps cluster)	KL (wzi/wzc)
<b>FQ1180366</b>	Alelo 76 - NODE_20 - K-type: K81	NO PRESENTA	Alelo 230 - NODE_20 - K-type: K81	KL 81(wzi: 230/wzc:76)
<b>M1366</b>	NO PRESENTA	Alelo 27 - NODE_8	Alelo 154 NODE_8 y Alelo 64 NODE_126 - K-type: K14.K64	KL 14 / KL 64 (wzi: 154/wzi: 64/wzc:76)
<b>FQ38879</b>	Alelo 64 - NODE_71 - K-type: K64	Alelo 38 - NODE_71	Alelo 64 - NODE_71 - K-type: K14.K64 y Alelo 154 NODE_97	KL 64 / (wzi:64/wzi: 154/wzc:71)
<b>M1604</b>	Alelo 916 - NODE_12	Alelo 27 - NODE_12	Alelo 154 - NODE_12	KL 107 (wzi:154/wzc:916/wzc:27)
<b>KP 09</b>	Alelo 916 - NODE_1	Alelo 27 - NODE_1	Alelo 154 - NODE_1	KL 107 (wzi:154/wzc:916/wzc:27)
<b>KP 666</b>	Alelo 921 - NODE_30	Alelo 60 - NODE_30	Alelo 29 - NODE_30 - K-type: K41	KL 41 (wzi: 29/ wzc: 921 / wzc:60)

Los seis aislados corresponden a 5 tipos capsulares diferentes; KL 81, KL 14 , KL 64 , KL 107 Y KL 41. Únicamente 2 aislados presentan el mismo tipo capsular KL 107 a pesar de ser clonas distintas.

El resto de los aislamientos pertenecen a clonas diferentes y presentan cápsulas diferentes.

La presencia de la cápsula es otra estrategia de supervivencia de la bacteria.

## Conclusiones generales

**Tabla 16.** Características fenotípicas y genotípicas de los aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* ST 258.

	KP 666	M 1366	FQ 1180366	FQ 38879	M 1604	KP 09
Tipo de muestra	Orina <sup>d</sup>	Orina <sup>d</sup>	Orina <sup>d</sup>	<i>Sin datos</i>	Hisopado rectal <sup>e</sup>	Hisopado rectal <sup>e</sup>
Año de aislamiento	2011	2016	2017	2017	2017	2018
Método de secuenciación	Illumina	Illumina	Nanopore + Illumina	Nanopore + Illumina	Illumina	Illumina
Tamaño (pares de bases)	5,421,329	5,756,644	5,676,739	5,718,594	5,555,764	5,701,233
Contenido de GC (%)	57.4	57.2	57.0	57.4	57.3	57.0
N50	225298	156636	152874	206546	199245	199278
L50	10	12	11	11	10	10
CIM <sup>a</sup> (mg/L) por Vitek						
Piperacilin/Tazobactam	≥128 (R)	≥128 (R)	≥128 (R)	≥128 (R)	≥128 (R)	≥128 (R)
Cefotaxime	16 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	8 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)

Ceftazidime	16 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	16 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)
Gentamicin	SD	4 (R)	16 (R)	2 (I)	≤1 (S)	≤1 (S)
Amikacin	16 (R)	≥64 (R)	≥64 (R)	16 (R)	16 (R)	8 (S)
Ciprofloxacina	≥4 (R)	≥4 (R)	≥4 (R)	≥4 (R)	≥4 (R)	≥4 (R)
Imipenem	8 (R)	2 (I)	≥16 (R)	≥16 (R)	4 (R)	≤0.25 (S)
Meropenem	4 (R)	4 (R)	8 (R)	≥16 (R)	4 (R)	≤0.25 (S)
Colistina por método MDC <sup>b</sup>	256 (R)	32 (R)	≥128 (R)	64 (R)	16 (R)	16 (R)
Producción de biofilm	DÉBIL	FUERTE	FUERTE	FUERTE	MODERADA	FUERTE
Agentes inhibidores de biofilm	Cu-Xilytol ; Ag-SCP; Ag-SMX	Cu-Xilytol	Colistina	Colistina ; Cu-Xilytol	Colistina	-
CIMB (mg/L) de Colistina por MDC <sup>b</sup>	4 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL	2 µg/mL	1 µg/mL	4 µg/mL
Genes de resistencia <sup>c</sup>						
Carbapenems (imipenem y meropenem)	<i>blaKPC-2</i> <i>blaOXA-9</i>	<i>blaKPC-2</i>	<i>blaNDM-1</i>	<i>blaKPC-2</i>	-	<i>blaOXA-1</i>

Cefalosporinas (cefotaxime y ceftazidime)	<i>blaTEM-1A</i> <i>blaSHV-182</i>	<i>blaTEM-181</i> <i>blaCTX-M-15</i> <i>blaSHV-75</i> <i>ompK36</i> <i>ompK37</i>	<i>blaSHV-182</i> <i>blaTEM-1B</i>	-	<i>blaSHV-182</i> <i>blaCTX-M-15</i>	<i>blaSHV-5</i> <i>blaCTX-M-15</i>
Fluoroquinolonas (ciprofloxacina)	<i>aac(6')-Ib-cr</i> <i>acrR</i>	<i>acrR</i>	<i>acrR</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>  <i>acr</i>  <i>rR</i>	<i>acrR</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Aminoglicósidos: gentamicina	<i>aac(3)-IV</i>	-	<i>rmtF</i>	-	-	-
Aminoglicósidos: amikacina	<i>aac(6')-Ib</i>	-	<i>rmtF</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-Ib</i>	-	<i>aac(6')-Ib-cr</i>
Mutaciones puntuales						
Carbapenems (imipenem y meropenem)	<i>ompK36</i> <i>ompK37</i>	<i>ompK36</i> <i>ompK37</i>	<i>ompK36</i> <i>ompK37</i>	<i>ompK36</i> <i>ompK37</i>	<i>ompK36</i> <i>ompK37</i>	<i>ompK36</i> <i>ompK37</i>
Cefalosporinas (cefotaxime y ceftazidime)	<i>ompK35</i>	<i>ompK35</i>	-	-	<i>ompK35</i>	<i>ompK35</i>
Fluoroquinolonas (ciprofloxacina)	<i>acr-r</i> ; <i>gyrB</i> ; <i>gyrA</i> ; <i>parC</i>	<i>acr-r</i> ; <i>gyrB</i> ; <i>gyrA</i> ; <i>parC</i>	<i>acr-r</i> ; <i>gyrA</i> ; <i>parC</i>	<i>acr-r</i> ; <i>gyrA</i> ; <i>parC</i>	<i>acr-r</i> ; <i>gyrB</i> ; <i>gyrA</i> ; <i>parC</i>	<i>acr-r</i> ; <i>gyrB</i> ; <i>gyrA</i> ; <i>parC</i>
Plásmidos						
Grupos de incompatibilidad						

	IncFII(K)	IncFII(K)	IncFII(K)	IncFII(K)	IncFII(K)	IncFII(K)
	IncFIB(K)	IncFIB(K)	IncFIB(K)	IncFIB(K)	IncFIB(K)	-
	IncR	IncR	IncR	IncR	-	-
	-	IncFIB(pQil)	-	IncFIB(pQil)	IncFIB(pQil)	IncFIB(pQil)
	-	Col440I	Col440I	Col440I	-	-
	-	ColRNAI	-	ColRNAI	ColRNAI	-
	-	-	IncFIA(HI1)	-	-	-
	-	-	-	IncFII(pKP91)	-	-
	-	-	-	-	-	IncI1-I(Alpha)
	-	-	-	-	-	IncC
Elementos de cápsula	KL 41 (wzi: 29/ wzc: 921 / wzc:60)	KL 14 / KL 64 (wzi: 154/wzi: 64/wzc:76)	KL 81(wzi: 230/wzc:76)	KL 64 / (wzi:64/wzi : 154/wzc:71)	KL 107 (wzi:154/wzc:9 16/wzc:27)	KL 107 (wzi:154/wzc:9 16/wzc:27)

*Aclaraciones:* <sup>a</sup>CIM: concentración inhibitoria mínima; <sup>b</sup>MDC: método de referencia de microdilución en caldo; S: susceptible; R: resistente; I: intermedio; <sup>c</sup> Genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica: cefalosporinas, carbapenémicos, aminoglucósidos y fluoroquinolonas; <sup>d</sup>las muestras de orina corresponden a infecciones; <sup>e</sup>las muestras de hisopado rectal son de colonización (para control) pero no son de infección.

Con el análisis en conjunto de todos los resultados obtenidos se pueden relacionar la capacidad de formación de biofilm, los genes de resistencia a antibióticos de importancia clínica, las mutaciones puntuales en genes que derivan en una resistencia a antibióticos, diferentes grupos de incompatibilidad, y otros mecanismos de resistencia como la presencia de cápsula. Además, este estudio permitió conocer posibles agentes inhibidores de biofilm, y se determinó la CIMB para la colistina.

Para todos los aislados en estudio se pudo establecer que las técnicas de secuenciación utilizadas (illumina, nanopore o combinación de ambas) fueron buenas, y se pudo confirmar que se trataba de la especie *Klebsiella pneumoniae*.

Todos los aislamientos fueron productores de biofilm en las condiciones ensayadas. Hubo resistencia a la formación de biofilm con significancia estadística en al menos uno de los compuestos [se analizaron 2 complejos metálicos con azúcares alcohólicos (Zn-xilytol y Cu-xilytol), 2 complejos de Ag con variantes de sulfonamidas (Ag-SCP y Ag-SMX) y el polipéptido colistina]. El polipéptido colistina fue capaz de inhibir la formación de biofilm a concentraciones sub inhibitorias. Por lo que los complejos polioles y la colistina tendrían el potencial para ser utilizados in vivo como agentes antibiofilm en combinación con el uso de antibióticos. Este estudio deja antecedentes para continuar la investigación en el uso de estos agentes.

Se detectaron genes involucrados en la resistencia a diferentes antibióticos y elementos de cápsula, estos hallazgos podrían explicar el fenotipo de resistencia a múltiples drogas presentado por los aislamientos en estudio. Se observaron tanto, mutaciones en genes codificantes del sitio blanco de acción del antibiótico y de proteínas de transporte de membrana externa como, la adquisición de genes exógenos codificantes de beta-lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas y enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Se detectaron plásmidos pertenecientes a una gran variedad de grupos de incompatibilidad, identificados con frecuencia en Enterobacterias, y co-residentes en algunos aislamientos.

Se observaron diferentes tipos de locus capsulares. Todos los aislados presentan genes vinculados a elementos de cápsula (*Tabla 15*), uno de los mecanismos de virulencias más conocidos en *K. pneumoniae*, lo que puede explicar el fenotipo resistente. Se debería estudiar la expresión de esta mediante tinción para establecer concordancia entre genotipo y fenotipo.

Los resultados obtenidos son bastos y dan pie a continuar su análisis para obtener nuevos resultados y conocer más sobre éste patógeno, lo que aporta al conocimiento de la epidemiología local de Uruguay, en esta bacteria de relevancia nosocomial.

KP666 proveniente de una muestra de orina de un paciente con una infección por Kp, resistente a todos los antibióticos ensayados (no se testeó para la Gentamicina), presentó débil formación de biofilm. Fue el único aislado, que se logró inhibir la formación de biofilm con significancia estadística para Ag -SCP y Ag -SMX como agentes inhibidores, además el Cu-xilytol también inhibió el crecimiento bacteriano, por lo que se podría continuar con el estudio de los mismos en próximos trabajos para un abordaje más profundo. Junto al aislado KP 09, son los únicos aislados que presentan una CIMB para colistina de 4 µg/mL, la más alta determinada en este estudio. Presenta 2 genes de resistencia a carbapenems, a diferencia de los otros aislados que presentan 1 o ninguno, y es el único aislados que presenta genes de resistencia para todos los grupos de antibióticos en estudio. Presenta mutaciones puntuales en genes que otorgan resistencia a todos los antibióticos estudiados. Presenta 3 de los 10 plásmidos buscados.

M1366 proveniente de una muestra de orina de un paciente con una infección por Kp, resistente a todos los antibióticos ensayados, presentó fuerte formación de biofilm, además de ser el aislado con mayor cantidad de BLEE, presentado además 6 de los 10 plásmidos analizados. El ensayo de posibles inhibidores de biofillm mostró el Cu-xilytol lo inhibía, por lo que se podría continuar con el estudio del mismo. Presenta una CIMB para colistina de 1 µg/mL, la menor determinada en este estudio.

El aislado FQ 1180366, proveniente de una muestra de orina, con resistencia a todos los antibióticos ensayados y fuerte producción de biofilm, presentó significancia estadística únicamente en la inhibición de biofilm usando colistina como agente inhibidor, presentado una CIMB de colistina de 2 µg/mL. Para todos los grupos de antibióticos ensayados presentó genes de resistencia, lo que puede explicar el fenotipo resistente. Presenta mutaciones puntuales en genes que se vinculan a la resistencia de carbapenems y fluoroquinolonas, no así para las cefalosporinas. Presenta 5 de 10 grupos de incompatibilidad vinculados a plásmidos.

El aislado FQ 38879, del cual se desconoce la información del tipo de muestra del cual proviene, es resistente a todos los antibióticos estudiados, dando para la gentamicina un resultado intermedio por el método de antibiograma de VITEK. Es un fuerte productor de biofilm. De los compuesto ensayados, 2 lograron inhibir con significancia estadística la formación de biofilm ( la colistina y el Cu-Xilytol), presentado una CIMB de colistina de 2 µg/mL. Presenta genes de resistencia a carbapenems, fluoroquinolonas y aminoglucósidos, lo que podría explicar la resistencia a los mismos, además presenta mutaciones puntuales en genes que determinar resistencia a carbapenems y a fluoroquinolonas, lo que enfatiza la explicación a la resistencia a los mismos. Presenta 7 de los 10 plásmidos hallados, siendo uno de los aislados con mayor presencia de grupos de incompatibilidad.

El aislado M 1604, proveniente de un hisopado rectal, resistente a todos los antibióticos ensayados menos la gentamicina, presentó una moderada formación de biofilm, el cual es inhibido por la colistina, el único agente inhibidor de biofilm que logró inhibir el crecimiento del aislado con significancia estadística. Presenta genes de resistencia las cefalosporinas y a las fluoroquinolonas, y mutaciones puntuales en genes vinculados a la resistencia en los 3 tipos grupos de antibióticos estudiados. Presenta una CIMB de colistina de 1 µg/mL. No presenta genes de resistencia vinculados a la gentamicina, lo que va en concordancia con el fenotipo observado. Presenta solo 4 de 10 grupos de incompatibilidad, y al igual que todos los otros aislados, presenta elementos de cápsula.

KP09 proveniente de un hisopado rectal, de un paciente con una infección por Kp, con RDM pero no resistente a todos los antibióticos ensayados, presentó fuerte formación de biofilm, pero sin embargo no se pudo establecer con significancia estadística que alguno de los compuestos ensayados inhiba su crecimiento. Presenta mutaciones puntuales en todos los genes estudiados vinculados a la resistencia a 3 grupos de ATB (carbapenems, cefalosporinas y fluoroquinolonas). De todos los genes de resistencia estudiados no presentó genes de resistencia a la gentamicina, lo que va en concordancia con su fenotipo sensible a la misma. Sin embargo si es sensible a la Amikacina pero presenta el gen de resistencia a este, el *aac(6)-Ib-cr*, y sensibilidad al Imipenem y Meropenem, presentando el gen de resistencia *blaOXA-1* y mutaciones puntuales a 2 genes vinculados a la resistencia a los mismos, *ompK36* y *ompK37*. Esto deja en evidencia que el fenotipo, sensible en este caso, no siempre va en concordancia con el genotipo, lo que puede explicarse por una subexpresión de los genes de resistencia involucrados, o por otro mecanismo que contrarreste su efecto, estudios que escapen al presente trabajo pero que pueden ser estudiados en un futuro.

El resultado para todos los aislados se resume en la Tabla 16.

## Bibliografía

- (1) Bagley ST. Habitat Association of *Klebsiella* Species. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 1985; 6 (2) : 52 - 58.
- (2) Lopardo Horacio A. Bacterias de Importancia Clínica. *Manual de microbiología clínica de la Asociación Argentina de Microbiología*. 1: 100 - 129.
- (3) Podschun R. et al. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11: 589 - 603
- (4) Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14 : 933-951
- (5) Grover SS. et al. Phenotypic and genotypic detection of ESBL mediated cephalosporin resistance in *Klebsiella pneumoniae*: Emergence of high resistance against cefepime, the fourth generation cephalosporin. *Journal of Infection*. 53: 279-288
- (6) Barreto S. et al. Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilms formation. *Invest. clín*. 2009; 50: 221-229.
- (7) Márquez C. et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization. *New Microbes New Infect*. 2014; 2:58-63.
- (8) Márquez C. et al. Genomic analysis of the first isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* from Uruguay. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2018; 15:109-110.
- (9) Vera-Leiva A. et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. 2017; 34.
- (10) - Treviño Natalia et al. Material de Cátedra. Microbiología y Parasitología. Lic. En Obstetricia. FCM. UNLP. 2022.
- (11) MARTIN N, G. Resistencia Bacteriana a  $\beta$ -lactámicos: Evolución y Mecanismos. *AVFT*. 2002; 21: 107-116.
- (12) Rocker A. et al. Global Trends in Proteome Remodeling of the Outer Membrane Modulate Antimicrobial Permeability in *Klebsiella pneumoniae*. 2020; 14;11(2).
- (13) Guzman L, Militza et al. Genes blaTEM, blaSHV y blaCTX-M en enterobacterias productoras de b-lactamasas de espectro extendido aisladas de pacientes con infección intrahospitalaria. 2013; 54: 235-245.
- (14) Luis Martínez-Martínez et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the clinical practice. 2014; 32:4-9.
- (15) Mery De la Fuente C. et al. Mutaciones en genes gyrA y gyrB en cepas de bacilos Gram negativos aisladas en hospitales chilenos y su relación con la resistencia a fluoroquinolonas; *Rev. méd. Chile*. 2007 ; 135 (9)
- (16) Kareem SM et al. Detection of gyrA and parC Mutations and Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae*. 2021; 12; 14 : 555-563.
- (17) Schneiders T, Amyes SG, Levy SB. Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(9):2831-7.
- (18) MELLA M., Sergio et al. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. 2004; 21: 330-338.
- (19) Bi D, Zheng J, Li JJ, Sheng ZK, Zhu X, Ou HY, Li Q, Wei Q. In Silico Typing and Comparative Genomic Analysis of IncFIIK Plasmids and Insights into the Evolution of Replicons, Plasmid Backbones, and Resistance Determinant Profiles. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10):e00764-18.

(20) Márquez C. et al. In Vivo High Plasticity of Multi-Drug Resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2021; 27:1126-1130.

(21) Stohr JJM, Kluytmans-van den Bergh MFQ, Weterings VATC, Rossen JWA, Kluytmans JAJW. Distinguishing blaKPC Gene-Containing IncF Plasmids from Epidemiologically Related and Unrelated Enterobacteriaceae Based on Short- and Long-Read Sequence Data. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021 ; 18;65(6).

(22) Stepanovi S. et al. A modified microtiterplates test for quantification of staphylococcal biofilm formation. 2000; 40:175-179.

## **ANEXO A : PROTOCOLOS UTILIZADOS**

- **Protocolo para abordar el objetivo 1 : Evaluación de biofilms estáticos**

Se siguió lo establecido por Villegas y col., 2013, adaptado por de R. de los Santos y colaboradores. Mediante un experimento semicuantitativo de cuantificación de la biomasa de biofilms con el uso de cristal violeta.

### **Experimento 1: Cuantificación de la biomasa de biofilms.**

1. Recuperar el microorganismo a ensayar en medio sólido, incubar 24 hs a la temperatura de crecimiento (37°C)
2. En una placa de 96 pocillos, colocar 150 µl de medio líquido. A partir del cultivo fresco en medio sólido, tomar de una colonia y resuspender en cada pocillo. Incubar 24hs a 37°C.
3. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas del pre-inóculo para evaluar que todas hayan crecido de igual forma y hayan llegado a fase estacionaria.
4. En otra placa de 96 pocillos, colocar 180 µl de medio líquido, tomar de los preinóculos 20 µl y colocarlos en cada pocillo (realizar triplicados de cada microorganismo a ensayar). Dejar al menos 3 pocillos solo con medio líquido para control negativo. Incubar 24 a 48 hs a 37°C sin agitación.
5. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas.
6. Remover suavemente las bacterias planctónicas.
7. Realizar 3 lavados con PBS
8. Teñir las bacterias adheridas y el biofilm con una solución de cristal violeta al 0,1 %, poner 200 µl de CV en cada pocillo, incubar 15 minutos.
9. Remover el exceso de colorante mediante lavados con PBS (hasta que no salga más color).
10. Solubilizar el CV agregando etanol 95%. Agitar suavemente. Medir la absorbancia a 590 nm.
11. Si es necesario realizar una dilución 1/10 en etanol y volver a medir.
12. Análisis de datos:

En el análisis de datos de la formación de biofilm, se clasifican en distintas categorías teniendo en cuenta su capacidad de producción de biofilm según Stepanovi et. al., 2000, la cual se evalúa según el valor de DO obtenido. Se consideran como:

*no productores* cuando la  $DO \leq DOc$  , siendo la  $DOc = DO$  control negativo + 3 desviaciones standard ;

*débil productor de biofilm* cuando  $DOc < DO \leq 2xDOc$  ;

*moderado productor de biofilm* cuando  $2xDOc < DO \leq 4xDOc$  ;

y finalmente *fuerte productor de biofilm* cuando  $DO > 4xDOc$  .

- **Protocolo para abordar el objetivo 2.**

Para el experimento de inhibición de biofilm se siguió el procedimiento basado en Blango y Mulvey, 2010 y adaptado por de R. de los Santos y colaboradores para determinar el efecto de distintos antimicrobianos/moléculas/extractos/etc. o moléculas sobre el biofilm, utilizando Colistin y complejos metálicos de sulfas de Ag, y de polioles de Zn y Cu, (*Ver Tabla 2*) determinando la concentración inhibitoria mínima del biofilm (C.I.M.B) de cada uno por técnica en placa de microtitulación.

### **Experimento 2: Inhibición de la formación de biofilms por efecto de antimicrobianos/moléculas/extractos/etc.**

Procedimiento para determinar el efecto de distintos antimicrobianos o moléculas sobre el biofilm de 48 hs. Basado en Blango y Mulvey, 2010.

1. Recuperar el microorganismo a ensayar en medio sólido, incubar 24 hs a la temperatura de crecimiento (37°C por ej.)
2. En una placa de 96 pocillos, colocar 150 µl de medio líquido. A partir del cultivo fresco en medio sólido, tomar de a una colonia y resuspender en cada pocillo. Incubar 24hs a 37°C.
3. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas del pre-inóculo para evaluar que todas hayan crecido de igual forma y hayan llegado a fase estacionaria.
4. En otra placa de 96 pocillos, adicionar los 180 µl de medio líquido con las moléculas/antimicrobianos/etc que uno quiera ensayar en la concentración a estudiar. Tomar de los pre-inóculos 20 µl y colocarlos en cada pocillo (realizar triplicados). En este caso los blancos sin bacterias tienen que realizarse con las moléculas a evaluar. Se debe además colocar medio sin moléculas para usar como control positivo, ya que en estos pocillos si se va a formar el biofilm.
5. Incubar 24 a 48 hs a 37°C sin agitación.
6. Medir la DO 600nm de las bacterias planctónicas.
7. Remover suavemente las bacterias planctónicas.
8. Realizar 3 lavados con PBS
9. Teñir las bacterias adheridas y el biofilm con una solución de cristal violeta al 0,1 %, poner 200 µl de CV en cada pocillo, incubar 15 minutos.
10. Remover el exceso de colorante mediante lavados con PBS (hasta que no salga más color).
11. Solubilizar el CV agregando etanol 95%. Agitar suavemente. Medir la absorbancia a 590 nm.
12. Si es necesario realizar una dilución 1/10 en etanol y volver a medir.
12. Análisis de datos:

Para evaluar la inhibición de biofilms se considerará un CV (coeficiente de variación) no mayor al 30%. Los posibles resultados serán inhibición, sobreexpresión o sin cambios, y eso se concluye comparando el crecimiento post incubación con el agente inhibidor vs el crecimiento del control positivo .

## ANEXO B : PLANIFICACIÓN DE ENSAYOS Y TRATAMIENTO DE DATOS

### Resultados obtenidos respecto al objetivo 1

#### 1. Planificación y datos de DO, en la formación de biofilm.

**Tabla 1.** Planificación del ensayo de formación de biofilm.

	1	2	3	4	5	6	12
A	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666	CN
B	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666	CN
C	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666	CN
D	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666	CN
E	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666	CN
F	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666	CN
G	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666	CN

Representación de una placa de 96 pocillos.

Aclaraciones: CN = control negativo. Se utiliza una placa de 96 pocillos. El control positivo consistió en una cepa de E. Coli formadora de biofilm, la cual se incubó en un tubo de ensayo y se colocó en estufa junto a las placas de 96 pocillos. Se observó crecimiento de biofilm en el tubo.

**Tabla 2.** Se muestran los valores de DO a 590 nm , obtenidos de las 7 réplicas del ensayo de producción de biofilm, para cada uno de los aislados en estudio.

	FQ 1180366	FQ 38879	M 1366	M 1604	KP 09	KP 666
A	1,476	1,345	0,860	0,351	1,650	0,187
B	1,514	1,138	0,720	0,308	1,589	0,268
C	1,308	1,000	0,477	0,230	1,434	0,128
D	1,291	0,962	0,489	0,262	1,484	0,144
E	1,359	1,072	0,614	0,406	1,588	0,181
F	1,303	1,260	0,471	0,272	1,092	0,195
G	1,238	1,564	0,436	0,233	0,937	0,163
PROMEDI O	1,355	1,191	0,497	0,276	1,396	0,166
DS	0,102	0,214	0,068	0,047	0,274	0,026
CV	8	18	14	17	20	16

Aclaraciones: A los mismos se les restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN y es por tal motivo que el CN no aparece en la tabla. Los datos sombreados de color amarillo fueron descartados para que el coeficiente de variación (CV) para cada aislado sea menor o igual al 30%.

## **Resultados obtenidos respecto al objetivo 2**

### **2. Planificación y datos de DO, en la inhibición de formación de biofilm.**

#### **2.1 Ensayos de Inhibición de biofilm usando colistin como agente inhibidor:**

**Tabla 4 .** Planificación del ensayo de inhibición de biofilm para concentraciones desde 2 ug/mL hasta 16 ug /mL de colistin para cada aislado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CN						CP1: 1180366						
B	CP2: FQ38879						CP3: M1366						
C	16ug/mL			8ug/mL			4ug/mL			2ug/mL			FQ1180366
D	16ug/mL			8ug/mL			4ug/mL			2ug/mL			FQ38879
E	16ug/mL			8ug/mL			4ug/mL			2ug/mL			M1366
F	16ug/mL			8ug/mL			4ug/mL			2ug/mL			M1604
G	16ug/mL			8ug/mL			4ug/mL			2ug/mL			24Kp09
H	16ug/mL			8ug/mL			4ug/mL			2ug/mL			Kp666

Representación de una placa de 96 pocillos.

Aclaraciones: Cada ensayo se hace por triplicado a no ser para los controles que se hizo por sextuplicado. Se utiliza una placa de 96 pocillos. Aclaraciones: CN = control negativo; CP = control positivo.

**Tabla 5.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para todas las réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm para concentraciones desde 2 ug/mL hasta 16 ug /mL de colistin para cada aislado, para el CN y para los CP.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,072	0,202	0,071	0,131	0,063	0,063	0,493	0,836	1,493	0,742	1,09	0,98	
B	0,841	0,706	0,974	0,940	0,563	0,803	0,409	0,549	0,680	0,341	0,433	0,324	
C	0,057	0,076	0,063	0,054	0,055	0,064	0,055	0,065	0,076	0,100	0,109	0,198	FQ1180366
D	0,057	0,069	0,056	0,053	0,050	0,051	0,062	0,055	0,143	0,142	0,116	0,132	FQ38879
E	0,052	0,059	0,054	0,052	0,050	0,053	0,062	0,056	0,063	0,063	0,060	0,060	M1366
F	0,050	0,073	0,052	0,047	0,061	0,051	0,152	0,055	0,071	0,060	0,060	0,084	M1604
G	0,054	0,065	0,057	0,052	0,062	0,052	0,097	0,087	0,079	0,118	0,118	0,108	24Kp09
H	0,127	0,064	0,060	0,062	0,087	0,193	0,379	0,318	0,429	0,364	0,303	0,289	Kp666

**Tabla 6.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para las 6 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para cada uno de los controles, para el ensayo que utilizó concentraciones desde 2 ug/mL hasta 16 ug /mL de colistin para cada aislado.

	Absorbancia a 590 nm (restando al promedio del CN para los CP)					PROMEDIO	DS	CV (%)	
CN	0,072		0,071		0,063	0,063	0,067	0,005	7
CP1: 1180366		0,830		0,675	1,023	0,913	0,860	0,147	17
CP2: FQ38879	0,774	0,639	0,907	0,873	0,496	0,736	0,737	0,153	21
CP3: M1366	0,342	0,482		0,274	0,366	0,257	0,344	0,089	26

Aclaraciones: A los CP se les restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN. Las celdas sombreadas de color amarillo indican datos que fueron descartados para obtener un CV no mayor a 30%. Se halla promedio, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV).

**Tabla 7a.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para las 3 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para concentraciones desde 2 ug/mL hasta 16 ug /mL de colistin para cada uno de los aislados en estudio.

AISLADO	CONC.DE COL.	RESTANDO EL PROMEDIO DEL CN			PROMEDIO	DS	CV (%)
		ABSORBANCIA A 590 nm					
FQ1180366	16ug/mL	-0,010	0,009	-0,004	-0,002	0,010	-507
FQ38879	16ug/mL	-0,010	0,002	-0,011	-0,007	0,007	-110
M1366	16ug/mL	-0,015	-0,008	-0,013	-0,012	0,004	-29
M1604	16ug/mL	-0,017	0,006	-0,015	-0,009	0,013	-143
24Kp09	16ug/mL	-0,013	-0,002	-0,010	-0,009	0,006	-66
Kp666	16ug/mL		-0,003	-0,007	-0,005	0,003	-54
FQ1180366	8ug/mL	-0,013	-0,012	-0,003	-0,010	0,006	-57
FQ38879	8ug/mL	-0,014	-0,017	-0,016	-0,016	0,002	-10
M1366	8ug/mL	-0,015	-0,017	-0,014	-0,016	0,002	-10
M1604	8ug/mL	-0,020	-0,006	-0,016	-0,014	0,007	-51
24Kp09	8ug/mL	-0,015	-0,005	-0,015	-0,012	0,006	-48
Kp666	8ug/mL	-0,005	0,020		0,007	0,018	244
FQ1180366	4ug/mL	-0,012	-0,002	0,009	-0,002	0,011	-548
FQ38879	4ug/mL	-0,005	-0,012		-0,009	0,005	-57
M1366	4ug/mL	-0,005	-0,011	-0,004	-0,007	0,004	-55
M1604	4ug/mL		-0,012	0,004	-0,004	0,011	-266
24Kp09	4ug/mL	0,030	0,020		0,025	0,007	29
Kp666	4ug/mL	0,312	0,251	0,362	0,308	0,056	18
FQ1180366	2ug/mL	0,033	0,042		0,037	0,006	17
FQ38879	2ug/mL	0,075	0,049	0,065	0,063	0,013	21
M1366	2ug/mL	-0,004	-0,007	-0,007	-0,006	0,002	-28
M1604	2ug/mL	-0,007	-0,007		-0,007	0,000	0
24Kp09	2ug/mL	0,051	0,051	0,041	0,047	0,006	12
Kp666	2ug/mL	0,297	0,236	0,222	0,251	0,040	16

Aclaraciones: A los valores de absorbancia obtenidos se les restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN. Las celdas sombreadas de color amarillo indican datos que fueron descartados. Los resultados favorables para el estudio son aquellos en los cuales el CV dio positivo y no mayor a 30%.

**Tabla 8 .** Planificación del ensayo de inhibición de biofilm para concentraciones desde 0.125 ug/mL hasta 1 ug /mL de colistin para cada aislado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CN						CP4: M1604						
B	CP5: 24Kp09						CP6: Kp666						
C	1ug/mL			0.5ug/mL			0.25ug/mL			0.125ug/mL			FQ1180366
D	1ug/mL			0.5ug/mL			0.25ug/mL			0.125ug/mL			FQ38879
E	1ug/mL			0.5ug/mL			0.25ug/mL			0.125ug/mL			M1366
F	1ug/mL			0.5ug/mL			0.25ug/mL			0.125ug/mL			M1604
G	1ug/mL			0.5ug/mL			0.25ug/mL			0.125ug/mL			24Kp09
H	1ug/mL			0.5ug/mL			0.25ug/mL			0.125ug/mL			Kp666

Representación de una placa de 96 pocillos.

Aclaraciones: Cada ensayo se hace por triplicado a no ser para los controles que se hizo por sextuplicado. Se utiliza una placa de 96 pocillos. Aclaraciones: CN = control negativo; CP = control positivo.

**Tabla 9.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para todas las réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm para concentraciones 0.125 ug/mL hasta 1 ug /mL de colistin para cada aislado, para el CN y para los CP.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,111	0,065	0,063	0,059	0,091	0,065	0,188	0,212	0,284	0,222	0,283	0,237	CN / CP4
B	0,907	0,655	0,839	0,995	0,826	0,826	0,148	0,124	0,136	0,137	0,127	0,164	CP5 / CP6
C	0,462	0,320	0,305	0,682	0,466	0,242	0,608	0,772	0,829	0,619	0,611	0,956	FQ1180366
D	0,554	0,379	0,292	0,647	0,387	0,437	0,616	0,179	0,54	0,394	0,671	0,713	FQ38879
E	0,127	0,155	0,151	0,373	0,417	0,365	0,596	0,469	0,549	0,357	0,472	0,524	M1366
F	0,11	0,116	0,134	0,157	0,208	0,159	0,186	0,178	0,2	0,252	0,228	0,256	M1604
G	0,484	0,535	0,613	0,856	0,743	0,689	0,79	0,57	0,645	0,468	0,833	0,713	24Kp09
H	0,571	0,389	0,609	0,26	0,246	0,306	0,334	0,277	0,206	0,135	0,227	0,251	Kp666

**Tabla 10.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para las 6 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para cada uno de los controles, para el ensayo que utilizó concentraciones desde 0.125 ug/mL hasta 1 ug /mL de colistin para cada aislado.

	Absorbancia a 590 nm (restando el promedio del CN a los CP)						PROMEDIO	DS	CV (%)
CN	0,111	0,065	0,063	0,059	0,091	0,065	0,076	0,021	27
CP4: M1604	0,112	0,136	0,208	0,146	0,207	0,161	0,162	0,039	24

CP5: 24Kp09	0,831	0,579	0,763	0,919	0,750	0,750	0,766	0,112	15
CP6: Kp666	0,072	0,048	0,060	0,061	0,051	0,088	0,064	0,015	23

Aclaraciones: A los CP se les restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN. Se halla promedio, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV). No se descartaron medidas ya que el CV dio menor al 30% para todos los casos.

**Tabla 11.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para las 3 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para concentraciones desde 0.125 ug/mL hasta 1 ug /mL de colistin para cada uno de los aislados en estudio.

Aislado	Conc. De colistin	Absorbancia a 590 nm restando el promedio del CN			PROMEDIO	DS	CV (%)
FQ1180366	1ug/mL		0,244	0,229	0,237	0,011	4
FQ38879	1ug/mL		0,303	0,216	0,260	0,062	24
M1366	1ug/mL	0,051	0,079	0,075	0,069	0,015	22
M1604	1ug/mL	0,034	0,040	0,058	0,044	0,012	28
24Kp09	1ug/mL	0,408	0,459	0,537	0,468	0,065	14
Kp666	1ug/mL	0,495	0,313	0,533	0,447	0,118	26
FQ1180366	0,5ug/mL	0,606	0,390		0,498	0,153	31
FQ38879	0,5ug/mL		0,311	0,361	0,336	0,035	11
M1366	0,5ug/mL	0,297	0,341	0,289	0,309	0,028	9
M1604	0,5ug/mL	0,081	0,132	0,083	0,099	0,029	29
24Kp09	0,5ug/mL	0,780	0,667	0,613	0,687	0,085	12
Kp666	0,5ug/mL	0,184	0,170	0,230	0,195	0,031	16
FQ1180366	0,25ug/mL	0,532	0,696	0,753	0,661	0,115	17
FQ38879	0,25ug/mL	0,540		0,464	0,502	0,054	11
M1366	0,25ug/mL	0,520	0,393	0,473	0,462	0,064	14
M1604	0,25ug/mL	0,110	0,102	0,124	0,112	0,011	10
24Kp09	0,25ug/mL	0,714	0,494	0,569	0,593	0,112	19
Kp666	0,25ug/mL	0,258	0,201		0,230	0,040	18
FQ1180366	0,125ug/mL	0,543	0,535		0,539	0,006	1
FQ38879	0,125ug/mL		0,595	0,637	0,616	0,030	5
M1366	0,125ug/mL	0,281	0,396	0,448	0,375	0,085	23
M1604	0,125ug/mL	0,176	0,152	0,180	0,170	0,015	9
24Kp09	0,125ug/mL		0,757	0,637	0,697	0,085	12
Kp666	0,125ug/mL		0,151	0,175	0,163	0,017	10

Aclaraciones: Se restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN a cada valor obtenido. Las celdas sombreadas de color amarillo indican datos que fueron descartados. Los resultados favorables para el estudio son aquellos en los cuales el CV dio positivo y no mayor a 30%.

## 2.2 Ensayos de Inhibición de biofilm usando Zn-xilytol y Cu-xilytol como agentes inhibidores :

**Tabla 14 .** Planificación del ensayo de inhibición de biofilm para concentraciones de 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Zn-xilytol y Cu-xilytol para cada aislado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CN						CP4: M1604 DMSO 1			CP4: M1604 DMSO 2			
B	CP5: 24Kp09 DMSO 1			CP5: 24Kp09 DMSO 2			CP6: Kp666 DMSO 1			CP6: Kp666 DMSO 2			
C	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			FQ1180366
D	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			FQ38879
E	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			M1366
F	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			M1604
G	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			24Kp09
H	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			Kp666
	Zn-xilytol						Cu-xilytol						

Representación de una placa de 96 pocillos.

Aclaraciones: Cada ensayo se hace por triplicado a no ser para el CN que se hizo por sextuplicado. Se utiliza una placa de 96 pocillos. Aclaraciones: CN = control negativo; CP = control positivo.

**Tabla 15.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para todas las réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm para concentraciones 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Zn-xilytol y Cu-xilytol para cada aislado, para el CN y para los CP.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,10 6	0,10 5	0,06 3	0,05 8	0,07 1	0,06 8	0,58 4	0,55 1	0,72	0,54 8	0,67 1	0,72 9	CN/ CP4(1) / CP4 (2)
B	0,38	0,44 5	0,59 9	0,43 2	0,48 7	0,53 6	0,44 5	0,34 5	0,54 3	0,47 7	0,59 2	0,51 1	CP5 (1)/ CP5(2) / CP6 (1) / CP6 (2)
C	0,70 6	0,82 5	0,58 2	0,87 8	0,88 1	0,90 2	0,68 1	0,53 2	0,78 2	0,72 3	0,92	0,68 9	FQ1180366
D	0,24 3	0,30 7	0,21 5	0,22 2	0,23 5	0,32 7	0,16 8	0,18 3	0,28 1	0,27 7	0,31 1	0,36 2	FQ38879
E	0,34 4	0,54 1	0,26 1	0,39 2	0,39 9	0,47 2	0,16 2	0,18	0,33 3	0,45 3	0,52	0,51 7	M1366
F	0,25 9	0,30 3	0,32 8	0,25 7	0,25 2	0,30 3	0,18 3	0,20 5	0,18 4	0,26 8	0,31 9	0,24 5	M1604
G	0,56 8	0,71 2	0,68 4	0,64 1	0,64 2	0,73 1	0,65	0,51 1	0,63 5	0,90 2	1,00 8	0,74 4	24Kp09
H	0,16 2	0,18 2	0,17 9	0,15 2	0,14 1	0,16 4	0,19 9	0,17 3	0,22 6	0,12	0,12 2	0,13 3	Kp666
	Zn-xilytol						Cu-xilytol						

**Tabla 16.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para las 3 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para cada uno de los CP y 6 réplicas para el CN, para el ensayo que utilizó concentraciones de 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Zn-xilytol y Cu-xilytol para cada aislado.

	Absorbancia a 590 nm restando el promedio de absorbancias del CN a los CP						PROMEDIO	DS	CV(%)
CN	0,106	0,105	0,063	0,058	0,071	0,068	0,079	0,021	27

CP4: M1604 DMSO 1	0,5055	0,4725	0,6415				0,540	0,090	17
CP4: M1604 DMSO 2	0,4695	0,5925	0,6505				0,571	0,092	16
CP5: 24Kp09 DMSO 1	0,3015	0,3665	0,5205				0,396	0,112	28
CP5: 24Kp09 DMSO 2	0,3535	0,4085	0,4575				0,407	0,052	13
CP6: Kp666 DMSO 1	0,3665	0,2665	0,4645				0,366	0,099	27
CP6: Kp666 DMSO 2	0,3985	0,5135	0,4325				0,448	0,059	13

Aclaraciones: A los CP se les restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN. Se halla promedio, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV). No se descartaron medidas ya que el CV dio menor al 30% para todos los casos.

**Tabla 17.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para las 3 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para concentraciones de 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Zn-xilytol y Cu-xilytol para cada uno de los aislados en estudio.

			Absorbancia a 590 nm restando el promedio de absorbancias del CN			PROMEDIO	DS	CV(%)
FQ1180366	Zn-xilytol	1ug/mL	0,628	0,747	0,504	0,626	0,122	19
FQ38879	Zn-xilytol	1ug/mL	0,165	0,229	0,137	0,177	0,047	27
M1366	Zn-xilytol	1ug/mL	0,266		0,183	0,224	0,059	26
M1604	Zn-xilytol	1ug/mL	0,181	0,225	0,250	0,218	0,035	16
24Kp09	Zn-xilytol	1ug/mL	0,490	0,634	0,606	0,576	0,076	13
Kp666	Zn-xilytol	1ug/mL	0,084	0,104	0,101	0,096	0,011	11
FQ1180366	Zn-xilytol	2ug/mL	0,800	0,803	0,824	0,809	0,013	2
FQ38879	Zn-xilytol	2ug/mL	0,144	0,157		0,150	0,009	6
M1366	Zn-xilytol	2ug/mL	0,314	0,321	0,394	0,343	0,044	13
M1604	Zn-xilytol	2ug/mL	0,179	0,172	0,225	0,192	0,029	15
24Kp09	Zn-xilytol	2ug/mL	0,563	0,564	0,653	0,593	0,052	9
Kp666	Zn-xilytol	2ug/mL	0,074	0,063	0,086	0,074	0,012	16
FQ1180366	Cu-xilytol	1ug/mL	0,603	0,454	0,704	0,587	0,126	21
FQ38879	Cu-xilytol	1ug/mL	0,090	0,105		0,097	0,011	11
M1366	Cu-xilytol	1ug/mL	0,084	0,102		0,093	0,013	14
M1604	Cu-xilytol	1ug/mL	0,105	0,127	0,106	0,112	0,012	11
24Kp09	Cu-xilytol	1ug/mL	0,572	0,433	0,557	0,520	0,076	15
Kp666	Cu-xilytol	1ug/mL	0,121	0,095	0,148	0,121	0,027	22
FQ1180366	Cu-xilytol	2ug/mL	0,645	0,842	0,611	0,699	0,125	18
FQ38879	Cu-xilytol	2ug/mL	0,199	0,233	0,284	0,238	0,043	18
M1366	Cu-xilytol	2ug/mL	0,375	0,442	0,439	0,418	0,038	9
M1604	Cu-xilytol	2ug/mL	0,190	0,241	0,167	0,199	0,038	19
24Kp09	Cu-xilytol	2ug/mL	0,824	0,930	0,666	0,806	0,133	16
Kp666	Cu-xilytol	2ug/mL	0,042	0,044	0,055	0,047	0,007	15

Aclaraciones: Se restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN a cada valor obtenido. Las celdas sombreadas de color amarillo indican datos que fueron descartados. Los resultados favorables para el estudio son aquellos en los cuales el CV dio positivo y no mayor a 30%.

### 2.3 Ensayos de Inhibición de biofilm usando Ag-SCP y Ag-SMX como agentes inhibidores .

**Tabla 19.** Planificación del ensayo de inhibición de biofilm para concentraciones de 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Ag-SCP y Ag-SMX para cada aislado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CN						CP1: 1180366 DMSO 1			CP1: 1180366 DMSO 2			
B	CP2: FQ38879 DMSO 1			CP2: FQ38879 DMSO 2			CP3: M1366 DMSO 1			CP3: M1366 DMSO 2			
C	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			FQ1180366
D	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			FQ38879
E	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			M1366
F	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			M1604
G	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			24Kp09
H	1ug/mL			2ug/mL			1ug/mL			2ug/mL			Kp666
	Ag-SCP						Ag-SMX						

Representación de una placa de 96 pocillos.

Aclaraciones: Cada ensayo se hace por triplicado a no ser para el CN que se hizo por sextuplicado. Se utiliza una placa de 96 pocillos. Aclaraciones: CN = control negativo; CP = control positivo.

**Tabla 20.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para todas las réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm para concentraciones 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Ag-SCP y Ag-SMX para cada aislado, para el CN y para los CP.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0,071	0,066	0,183	0,314	0,086	0,065	0,327	0,252	0,351	0,335	0,356	0,353	CN/ CP1(1) / CP1 (2)
B	0,715	0,808	0,924	0,883	0,811	0,752	0,152	0,111	0,12	0,11	0,1	0,134	CP2 (1)/ CP2 (2) / CP3 (1) / CP3 (2)
C	0,837	0,766	1,035	0,878	0,969	0,742	0,696	0,937	0,509	0,808	0,67	1,031	FQ118036 6
D	0,551	0,615	0,595	0,519	0,587	0,586	0,584	0,4	0,429	0,514	0,476	0,58	FQ38879
E	0,402	0,366	0,345	0,543	0,461	0,446	0,456	0,47	0,693	0,392	0,78	0,658	M1366
F	0,298	0,312	0,321	0,434	0,408	0,339	0,41	0,218	0,347	0,314	0,335	0,336	M1604
G	0,82	0,743	0,725	0,71	0,578	0,557	0,717	0,792	0,711	0,725	0,843	0,773	24Kp09
H	0,164	0,202	0,149	0,137	0,134	0,131	0,17	0,161	0,157	0,11	0,101	0,081	Kp666

**Tabla 21.** Valores de DO a 590 nm , obtenidos para las 3 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para concentraciones de 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Ag-SCP y Ag-SMX para cada uno de los aislados en estudio.

			Absorbancia a 590 nm restando el promedio de absorbancias del CN			PROMEDIO	DS	CV (%)
FQ1180366	Ag-SCP	1ug/mL	0,765	0,694	0,963	0,807	0,139	17
FQ38879	Ag-SCP	1ug/mL	0,479	0,543	0,523	0,515	0,033	6
M1366	Ag-SCP	1ug/mL	0,33	0,294	0,273	0,299	0,029	10
M1604	Ag-SCP	1ug/mL	0,226	0,24	0,249	0,238	0,012	5
24Kp09	Ag-SCP	1ug/mL	0,748	0,671	0,653	0,691	0,050	7
Kp666	Ag-SCP	1ug/mL	0,092	0,13	0,077	0,100	0,027	27
FQ1180366	Ag-SCP	2ug/mL	0,806	0,897	0,67	0,791	0,114	14
FQ38879	Ag-SCP	2ug/mL	0,447	0,515	0,514	0,492	0,039	8
M1366	Ag-SCP	2ug/mL	0,471	0,389	0,374	0,411	0,052	13
M1604	Ag-SCP	2ug/mL	0,362	0,336	0,267	0,322	0,049	15
24Kp09	Ag-SCP	2ug/mL	0,638	0,506	0,485	0,543	0,083	15
Kp666	Ag-SCP	2ug/mL	0,065	0,062	0,059	0,062	0,003	5
FQ1180366	Ag-SMX	1ug/mL	0,624	0,865		0,745	0,170	23
FQ38879	Ag-SMX	1ug/mL	0,512	0,328	0,357	0,399	0,099	25
M1366	Ag-SMX	1ug/mL	0,384	0,398	0,621	0,468	0,133	28
M1604	Ag-SMX	1ug/mL	0,338		0,275	0,307	0,045	15
24Kp09	Ag-SMX	1ug/mL	0,645	0,72	0,639	0,668	0,045	7
Kp666	Ag-SMX	1ug/mL	0,098	0,089	0,085	0,091	0,007	7
FQ1180366	Ag-SMX	2ug/mL	0,736	0,598	0,959	0,764	0,182	24
FQ38879	Ag-SMX	2ug/mL	0,442	0,404	0,508	0,451	0,053	12
M1366	Ag-SMX	2ug/mL		0,708	0,586	0,647	0,086	13
M1604	Ag-SMX	2ug/mL	0,242	0,263	0,264	0,256	0,012	5
24Kp09	Ag-SMX	2ug/mL	0,653	0,771	0,701	0,708	0,059	8
Kp666	Ag-SMX	2ug/mL	0,038	0,029		0,034	0,006	19

Aclaraciones: Se restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN a cada valor obtenido. Las celdas sombreadas de color amarillo indican datos que fueron descartados. Los resultados favorables para el estudio son aquellos en los cuales el CV dio positivo y no mayor a 30%.

**Tabla 22.** Valores de DO a 590 nm y estudio de promedio, desviación estándar (DS) y coeficiente de variación (CV) para cada grupo de valores para el ensayo que utilizó concentraciones de 1.0 ug/mL y 2.0 ug /mL de Ag-SCP y Ag-SMX para cada aislado.

	Absorbancia a 590 nm restando el promedio de absorbancias del CN a los CP					PROMEDIO	DS	CV (%)	
CN	0,071	0,066			0,086	0,065	0,072	0,010	13
CP2: FQ38879 DMSO 1	0,643	0,736	0,852				0,744	0,105	14
CP2: FQ38879 DMSO 2	0,811	0,739	0,68				0,743	0,066	9
CP1: FQ 1180366 DMSO 1	0,255	0,18	0,279				0,238	0,052	22
CP1: FQ 1180366 DMSO 2	0,263	0,284	0,281				0,276	0,011	4
CP3: M1366 DMSO 1		0,039	0,048				0,044	0,006	15

CP3: M1366 DMSO 2	0,038	0,028					0,033	0,007	21
----------------------	-------	-------	--	--	--	--	-------	-------	----

Aclaraciones: son 3 réplicas del ensayo de inhibición de producción de biofilm, para cada uno de los CP y 6 réplicas para el CN. A los CP se les restó el promedio de la absorbancia obtenido para los CN. Las celdas sombreadas de color amarillo indican datos que fueron descartados. Los resultados favorables para el estudio son aquellos en los cuales el CV dio positivo y no mayor a 30%.