UAB
Universitat Autònoma de Barcelona

Aplicabilidad de la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) en el ámbito asistencial

Jun Hao Wang Wang

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

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  https://creativecommons.org/licenses/?lang=es

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

Universitat Autònoma de Barcelona

Programa de Doctorat en Microbiologia

Departament de Genètica i Microbiologia

Facultat de Biociències

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

Aplicabilidad de la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) en el ámbito asistencial

2026

Memoria presentada por Jun Hao Wang Wang para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona

Con la aprobación de los directores de tesis

Dr. Pere-Joan Cardona Iglesias	Dra. Verónica Saludes Montoro	Dr. Antoni Escalas Bordoy

A papá y mamá

A Zhuo

A Miriam

Contenido

Agradecimientos....1

Resumen....6

Resum....9

Abstract....12

Listado de abreviaturas....15

1. Introducción....17

1.1. *Klebsiella pneumoniae*....17

1.1.1. Historia y filogenética....17

1.1.2. Características y factores de virulencia....21

1.1.3. Mecanismos de resistencia a β-lactámicos....34

1.1.4. Manifestaciones clínicas....47

1.2. *Streptococcus pneumoniae*....55

1.2.1. Historia....55

1.2.2. Características y factores de virulencia....58

1.2.3. Clínica....67

1.2.4. Vacunas....74

1.3. *Enterococcus faecium*....81

1.3.1. Historia....81

1.3.2. Características y factores de virulencia....84

1.3.3. Resistencia a glucopéptidos....92

1.3.4. Clínica....102

1.4. Infección nosocomial: consecuencias y estrategias de control....110

1.4.1. Definición....110

1.4.2. Incidencia y magnitud del problema....112

1.4.3. Factores predisponentes....115

1.4.4. Estrategias de prevención y control....120

1.5. Técnicas de estudio de brotes.....131
1.5.1. Concepto.....131
1.5.2. Métodos epidemiológicos convencionales.....132
1.5.3. Métodos moleculares.....139
1.5.4. Necesidad de métodos rápidos y eficientes.....162
1.6. Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier.....164
1.6.1. Fundamento de la tecnología FTIR.....164
1.6.2. Modos de obtención de espectros.....168
1.6.3. Técnicas de análisis de espectros.....173
1.6.4. Aplicaciones en la microbiología clínica.....178
2. Justificación y objetivos.....190
2.1. Justificación de la unidad temática de la tesis.....190
2.2. Objetivos planteados.....195
3. Resumen y discusión global de los resultados obtenidos.....197
3.1. Artículo I: *Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Outbreaks in the Hospital Setting*.....197
3.2. Artículo II: *Rapid Detection of VREfm Clusters: FTIR Spectroscopy as a Practical Alternative to Whole-Genome Sequencing*.....223
3.3. Artículo III: *Fourier-transform infrared spectroscopy for rapid Streptococcus pneumoniae serotyping in a tertiary care general hospital*.....252
4. Conclusiones.....275
5. Bibliografía.....278
6. Anexos.....314
6.1. Comunicaciones presentadas en congresos.....314
6.2. Premios obtenidos en congresos.....318

Agradecimientos

La verdad es que no sé muy bien cómo encarrilar este apartado, estoy bastante seguro de que lo redactaré muchas veces y, aun así, seguiré dejándome personas importantes que me han acompañado, ayudado y apoyado en este proyecto y a las que quiero dar las gracias. De hecho, confieso que estoy hasta un poco nervioso e ilusionado de haber conseguido llegar a este momento.

En primer lugar, quisiera dedicarle unas palabras a mi director y tutor Pere-Joan Cardona. Sin tus ideas y tu visión de futuro, esto ni siquiera habría empezado. Quiero agradecerte que vieras el potencial de esta tecnología y que confiaras en mí para llevar a cabo esta línea. Siempre recordaré tu mítico "*Avantiii*", "*Obrir un meló*" y "*No hay dolor*". Moltes gràcies jefeeeee!!!

En segundo lugar, quiero agradecer a mi directora Verónica Saludes. Eres una persona disciplinada y siempre dispuesta a mejorar. Aún recuerdo cuando estaba rotando contigo mientras hacía mi primera extracción en columna con unas cepas de *K. pneumoniae* que después me llevaría a Valencia. O cuánto nos rebanamos los sesos con el proceso del "*Rebuttal"* para publicar el primer artículo de esta tesis. "Mi querida dire", he aprendido un montón de secuenciación a lo largo de estos años y esto jamás habría sido posible sin tu apoyo y ayuda. Muchas gracias!

Y como no podía faltar, gracias a mi director Toni Escalas. “Aiiiii misteeer misteeer”, mi compañero de fatigas, aún recuerdo cuando me cogías esos “partes de COVID” y empezabas a apuntar los números de petición “3600” en tu libretita. Eres una persona excelente, muy trabajadora, siempre apasionada por hacerte preguntas y ser un “boletaire”. Gracias por acompañarme en todo este proceso, espero que te lo hayas pasado bien y hayas aprendido tanto como yo. Ya sabes, siempre seguiré creyendo en el “teorema del clavo/teorema de la foto”. Ha sido una suerte haberme cruzado contigo y haber contado con tu apoyo durante este camino! Muchas gracias!

A Montserrat Giménez, gracias por todo lo que me has enseñado estos años. Eres un ejemplo de disciplina y de trabajo. He aprendido mucho de ti y, durante esta tesis, nos has ayudado aportando todos tus conocimientos del ámbito nosocomial. Siempre recordaré ese momento en el que se me resbaló un Kligler de mis manos con una *Salmonella* spp. sobre la mesa mientras leíamos los hemos, o lo que te reíste cuando te conté que los BGP “Corynes” no me parecían letras chinas precisamente para mí. Gracias por todas tus enseñanzas, por todo tu apoyo y toda la confianza depositada en mí.

A Gema, ayyy mi querida “astucias”. Gracias por enseñarme tanto, desde ese elevado valor predictivo negativo, ese *Mucor* spp. que parecía una hoja mal doblada, ese “ladrillo *rubrum*” o esa UFC de *Moraxella* spp. que se desliza por la placa de agar... Gracias por todos

tus valiosos consejos, por todos los momentos compartidos y por todos estos años! Te has hecho un hueco muy especial en mí, me has visto crecer y has vivido mis alegrías y aguantado mis penas. Ahora ya tienes otro cachorro más formado! Has estado conmigo en las duras y en las maduras y no podré agradecerte lo suficiente. Espero que nunca cambies. Podría dedicarte miles de líneas más porque siempre estaré agradecido por todo tu apoyo incondicional tanto en lo profesional como en lo personal. Muchas gracias, AMIGA.

A Belén, mi "querida chorba". Ha sido un placer conocerte y te deseo lo mejor por tus tierras. Gracias por tu amistad y por esas quedadas cuando vienes de visita! Aún recuerdo mi primera conversación contigo en el Livingstone como adjuntillo y tus primeros consejos cuando empecé esta etapa. Siempre es un placer compartir un rato contigo y que te traigas a tus pequeños terremotos Laia i Marc.

Al señor Federico, ese amigo mío "del 84". Todas tus "horas de vuelo" son pocas comparadas con "el código ATESABE" y el "Doctor Fran de Copenhague". Muchas gracias por tu apoyo y amistad. Siempre tendrás un amigo más aquí para ir a "Digestivo" cuando *"la fiera esté bailando"*.

A Águeda, por todo tu apoyo hacia mí, siempre te has preocupado mucho por mi bienestar y me has ido dando muchos ánimos desde que inicié este proyecto. Y gracias siempre por ponerme bien el cuello de las camisas jajaja! Muchas gracias de verdad por tu gran estima!

A mis resis pequeños Bea, Alba, Rosa y mi querida Miriam, os deseo lo mejor en vuestras nuevas etapas como facultativos. Y al resto de resis: Pablo, Nath, Blanca, Tess, Júlia y Leire, estoy seguro de que seréis grandes profesionales en el futuro. Además, gracias a algunos por montar Biotypers y, a todos, "Recordeu si us plau" que "estic molt content" os abrirá muchas puertas jaja. Gracias a todos vosotros por tantos momentos de alegría que me habéis aportado.

También quiero expresar mi agradecimiento a todo el resto de los profesionales del laboratorio que me han acompañado estos años; desde que empecé mi residencia he aprendido un montón y nunca hubiera sido posible sin todo vuestro apoyo: a los facultativos, en especial a María Dolores (por depositar tu confianza en mí y por el conocimiento que me has transmitido), al personal de investigación, a los administrativos y a los técnicos de laboratorio; en especial a mis compañeros de área Marina, Andrea, Jessica S., Lucy y, sobre todo, Jessica Hidalgo. Todos me habéis enseñado tanto y espero haber estado a la altura. Muchas gracias a todo el equipo Can Ruti!

A papá y mamá. Siempre me habéis querido, habéis sido grandes padres, os habéis desvivido por mí y nunca me habéis pedido nada a cambio. Os estaré eternamente agradecido por todo el amor que me habéis dado.

A Zhuo, gracias por ser mi gran apoyo. Hemos compartido mucha vida juntos y aunque ahora cada uno tome su camino, nunca olvidaré cómo

has crecido y cómo me has demostrado todo tu amor. Deseo de todo corazón que encuentres todo lo que te mereces y mucho más. Siempre serás mi hermano. Te quiero hermanito.

A Juan y a Ana. Sois personas bellísimas y con excelentes valores. Gracias por haberme acogido con tanta cercanía y calidez entre vosotros.

Y a la persona más importante y a la que más tengo que agradecer, a mi amada Miriam. Creo que esta tesis es tan tuya como mía. Como dirías tú, fue una serendipia cruzarme contigo. A medida que te iba conociendo, empecé a sentir una atracción hacia ti y de repente, ya no podía parar porque teníamos una conexión especial: plaza Masadas, la peritonitis secundaria, la cuesta abajo sin frenos, el juguito, la puertita, la piscinita, nuestro querido Bolhao, el "volvemos volvemos", nuestro bailesito del 24, la Teresa Ruño, la "llonganissa", el asterisco, el "sueltemente la pierna señora" y toda nuestra batería de cancioncitas/bailesitos y un sinfín de anécdotas/complicidades más. Gracias por ayudarme a sacar esto adelante, hasta en los momentos donde parecía que se iba a venir abajo (~~preguntar a F. Muchaamba~~), sacabas fuerzas. Mil gracias por todos esos momentos de felicidad que me has aportado y por ser un pilar para mí. Deseo de todo corazón que todos nuestros proyectos personales y profesionales se sigan cumpliendo. Gracias por haberte aparecido en mi vida. **TE AMO** Miriam.

Resumen

La caracterización microbiológica rápida y fiable de microorganismos clínicamente relevantes es un pilar fundamental tanto para el control de las infecciones nosocomiales como para la vigilancia epidemiológica y la optimización de estrategias de prevención. En este contexto, la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) ha emergido en los últimos años como una herramienta fenotípica prometedora, capaz de proporcionar información discriminativa basada en la composición bioquímica bacteriana, con tiempos de respuesta reducidos y flujos de trabajo incorporables en la rutina asistencial de un laboratorio clínico.

El objetivo general de esta tesis doctoral fue evaluar la utilidad de la tecnología FTIR como herramienta de tipado bacteriano en el laboratorio de microbiología clínica, analizando su rendimiento en distintos escenarios epidemiológicos y comparándola con las metodologías de referencia actualmente empleadas. Para ello, la tesis se estructura en tres trabajos que abordan dos aplicaciones complementarias: la caracterización de brotes nosocomiales causados por bacterias multirresistentes y la determinación del serotipo capsular de *Streptococcus pneumoniae* en el contexto de la enfermedad neumocócica invasiva.

En el primer trabajo, se evaluó el rendimiento del FTIR como herramienta de primera línea para la caracterización de brotes

nosocomiales producidos por *Klebsiella pneumoniae* productora de β-lactamasas de espectro extendido (*Kp*-BLEE), comparándolo con la epidemiología convencional y la secuenciación del genoma completo (WGS) como método de referencia o *gold standard*. Los resultados demostraron que el FTIR presentaba una mayor concordancia con la WGS que la epidemiología convencional, permitiendo de forma rápida inferir con buen rendimiento la relación genómica de los aislados sospechosos de pertenecer a un brote y detectar brotes "ocultos" a la epidemiología convencional, lo que refuerza su valor como herramienta de cribado rápido en situaciones donde el tiempo de respuesta es crítico.

El segundo trabajo siguió profundizando en la aplicabilidad del FTIR en la investigación de brotes hospitalarios como un método rápido para estudiar brotes producidos por *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (VREfm). Los resultados obtenidos mostraban una concordancia de FTIR equiparable al método de WGS de referencia.

En conjunto, los resultados de ambos estudios demuestran que el FTIR puede emplearse como técnica de primera línea para el estudio precoz de brotes nosocomiales por determinados microorganismos multirresistentes y reservar la WGS como herramienta confirmatoria y de máxima resolución en los casos que sea necesario.

Finalmente, el tercer trabajo abordó la utilidad del FTIR para la determinación del serotipo capsular de *Streptococcus pneumoniae*,

comparando su rendimiento con la reacción de *Quellung*. Se analizaron aislados invasivos representativos de múltiples serotipos circulantes, empleando tanto estrategias de análisis multivariante de espectros como algoritmos de aprendizaje automático. Los resultados mostraron una buena concordancia global empleando los algoritmos automatizados y especialmente elevada para los serotipos incluidos en las vacunas conjugadas, lo que pone de manifiesto el potencial del FTIR como herramienta rápida y coste-efectiva para la vigilancia epidemiológica y el seguimiento del impacto vacunal.

En conjunto, esta tesis demuestra que la espectroscopia FTIR es una herramienta versátil y complementaria a las técnicas moleculares de referencia, con un claro valor añadido en la rutina del laboratorio clínico. Su implementación permite optimizar la toma de decisiones en tiempo real, mejorar la caracterización precoz de brotes nosocomiales y contribuir a la vigilancia epidemiológica de patógenos de relevancia en salud pública, consolidando su papel como una tecnología emergente en microbiología clínica.

Resum

La correcta caracterització de microorganismes clínicament rellevants és un pilar fonamental tant per al control de les infeccions nosocomials com per a la vigilància epidemiològica i l'optimització de les estratègies de prevenció. En aquest context, l'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier (FTIR) ha sorgit en els darrers anys com una eina fenotípica prometedora, capaç de proporcionar informació discriminatòria basada en la composició bioquímica bacteriana, amb temps de resposta reduïts i fluxos de treball integrables en la rutina del laboratori clínic.

L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral va ser avaluar la utilitat de la tecnologia FTIR com a eina de tipat bacterià en el laboratori de microbiologia clínica, analitzant-ne el rendiment en diferents escenaris epidemiològics i comparant-la amb les metodologies de referència actuals. Per a aquest propòsit, la tesi s'estructura en tres treballs que aborden dues aplicacions complementàries: la caracterització de brots nosocomials causats per bacteris multiresistents i la determinació del serotip capsular de *Streptococcus pneumoniae* en el context de la malaltia pneumocòccica invasiva.

En el primer treball, es va avaluar el rendiment del FTIR com a eina de primera línia per a l'estudi de brots nosocomials produïts per *Klebsiella pneumoniae* productora de β-lactamases d'espectre estès

(*Kp*-BLEE), comparant-lo amb l'epidemiologia convencional i la seqüenciació del genoma complet (WGS) com a mètode *gold standard*. Els resultats van demostrar que el FTIR presentava una concordança superior amb la WGS respecte a l'epidemiologia convencional, permetent inferir de manera ràpida la relació genòmica dels aïllats sospitosos de pertànyer a un brot i detectar brots "ocults", fet que reforça el seu valor com a eina de cribratge ràpid en situacions en què el temps de resposta és crític.

El segon treball va seguir estudiant l'aplicabilitat del FTIR en la investigació de brots hospitalaris com a mètode ràpid per a la caracterització de brots produïts per *Enterococcus faecium* resistent a la vancomicina (VREfm). Els resultats obtinguts van mostrar una concordança del FTIR equiparable a la del mètode de referència WGS.

Per tant, els resultats d'ambdós estudis demostren que el FTIR pot emprar-se com a tècnica de primera línia per a l'estudi precoç de brots nosocomials causats per determinats microorganismes multiresistents, reservant la WGS com a eina confirmatòria i de màxima resolució en els casos necessaris.

Finalment, el tercer treball va abordar la utilitat del FTIR per a la determinació del serotip capsular de *Streptococcus pneumoniae*, comparant-ne el rendiment amb la reacció de *Quellung*. Es van analitzar aïllats invasius representatius de múltiples serotips circulants, emprant tant estratègies d'anàlisi multivariant d'espectres

com algoritmes d'aprenentatge automàtic. Els resultats van mostrar una bona concordança global mitjançant els algoritmes automatitzats i especialment elevada per als serotips inclosos en les vacunes conjugades, fet que demostra el potencial del FTIR com a eina ràpida i cost-efectiva per a la vigilància epidemiològica i el seguiment de l'impacte vacunal.

En conjunt, aquesta tesi demostra que l'espectroscòpia FTIR és una eina versàtil i complementària a les tècniques moleculars de referència, amb un clar valor afegit en la rutina del laboratori clínic. La seva implementació permet optimitzar la presa de decisions en temps real, millorar la investigació precoç de brots nosocomials i contribuir a la vigilància epidemiològica de patògens de rellevància en salut pública, consolidant-ne el paper com una tecnologia amb potencial en microbiologia clínica.

Abstract

The rapid and reliable microbiological characterization of clinically relevant microorganisms is a fundamental pillar for both the control of nosocomial infections and epidemiological surveillance, as well as for the optimization of prevention strategies. In this context, Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy has emerged in recent years as a promising phenotypic tool, capable of providing discriminative information based on bacterial biochemical composition, with reduced turnaround times and workflows that can be readily integrated into routine clinical laboratory practice.

The main objective of this doctoral thesis was to evaluate the usefulness of FTIR technology as a bacterial typing tool in the clinical microbiology laboratory, assessing its performance in different epidemiological scenarios and comparing it with current reference methodologies. To this end, the thesis is structured into three studies addressing two complementary applications: the characterization of nosocomial outbreaks caused by multidrug-resistant bacteria and the determination of the capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae* in the context of invasive pneumococcal disease.

In the first study, the performance of FTIR as a first-line tool for the investigation of nosocomial outbreaks caused by extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (*Kp*-BLEE) was

evaluated and compared with conventional epidemiology and whole-genome sequencing (WGS) as the gold standard method. The results demonstrated that FTIR showed a higher concordance with WGS than conventional epidemiology, enabling the rapid inference of genomic relatedness among isolates suspected of belonging to an outbreak and the detection of "hidden" outbreaks, thereby reinforcing its value as a rapid screening tool in situations where response time is critical.

The second study further explored the applicability of FTIR in the investigation of nosocomial outbreaks as a rapid method for the characterization of outbreaks caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm). The results obtained suggest that FTIR provides clustering information comparable to WGS-based methods.

Taken together, the results of both studies demonstrate that FTIR can be used as a first-line technique for the early characterization of nosocomial outbreaks caused by certain multidrug-resistant microorganisms, reserving WGS as a confirmatory tool providing maximum resolution when required.

Finally, the third study addressed the usefulness of FTIR for the determination of the capsular serotype of *Streptococcus pneumoniae*, comparing its performance with the *Quellung* reaction. Invasive isolates representative of multiple circulating serotypes were analysed using both multivariate spectral analysis strategies and machine learning algorithms. The results showed a good overall concordance

when using automated algorithms, with particularly high accuracy for serotypes included in conjugate vaccines, highlighting the potential of FTIR as a rapid and cost-effective tool for epidemiological surveillance and monitoring of vaccine impact.

Overall, this thesis demonstrates that FTIR spectroscopy is a versatile tool complementary to reference molecular techniques, providing clear added value in the routine workflow of the clinical laboratory. Its implementation allows for optimized real-time decision-making, supports the early investigation and characterization of nosocomial outbreaks, and enhances epidemiological surveillance of pathogens of public health relevance, thereby consolidating its role as an emerging technology in clinical microbiology.

Listado de abreviaturas

BLEE: β-lactamasas de espectro extendido

CC: complejo clonal (*clonal complex*)

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

cgMLST: *core genome multilocus sequence typing*

ECDC: *European Centre for Disease Prevention and Control*

ENI: enfermedad neumocócica invasiva

FTIR: espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier

HCA: análisis de conglomerados jerárquicos (*hierarchical cluster analysis*)

ITU: infección del tracto urinario

IRAS: infecciones relacionadas con la asistencia sanitaria

LDA: análisis discriminante lineal (*linear discriminant analysis*)

MBL: metalo-β-lactamasa

MDR: multirresistente (*multidrug resistant*)

MLST: tipado de secuencias multilocus (*multilocus sequence typing*)

NGS*:* secuenciación de nueva generación (*next generation sequencing*)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA: análisis de componentes principales (*principal component analysis*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction*)

PFGE: electroforesis en gel de campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis*)

ST: tipo de secuencia (*sequence type*)

VREfm: *Enterococcus faecium* resistente a la vancomicina (*vancomycin-resistant Enterococcus faecium*)

wgMLST: tipado de secuencias multilocus del genoma completo (*whole genome multilocus sequence typing*)

WGS: secuenciación del genoma completo (*whole genome sequencing*)

1. Introducción

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

1.1.1. Historia y filogenética

El **género *Klebsiella*** incluye diversas especies, como *Klebsiella variicola* (descrita por Rosenblueth en 2004), *Klebsiella oxytoca* (descrita por Flügge en 1886) y *Klebsiella aerogenes* (originalmente descrita por Hormaeche y Edwards en 1960 como *Enterobacter aerogenes*, y reclasificada en 2017 por Tindall). Dentro de este género, la especie de **mayor relevancia clínica es *Klebsiella pneumoniae*** (1).

K. pneumoniae es una bacteria que forma parte del microbioma intestinal de las personas sanas, aunque en determinadas circunstancias puede comportarse como un **patógeno oportunista**. En el ámbito hospitalario, se le atribuye hasta un tercio de las infecciones causadas por bacterias gramnegativas (2), siendo responsable de infecciones urinarias, neumonías, abscesos hepáticos, bacteriemias, etc.

En la actualidad, se considera uno de los patógenos más preocupantes a nivel mundial debido a su alta **capacidad para desarrollar resistencia a los antibióticos,** lo que representa un **riesgo para la salud pública global**.

K. pneumoniae fue identificada por primera vez en 1875 por Theodor Albrecht Edwin Klebs (3), microbiólogo alemán (1834-1913). Aunque fue Klebs quien aisló la bacteria a partir de las vías respiratorias de un paciente con neumonía (de ahí su nombre actual), durante un tiempo se la conoció como "bacilo de Friedländer", ya que en 1882 se describió por primera vez por el microbiólogo Carl Friedländer (1847-1887) (4). No fue hasta 1886 que se renombró *Klebsiella* en honor a Edwin Klebs (5). De acuerdo con la clasificación propuesta por Ida Ørskov en 1984, médica danesa (1922-2007), *K. pneumoniae* se dividió en tres subespecies: *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae* y *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* (6). Con el apoyo de las técnicas de WGS, se han identificado seis especies que comparten entre un 95 y 96% de similitud nucleotídica con *Klebsiella pneumoniae*, y alrededor de un 90% con otras especies del mismo género (**Figura 1**), conformando así el **complejo *Klebsiella pneumoniae* species complex (KpSC)** (7). Este complejo no cuenta con una clasificación taxonómica oficial y está compuesto por siete especies (7,8): *K. pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* subsp. *variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *Klebsiella variicola* subsp. *tropica*, *Klebsiella quasivariicola* y *Klebsiella africana*. Generalmente, *Klebsiella pneumoniae sensu stricto* representa aproximadamente el 85% de los aislados identificados dentro del complejo KpSC (7).

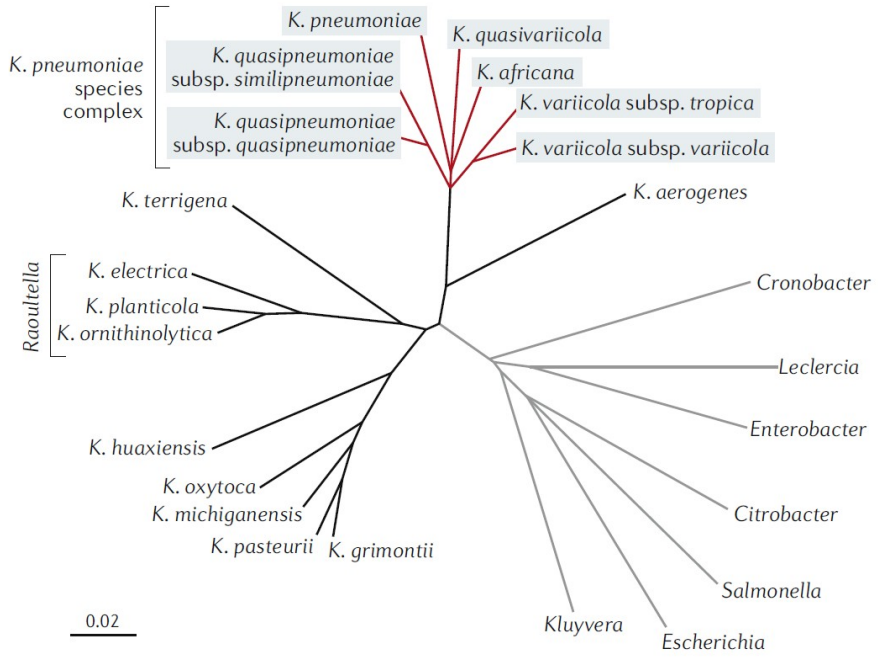


Figura 1: Árbol filogenético de genoma completo de *Klebsiella pneumoniae*. Se muestran las relaciones filogenéticas entre *K. pneumoniae* y A) las especies del complejo KpSC (en rojo), B) otras especies del género *Klebsiella* (en negro) y C) la familia *Enterobacteriaceae* (en gris, abajo a la derecha). La barra de escala 0,02 representa la divergencia media estimada de nucleótidos. Extraído de (7).

Respecto a su genoma, *K. pneumoniae* contiene entre 5.000 y 6.000 genes distribuidos en un genoma de aproximadamente 5 a 6 millones de pares de bases (7). De estos, alrededor de 1.700 genes se encuentran en la gran mayoría de las cepas de la especie y conforman el denominado **genoma central o "core"** que codifica principalmente proteínas con funciones esenciales y que generalmente se encuentran en el cromosoma bacteriano (7).

El resto, entre 3.500 y 4.000 genes, constituyen el **genoma accesorio o variable**, cuya presencia varía entre cepas, aportando características específicas no esenciales como la resistencia antimicrobiana, la virulencia y la patogenicidad, que suele venir mayoritariamente codificada en elementos móviles (como los plásmidos, los transposones, o los integrones). La mayoría de los genes de una cepa pertenecen al genoma accesorio, lo cual implica que el **pangenoma (suma de genoma "core" y accesorio)** sea extremadamente diverso (9).

Tradicionalmente, los distintos linajes clonales de *K. pneumoniae* se han identificado mediante **esquemas de tipificación multilocus de secuencias** (**MLST,** por sus siglas en inglés). Esta técnica se detalla más adelante en el apartado 1.5.3 de esta tesis. El esquema correspondiente se publicó en 2005 (10) y estableció los **7 genes** que se analizan: *rpoB, gapA*, *mdh, pgi, phoE, infB* y *tonB*. A fecha de la redacción de esta tesis se han publicado más de 8.000 ST de *K. pneumoniae* (11). Algunos de estos ST tienen mayor importancia a nivel de salud pública porque se relacionan con una mayor capacidad para adquirir genes de resistencia. Estos se denominan comúnmente **clones de alto riesgo o "*high-risk clones*"**. Algunos de los *high-risk clones* descritos a nivel mundial son el ST147, ST307 y ST392 (8,12,13).

1.1.2. Características y factores de virulencia

Klebsiella pneumoniae es una **bacteria gramnegativa**, capsulada, inmóvil y anaerobia facultativa (14), perteneciente al filo *Pseudomonadota*, clase *Gammaproteobacteria*, orden *Enterobacterales* y familia *Enterobacteriaceae* (15). A nivel morfológico, se trata de un bacilo cuyo tamaño varía entre 0,6 y 6,0 µm de longitud y entre 0,3 y 2,0 µm de ancho (14). A nivel bioquímico, se trata de un microorganismo con capacidad de fermentar la lactosa, es catalasa positivo y citocromo-oxidasa negativo (14).

Esta bacteria habita de manera ubicua en la naturaleza, se puede encontrar en el suelo, en plantas, en animales y en humanos (1,14,16). Dentro del humano, este microorganismo suele colonizar nasofaringe y tracto digestivo, constituyendo **parte de la microbiota humana** (7,16).

A nivel genómico, *K. pneumoniae se* ha dividido clásicamente en **dos grandes linajes: las cepas hipervirulentas y las cepas multirresistentes**. Las primeras suelen ser portadoras de genes de virulencia que les confieren mayor capacidad patogénica, mientras que las segundas presentan una amplia variedad de genes de resistencia antimicrobiana, lo que limita significativamente las opciones terapéuticas disponibles. Históricamente, ambos linajes se

han considerado genómicamente separados; sin embargo, estudios recientes han evidenciado una convergencia progresiva entre virulencia y resistencia, lo que plantea nuevos desafíos clínicos y epidemiológicos (7).

Al igual que muchas otras bacterias que forman parte de la microbiota humana, la interacción entre el hospedador y *K. pneumoniae* es continua, dinámica y compleja (7). Como resultado de esta interacción, *K. pneumoniae* puede comportarse como un **microorganismo colonizante** o convertirse en un patógeno.

El porcentaje de colonización por *K. pneumoniae* en la población se desconoce con exactitud, ya que puede variar considerablemente entre individuos e incluso dentro de un mismo individuo, debido a que puede tratarse de una colonización transitoria. Lo que sí han demostrado algunos estudios es que la colonización difiere según si se adquiere a nivel comunitario o de si se trata de un paciente que lo adquiere en el ámbito hospitalario. Aunque los datos son heterogéneos debido a las diferencias entre las cohortes estudiadas, algunos estudios han estimado una tasa de colonización por *K. pneumoniae* de aproximadamente un 5% en la comunidad (7,17) y hasta un 20-25% en entornos hospitalarios (7,17,18).

La capacidad de *K. pneumoniae* para comportarse como patógeno suele estar relacionada con una **alteración en el equilibrio entre el hospedador y la bacteria**.

En lo que respecta al hospedador, el sistema inmunológico constituye el principal factor determinante. Su eficacia puede verse comprometida por **diversas condiciones**, como las edades extremas (prematura o avanzada), determinadas comorbilidades (diabetes, hepatopatía crónica, neoplasias, etc.), la inmunosupresión o la presencia de infecciones concomitantes. Todas estas situaciones debilitan la respuesta inmune, lo que facilita la **transición** de *K. pneumoniae* desde un estado de colonización hacia uno patógeno (1,7,14,16,19).

Por otro lado, desde la perspectiva del patógeno, *K. pneumoniae* cuenta con una serie de **factores de virulencia** que potencian su capacidad patogénica. A continuación, se describen los más relevantes: la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), las adhesinas y los sideróforos (**Figura 2**).

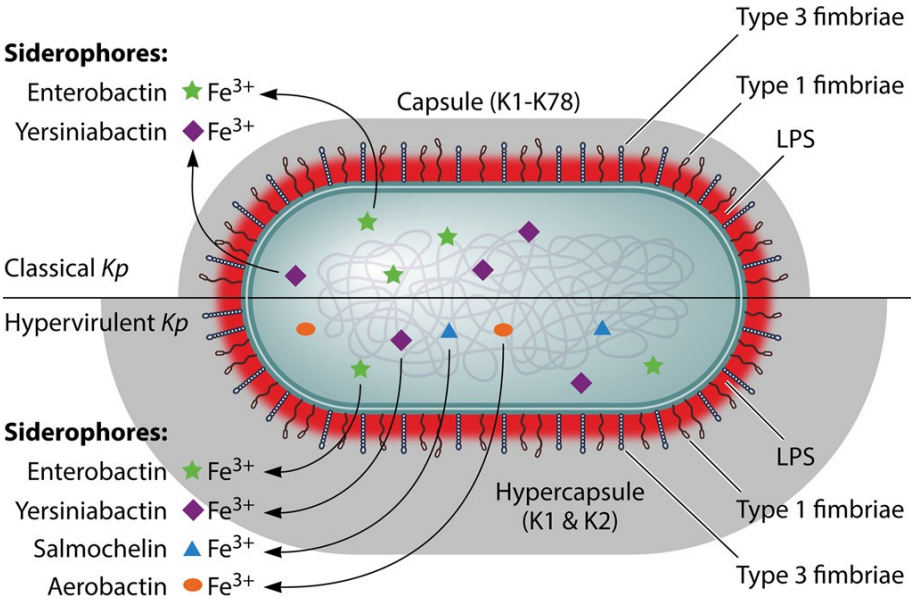


Figura 2: Factores de virulencia más relevantes de *K. pneumoniae*. Se muestran diferenciados para cepas clásicas en la parte superior y para cepas hipervirulentas en la parte inferior. Extraído de (19).

A) Cápsula: Componente extracelular compuesto principalmente por un **polisacárido** de carácter ácido, formado por repeticiones de unidades que contienen entre tres y seis azúcares (14). Su síntesis está regulada por el locus *cps* (14,20). Desde 1926 se han utilizado **técnicas de serotipado** para clasificar cepas de *K. pneumoniae* mediante el estudio de sus antígenos capsulares, conocidos como **antígenos K** (20,21). Estas técnicas dieron origen a la clasificación de las cápsulas según su tipo K (**K-tipo**). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que el serotipado no ofrece un nivel de resolución suficiente (22), por lo que se han desarrollado métodos moleculares más precisos, basados en el análisis de genes

ubicados en el extremo 5' del locus *cps*. Esta aproximación ha permitido establecer una nueva clasificación de cápsulas según el tipo KL (**KL-tipo**). Hasta el año 2024, se han descrito 79 K-tipos y 184 KL-tipos (22).

La cápsula se considera el factor de virulencia más importante ya que actúa como un **mecanismo de evasión** del sistema inmune del hospedador (7,14,20,22). Este hecho es debido a que los polisacáridos **dificultan la fagocitosis** por parte del sistema inmune y mimetizan los azúcares presentes en el hospedador. Se ha demostrado que **ciertos K-tipos de cápsulas son más virulentas** debido a que presentan producción de cápsula más gruesa, en mayor cantidad y de características más mucosas (7,14,22). Diversos estudios (14,19) han demostrado que las diferencias fenotípicas observadas en estas cepas están determinadas por los genes reguladores de transcripción *rmpA* y *rmpA2* (por sus siglas en inglés, *regulator of mucoid phenotype A*), así como por los genes *rcsA* y *rcsB*, implicados en la regulación de la síntesis de la cápsula (del inglés *regulation of capsule synthesis*). A este tipo de cepas se las denomina "**hipervirulentas**" en la literatura científica, mientras que al resto de cepas se las denomina "**clásicas**". Diversos estudios han demostrado que hay mayor prevalencia de infecciones por cepas hipervirulentas en Asia (7,14,19,22). Además, se ha observado un mayor porcentaje de portadores intestinales de cepas hipervirulentas en personas de origen asiático (7,23).

B) Lipopolisacárido: Componente presente en la membrana celular de las bacterias gramnegativas. Se conoce también como **endotoxina**. Está compuesto del antígeno O, un oligosacárido y el lípido A (**Figura 3**) y su síntesis está mediada por los genes *wb*, *waa* y *lpx*, respectivamente (19).

El **antígeno O** se sitúa en la zona más externa del lipopolisacárido (**Figura 3**) y contribuye en la **evasión inmunitaria** del hospedador al inhibir la activación del sistema complemento: dificulta la acción de C1q (inhibe la activación de la vía clásica del complemento) y la acción de C3b (impide la formación de poros líticos en la bacteria) (14,19).

Los oligosacáridos son necesarios para la estructura y actividad del lipopolisacárido, ya que conectan el antígeno O con el lípido A y permiten el correcto ensamblaje. El **lípido A** se sitúa en la región más interna del lipopolisacárido (**Figura 3**). Se trata del ligando del receptor tipo Toll 4, el cual **estimula la respuesta inflamatoria** ya que desencadena la producción de citoquinas y quimiocinas proinflamatorias. A su vez, el lípido A protege al microorganismo de la acción de péptidos antimicrobianos (14,19).

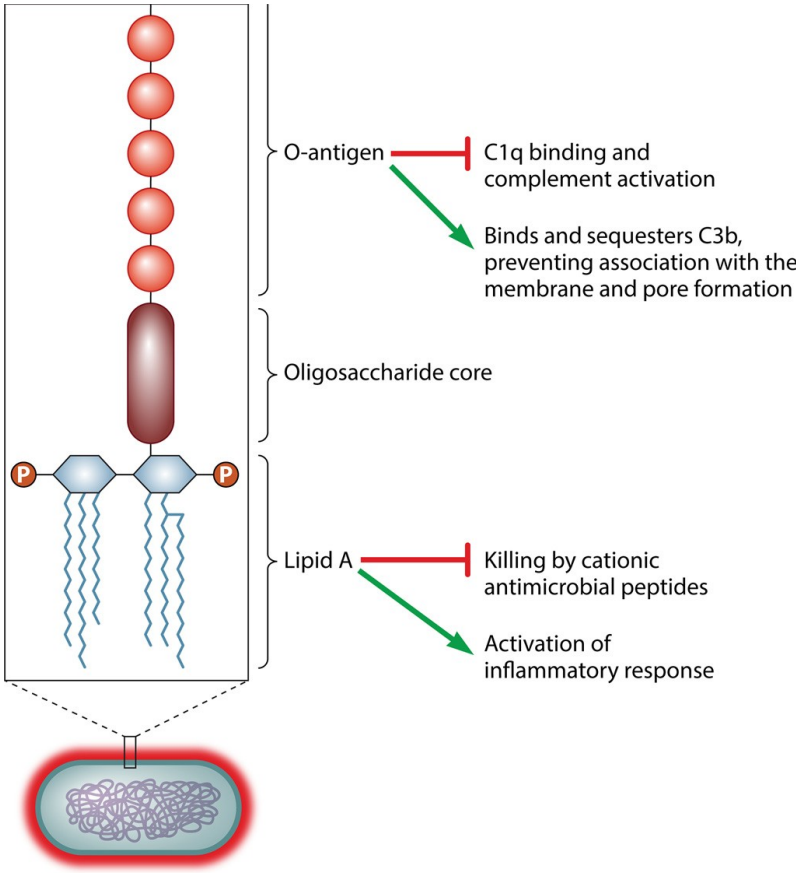


Figura 3: Componentes del lipopolisacárido y respectivas funciones. Extraído de (19).

C) Fimbrias: Estructuras situadas en la parte externa de la cápsula. En *K. pneumoniae*, las fimbrias mejor estudiadas son las de tipo 1 y tipo 3.

Actúan como **adhesinas** permitiendo a la bacteria unirse a las células humanas. Tienen especial relevancia en la invasión de ciertos tejidos como el epitelio urinario o el epitelio pulmonar, así como en **dispositivos** médicos: catéteres, sondas urinarias,

dispositivos de ventilación mecánica, etc. (14,19). La adhesión a dispositivos médicos es el primer paso en la formación de ***biofilms***: comunidades bacterianas protegidas por una matriz extracelular compuesta por proteínas y carbohidratos, que dificulta tanto la acción del sistema inmunológico del hospedador como la efectividad de los antibióticos (24).

Respecto a las fimbrias de tipo 1, están presentes en el 90% de *K. pneumoniae* (25) y están formadas por dos subunidades: la subunidad mayor FimA, con función estructural, y la subunidad menor FimH, que actúa como adhesina (**Figura 4**). Estas fimbrias se unen a residuos de D-manosa presentes en las glicoproteínas de las células del hospedador y desempeñan un papel clave en las infecciones del tracto urinario, ya que facilitan la invasión del epitelio vesical (14,26). Aunque favorecen la adhesión y colonización, las fimbrias tipo 1 también favorecen la eliminación de la bacteria por parte del sistema inmunitario del hospedador: la subunidad FimH es reconocida por neutrófilos y macrófagos, lo que desencadena su fagocitosis (19).

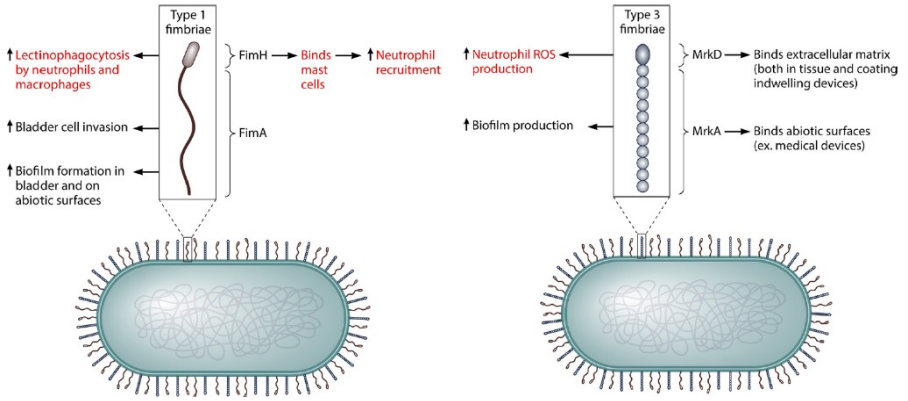


Figura 4: Estructura y funciones de las fimbrias tipo 1 y tipo 3. Extraído de (19).

Por otra parte, las fimbrias tipo 3 están codificadas por el operón *mrkABCD* y formadas principalmente por dos subunidades (**Figura 4**): MrkA, de función estructural, y MrkD, responsable de la adhesión. Estas fimbrias están presentes en prácticamente todas las cepas de *K. pneumoniae* y se unen específicamente a colágeno tipo IV y V (14,19). A diferencia de las fimbrias tipo 1, las fimbrias tipo 3 no participan significativamente en las infecciones del tracto urinario. Su principal implicación clínica se da en las infecciones respiratorias, especialmente en aquellas asociadas al uso de ventilación mecánica. En este contexto, se ha observado que la subunidad MrkA facilita la adhesión al material plástico de los dispositivos médicos, mientras que MrkD se une a componentes del epitelio bronquial (27). Asimismo, las fimbrias tipo 3 también pueden activar la respuesta inmune del hospedador, al inducir la producción de especies reactivas de oxígeno por parte de los neutrófilos (19).

D) Sideróforos: Al igual que en otras bacterias, el hierro es un elemento esencial para el metabolismo de *K. pneumoniae* (28). En condiciones normales, el hierro se encuentra unido a proteínas transportadoras como la transferrina, por lo que su concentración libre en el plasma es muy baja. Durante una infección, el hospedador intensifica esta restricción secuestrando el hierro como parte de la respuesta inmune innata, dificultando así el crecimiento bacteriano (28). Para contrarrestar esta respuesta, las bacterias sintetizan **moléculas quelantes de hierro** llamadas sideróforos, que captan el hierro del hospedador de manera competitiva a través de transportadores específicos (7,14). En *K. pneumoniae* se han descrito **cuatro** moléculas principales que actúan como sideróforos (7,19): **enterobactina, aerobactina, salmoquelina y yersiniabactina** (**Figura 5**). Sin embargo, estos sistemas no están presentes en todas las cepas ya que se localizan en elementos genéticos móviles adquiridos, como **plásmidos o islas integrativas y conjugativas** (ICE), lo que permite su diseminación entre linajes. En particular, los genes *ybt* y *clb* se localizan en el elemento ICEKp, el principal elemento móvil asociado a la virulencia de *K. pneumoniae* (29). Además, se han desarrollado **sistemas de tipado específicos** mediante sequence typing (ST) para los loci de sideróforos, como el sistema YbST para la yersiniabactina y el sistema CbST para la colibactina (29). Por otra parte, se ha propuesto un sistema de puntuación "score" de la

virulencia de las cepas de *K. pneumoniae* basado en la "presencia acumulada" de los genes que codifican los sideróforos (30).

La enterobactina es el sideróforo con mayor afinidad por el hierro entre los cuatro (19). Su síntesis está regulada por el operón *ent*, y su captación es mediada por el transportador específico FepA. Este sideróforo constituye el principal sistema de adquisición de hierro en *K. pneumoniae* y se encuentra presente tanto en cepas clásicas como en cepas hipervirulentas. Sin embargo, su actividad se ve disminuida por la lipocalina-2 (31), una proteína sintetizada como parte de la respuesta inmune del hospedador durante la infección. *K. pneumoniae* puede disponer de los demás sideróforos cuya actividad no se ve inhibida por la lipocalina-2 (31).

La aerobactina, por contraparte, es el sideróforo con menor afinidad. Su síntesis está regulada por el operón *iuc*, y su expresión es poco común en cepas clásicas. Sin embargo, se asocia de manera frecuente con cepas hipervirulentas, ya que su transportador específico, IutA, se encuentra codificado en el mismo plásmido que alberga el gen *rmpA* (responsable de la síntesis de la cápsula hipermucoide) (32).

La salmoquelina es una forma glucosilada de la enterobactina, lo que le permite evadir la neutralización por parte de la lipocalina-2. Su síntesis está codificada por el operón *iro*. Al igual que la aerobactina, este sideróforo no suele estar presente en las cepas

clásicas y se asocia frecuentemente con cepas hipervirulentas (**Figura 2**) (32). Su transportador específico es IroN.

Finalmente, se encuentra la yersiniabactina (descrita originalmente en el género *Yersinia* spp.). Su síntesis está regulada por los genes *ybt* (33). La actividad de yersiniabactina se ve disminuida en presencia de la transferrina del hospedador. Su transportador específico es YtbQ.

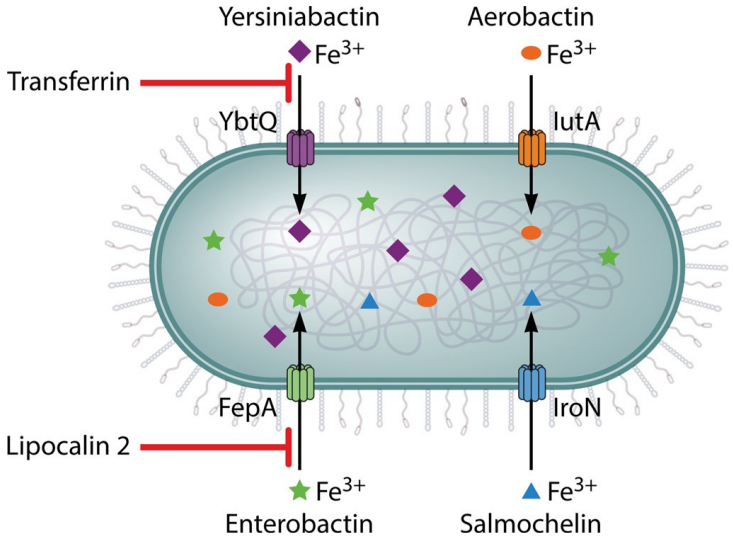


Figura 5: Sistema de sideróforos y transportadores de hierro. Extraído de (19).

Además de los factores de virulencia previamente descritos, se han identificado otros cuya relevancia aún no está completamente establecida y/o que no han sido caracterizados en tanta profundidad (19). Por ello, en esta tesis se abordarán de manera más breve:

E) OMPs (*Outer membrane proteins,* proteínas de membrana externa): Se han estudiado diversas, entre las que destacan la

proteína de membrana externa A (OmpA), la lipoproteína asociada al peptidoglicano (Pal) y la lipoproteína mureína (LppA). Estas proteínas contribuyen a la **protección** de la bacteria frente a la respuesta inmune del hospedador (33).

F) Porinas: Las porinas actúan como **canales de entrada** para diversas moléculas, incluidos los antibióticos. En cepas productoras de BLEE o carbapenemasas, se ha descrito una reducción o incluso ausencia en la expresión de porinas como OmpK35 y OmpK36 (33). Sin embargo, ciertos estudios presentan resultados ambiguos y se necesitan más datos concisos para caracterizar mejor el papel que desempeñan las porinas en diferentes contextos de resistencia a los antibióticos (33).

G) Bombas de eflujo y transportadores: Entre las bombas de expulsión identificadas en *K. pneumoniae* destaca AcrAB (14). Estas bombas **actúan expulsando determinados compuestos** antimicrobianos (como los antibióticos) fuera de la bacteria, reduciendo así su eficacia. La presencia de AcrAB se ha asociado a cepas multirresistentes (33).

H) Genes relacionados con el metabolismo de la alantoína: Se ha identificado el gen *allS*, el cual permite a *K. pneumoniae* aprovechar el nitrógeno disponible en el ambiente, favoreciendo así su **supervivencia** en condiciones adversas (34).

1.1.3. Mecanismos de resistencia a β-lactámicos

Al igual que otras enterobacterias pertenecientes a la misma familia, los antibióticos **más comúnmente utilizados** para el tratamiento de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* son los **β-lactámicos** (betalactámicos). No obstante, dependiendo del foco infeccioso, también pueden emplearse otras alternativas, como las quinolonas, aminoglucósidos, trimetoprima/sulfametoxazol (combinación conocida como cotrimoxazol), y fosfomicina, entre otros.

Los β-lactámicos representan la clase de antibióticos más prescrita frente a *K. pneumoniae* (35), debido a su elevada **eficacia**, buen perfil de **seguridad** y por ser considerados el **tratamiento de elección** en la mayoría de los casos (36). Por esta razón, en el presente trabajo se abordarán exclusivamente los mecanismos de resistencia asociados a esta familia de antibióticos.

Para comprender los mecanismos de resistencia a los antibióticos β-lactámicos, hay que abordar primero su estructura y su mecanismo de acción. Respecto a su estructura, **los β-lactámicos se dividen en cuatro grupos principales: penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos.** Todos ellos comparten la presencia de un **anillo β-lactámico** en su estructura, aunque en el caso de los monobactámicos este anillo no está fusionado a un segundo anillo, a diferencia de los demás grupos (**Figura 6**). Su **mecanismo de acción** se basa en la **unión**

a las proteínas fijadoras de penicilina (**PBPs**, por sus siglas en inglés), lo que **inhibe la síntesis del peptidoglicano**, componente esencial de la pared celular bacteriana. Esta inhibición altera la integridad de la pared celular, lo que finalmente conduce a la lisis de la bacteria (36,37).

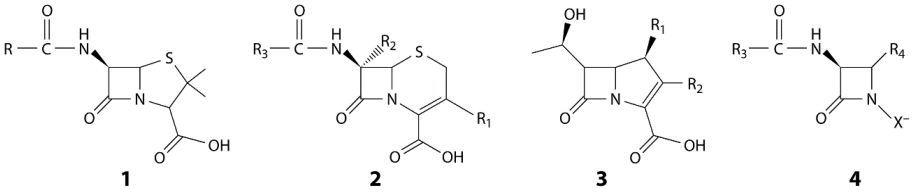


Figura 6: Estructura química de los antibióticos β-lactámicos. (1) Penicilinas; (2) Cefalosporinas; (3) Carbapenémicos; (4) Monobactámicos. Extraído de (38).

Los mecanismos de resistencia a los antibióticos pueden clasificarse en cuatro tipos principales (37): modificación del sitio diana (como ocurre con la alteración de las PBPs), inactivación del antibiótico mediante enzimas, disminución de la permeabilidad de la pared celular y expulsión activa del antibiótico mediante bombas de eflujo. En el caso particular de la resistencia a los β-lactámicos, **el mecanismo de resistencia más relevante es la inactivación enzimática, llevada a cabo por las β-lactamasas**, enzimas capaces de degradar el anillo β-lactámico e inactivar la acción del antibiótico (37) (**Figura 7**).

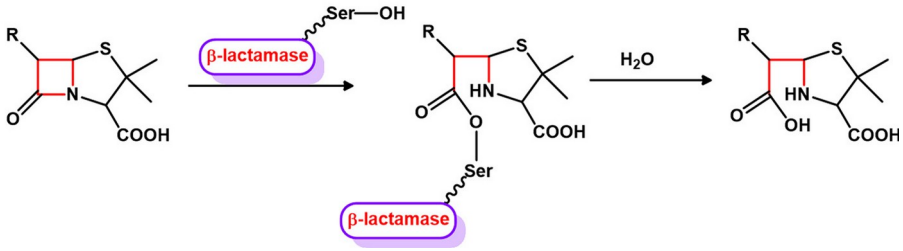


Figura 7: Estructura del anillo β-lactámico e inactivación de los β-lactámicos por parte de las β-lactamasas. Modificado de (39).

Actualmente, se han caracterizado molecularmente más de 11.000 β-lactamasas (40). Aunque existen diversas formas de clasificarlas, los dos sistemas más reconocidos son (41):

- **Clasificación funcional de Bush-Jacoby-Medeiros**: agrupa las β-lactamasas en **grupos del 1 al 4** según su actividad enzimática y sensibilidad a inhibidores.

- **Clasificación molecular de Ambler**: divide las β-lactamasas en **cuatro clases (A, B, C y D)** basándose en su secuencia de aminoácidos y su estructura molecular (**Figura 8**). Las β-lactamasas de las clases A, C y D poseen un centro activo cuya actividad enzimática depende de un residuo de serina. En cambio, las β-lactamasas de clase B requieren la presencia de iones de zinc en su centro catalítico.

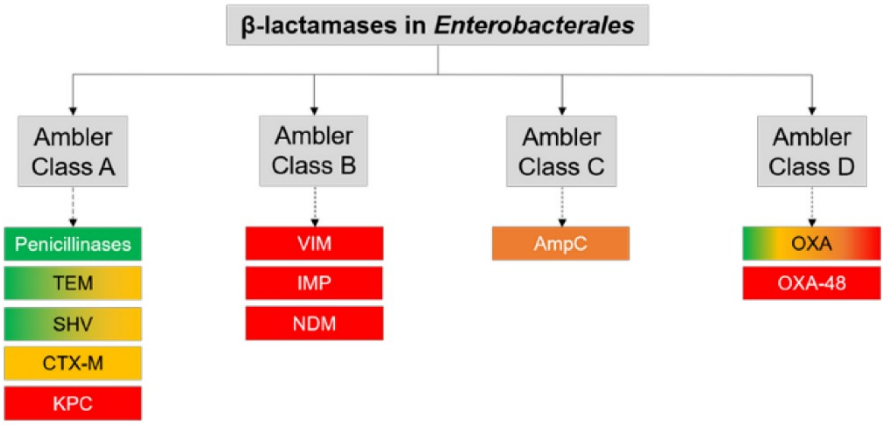


Figura 8: Principales β-lactamasas según la clasificación de Ambler. El color indica el espectro de hidrólisis: en verde se representan las β-lactamasas que hidrolizan penicilinas y cefalosporinas de primera generación, en amarillo y naranja las β-lactamasas que hidrolizan cefalosporinas de amplio espectro y en rojo las β-lactamasas que hidrolizan los carbapenémicos, también llamadas carbapenemasas. Adaptado de (42).

En esta tesis se abordarán las β-lactamasas de mayor relevancia clínica y epidemiológica: las β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas.

β-lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las primeras β-lactamasas descritas fueron TEM-1 y SHV-1, identificadas entre las décadas de 1960 y 1970 (43,44). El nombre **TEM** proviene de *Temoneira*, la paciente de quien se aisló por primera vez una cepa productora de la enzima TEM-1 (44). Por otro lado, **SHV** corresponde a las siglas en inglés de "Sulfhydryl Variable", en referencia a la variabilidad en la sensibilidad de la enzima a los reactivos con grupos sulfhidrilo observada durante su caracterización inicial (44). Ambas pertenecen a la **clase A** según la clasificación

molecular de Ambler (**Figura 8**) (41). Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar penicilinas y cefalosporinas de primera generación. En particular, SHV-1 está codificada de forma cromosómica en *K. pneumoniae*, se expresa constitutivamente y confiere a esta especie una resistencia intrínseca a la ampicilina.

Con el transcurso del tiempo, a partir de la década de 1980, comenzaron a surgir variantes de las enzimas TEM y SHV como resultado de sustituciones aminoacídicas, las cuales les conferían la capacidad de hidrolizar cefalosporinas de espectro más amplio, especialmente las de tercera generación (44). **Estas "nuevas" β-lactamasas fueron denominadas β-lactamasas de espectro extendido (BLEE)** para diferenciarlas de las β-lactamasas "clásicas" de menor espectro previamente descritas. A partir de 1989 se detectó la familia de BLEE más ampliamente diseminada a nivel mundial y que predomina en la actualidad: las **CTX-M** (denominadas así por su capacidad para hidrolizar cefotaxima, y por haber sido inicialmente identificadas en un paciente procedente de Múnich). Aunque las primeras BLEE derivaron de variantes TEM y SHV, a partir de los años 2.000 las enzimas de la familia CTX-M comenzaron a reemplazarlas, convirtiéndose en las **BLEE más predominantes en la actualidad** (44).

Las principales BLEE se definen como **enzimas pertenecientes a la clase A** de la clasificación de Ambler (**Figura 8**), con capacidad para **hidrolizar cefalosporinas de espectro extendido y monobactámicos**,

son inhibidas por el ácido clavulánico y no tienen actividad frente a las cefamicinas y los carbapenémicos (44).

Desde su aparición, **las BLEE se han diseminado a nivel mundial y actualmente son endémicas en enterobacterias**. Esta situación reduce significativamente las opciones terapéuticas disponibles y aumenta la morbimortalidad, ya que obliga al uso de tratamientos más restringidos. Por ello, representan un grave problema de salud pública a escala global. De hecho, la **OMS categoriza las enterobacterias productoras de BLEE como "*Critical group*" en su "*Priority Pathogens List*"** publicada en 2024 (45).

Además, debido a su capacidad para desarrollar y diseminar mecanismos de resistencia a los antimicrobianos, **en 2008 se propuso incluir a *K. pneumoniae* dentro del acrónimo ESKAPE** (46,47). Este grupo está conformado por ***E**nterococcus faecium*, ***S**taphylococcus aureus*, ***K.** pneumoniae*, ***A**cinetobacter baumannii*, ***P**seudomonas aeruginosa* y ***E**nterobacter* spp., y agrupa a las bacterias con mayor capacidad de adquirir y transferir mecanismos de resistencia, además de ser responsables de la mayoría de las infecciones nosocomiales a nivel mundial. Estas características convierten a los ESKAPE en una de las principales **amenazas para la salud pública**, debido a la dificultad de tratamiento, la morbimortalidad asociada y el incremento de los costes sanitarios (46).

Según datos del *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), en el año 2023, la incidencia de *K. pneumoniae* resistente a cefalosporinas de tercera generación en Europa fue del 34,8% (48). Los diez países europeos con mayor incidencia de *K. pneumoniae* productora de BLEE fueron Bulgaria (81,5%), Grecia (75,6%), Rumania (69,4%), Polonia (64,3%), Chipre (60,5%), Croacia (55,3%), Italia (55,2%), Eslovaquia (52,6%), Portugal (50,7%) y República Checa (46,3%) (49).

En España, desde el año 2005 la **tendencia** ha sido **creciente**, observándose un aumento progresivo en la prevalencia de *K. pneumoniae* productora de BLEE. Los últimos datos disponibles a fecha de redacción de esta tesis son del 2023, observándose una **incidencia del 25,3%** respecto a un total de 3.033 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (**Figura 9**) (49).

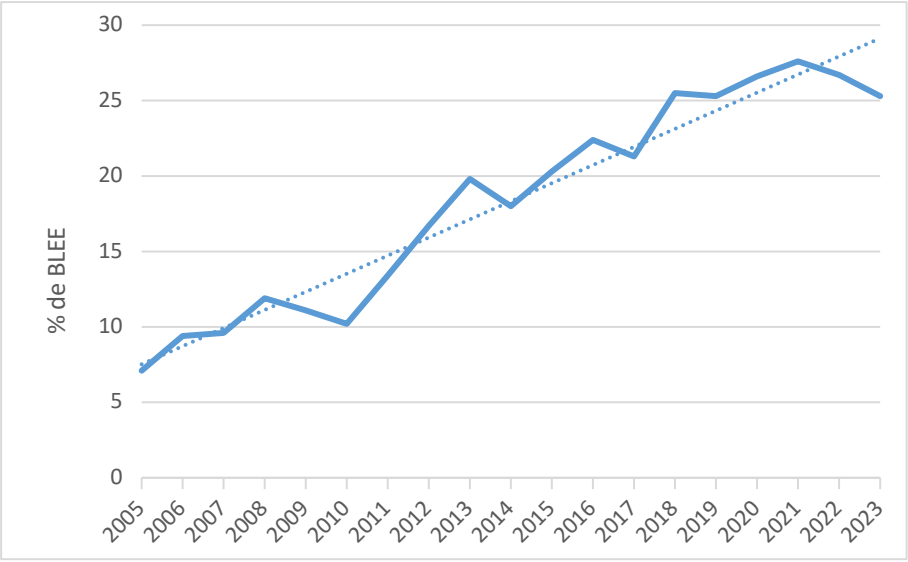


Figura 9: Tendencia de la proporción de aislados clínicos de *K. pneumoniae* productores de BLEE en España entre los años 2005-2023. Se observa un incremento progresivo, alcanzando un pico del 27,8% en 2021. Extraído de (49).

Finalmente, existen otras β-lactamasas de espectro extendido distintas a las tres familias principales mencionadas (CTX-M, TEM y SHV) como las enzimas GES, PER o VEB (44). Debido a su baja frecuencia y menor relevancia clínica, estas no representan un problema relevante y, por ello, no serán abordadas en profundidad en esta tesis.

Carbapenemasas

Las β-lactamasas con **capacidad para hidrolizar carbapenémicos** se denominan carbapenemasas. Al hidrolizar los carbapenémicos, las carbapenemasas representan una **amenaza aún mayor a nivel mundial que las BLEE,** ya que los carbapenémicos se consideran tratamiento de elección frente a estas últimas. Debido a su alto nivel

de resistencia y su impacto clínico, las enterobacterias productoras de carbapenemasas también se encuentran clasificadas como "***Critical group*" en la "*Priority Pathogens List*" de la OMS** (45).

Las carbapenemasas pueden pertenecer a las **clases A, B o D** del sistema de clasificación de Ambler (**Figura 8**). A diferencia de las BLEE más relevantes, que pertenecen a la clase A, la determinación de la clase de Ambler en las carbapenemasas tiene una relevancia clínica mayor, ya que cada clase posee características enzimáticas distintas que determinan su sensibilidad o resistencia a ciertos antibióticos, lo que resulta fundamental para seleccionar el tratamiento antimicrobiano más adecuado y eficaz en cada caso.

La primera carbapenemasa, denominada NmcA, se identificó en 1993 (50). Desde entonces, estas enzimas se han diseminado ampliamente y han sido **detectadas a nivel mundial**, con una alta prevalencia en regiones como el sudeste asiático (especialmente India y Pakistán), la cuenca mediterránea, Rusia, China y Estados Unidos (**Figura 10**) (51).

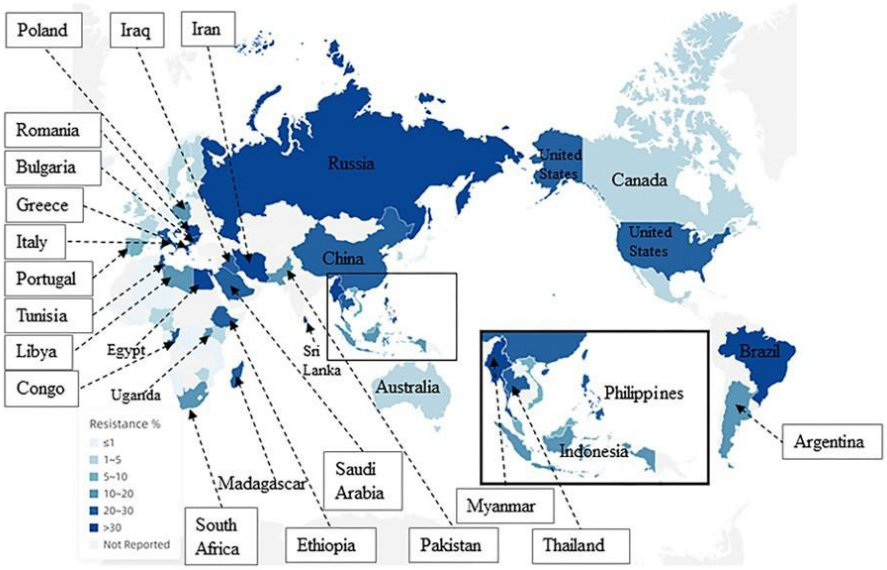


Figura 10: Países con mayor circulación de carbapenemasas. Adaptado de (51).

Según datos del ECDC (49), en el año 2023, los diez países europeos con mayor incidencia de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas fueron Grecia (69,7%), Bulgaria (56,8%), Rumania (52,8%), Chipre (33,6%), Croacia (27,6%), Italia (26,5%), Polonia (18,1%), Portugal (13,1%), Eslovaquia (12,6%) y Letonia (6,4%).

En España, el porcentaje de aislados clínicos de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas se ha mantenido más **bajo** en comparación con el porcentaje de *K. pneumoniae* productora de BLEE. Los últimos datos disponibles a fecha de redacción de esta tesis son del 2023, observándose una **incidencia del 4,3%** respecto a un total de 3.033 aislamientos clínicos de *K. pneumoniae* (**Figura 11**).

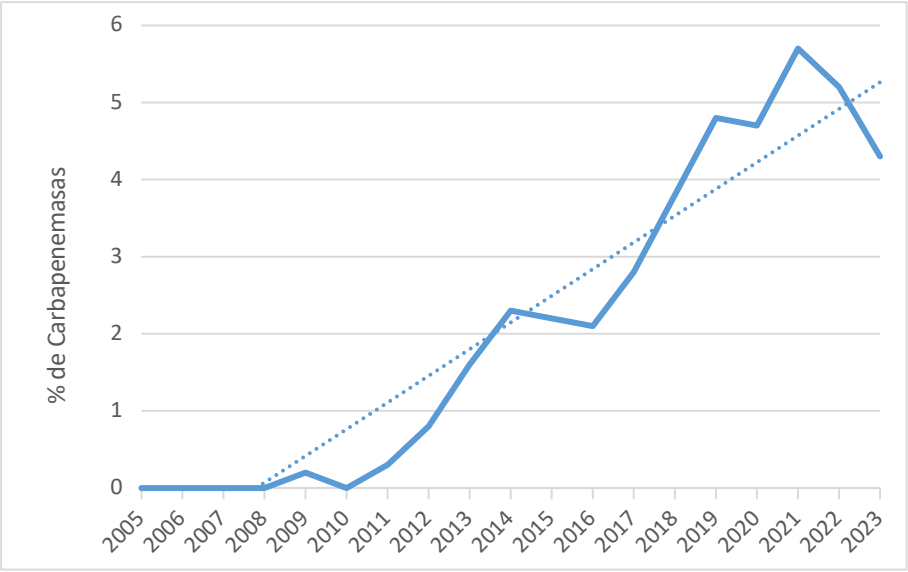


Figura 11: Tendencia de la proporción de aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasas en España entre los años 2005-2023. Extraído de (49).

Dentro de las carbapenemasas de **clase A**, la familia más representativa es la **KPC** (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (**Figura 8**). Estas enzimas fueron identificadas por primera vez en 1996 en el noreste de Estados Unidos (52). Las KPC poseen una amplia capacidad de hidrólisis, ya que pueden inactivar la mayoría de los antibióticos β-lactámicos, incluidos carbapenémicos, cefalosporinas, monobactámicos y cefamicinas. Aunque se han detectado en diversas bacterias gramnegativas, su presencia es especialmente relevante en *K. pneumoniae*, que constituye la **especie productora de KPC más prevalente a nivel mundial** (52). Las cepas productoras de KPC suelen presentar además múltiples mecanismos de resistencia adicionales como la pérdida de porinas, sobreexpresión de bombas de eflujo y

producción simultánea de otras β-lactamasas (como las BLEE), lo que las convierte en aislamientos multirresistentes y de difícil manejo clínico (53). Desde su detección en Estados Unidos, las enzimas KPC se han diseminado a nivel mundial. En el contexto europeo, Grecia destaca como uno de los países con mayor prevalencia de cepas productoras de KPC (54). En cuanto al tratamiento disponible en nuestro entorno, se cuenta con combinaciones como meropenem/vaborbactam o ceftazidima/avibactam.

Dentro de las carbapenemasas de **clase B**, las familias más relevantes son **IMP** (*Imipenemase*), **NDM** (*New Delhi metallo-β-lactamase*) y **VIM** (*Verona Integron-encoded Metallo-β-lactamase*) (**Figura 8**). La primera carbapenemasa de clase B identificada fue una enzima de la familia IMP, detectada en Japón en 1988 en una cepa de *P. aeruginosa* (55). Estas enzimas **también son conocidas como metalo-β-lactamasas (MBL**), ya que su actividad catalítica depende de la presencia de un ión de zinc en el centro activo. A diferencia de otras clases, su acción no se ve inhibida por los inhibidores clásicos de β-lactamasas, pero sí puede ser bloqueada mediante agentes quelantes de metales, como el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) o el ácido dipicolínico. Las metalo-β-lactamasas tienen la capacidad de hidrolizar la mayoría de los antibióticos β-lactámicos, incluidos carbapenémicos, cefalosporinas y cefamicinas, con la excepción de los monobactámicos. Respecto al tratamiento, puede emplearse aztreonam, dado que es un

monobactámico, o la combinación aztreonam/avibactam en caso de que la MBL coexista con una BLEE.

- Respecto a las enzimas de la familia **IMP**, su presencia es especialmente significativa en Asia, destacando en países como China y Japón (55). No obstante, IMP no es la MBL más frecuente en *K. pneumoniae*, ya que se observa con mayor frecuencia en otras especies, en particular en *P. aeruginosa*.
- En cuanto a las MBLs tipo **NDM**, la primera fue detectada en 2008 en un paciente procedente de Nueva Delhi. En la actualidad, su presencia se ha extendido a nivel mundial, aunque se considera endémica de países como India, Pakistán y Bangladesh (56). **En *K. pneumoniae*, la NDM es la MBL más frecuente**, especialmente en regiones donde su circulación es endémica, como el sur de Asia.
- Finalmente, las enzimas tipo **VIM** fueron detectadas por primera vez en 1997 en una cepa de *P. aeruginosa* aislada en un hospital de Verona, Italia (57). Al igual que las IMP, las MBLs VIM se identifican con mayor frecuencia en otras bacterias como *P. aeruginosa*. No obstante, en nuestro país se han registrado varios brotes causados por cepas de *K. pneumoniae* productoras de VIM, y un estudio ha señalado que el plásmido que codifica el gen VIM-1 parece ser endémico de España (58).

Dentro de las carbapenemasas de **clase D**, la familia más conocida es la de las **OXA-48-like** (**Figura 8**). Estas enzimas se caracterizan por un **poder hidrolítico relativamente bajo** en comparación con otras clases

de carbapenemasas, lo que puede provocar que, aunque resulte paradójico, algunas cepas parezcan sensibles *in vitro* a los carbapenémicos. Esta característica puede **dificultar su detección** en el laboratorio (59), **ya que reduce la sospecha microbiológica** de su presencia. La primera OXA-48 se detectó en Turquía en 2001 y actualmente su diseminación ha causado que sean de las carbapenemasas más frecuentes en Europa, África y Oriente Medio (50). Concretamente, es la **carbapenemasa más frecuente en España en *K. pneumoniae*** según un estudio publicado en 2023 (60). Como tratamiento, en nuestro entorno se suele emplear ceftazidima/avibactam.

1.1.4. Manifestaciones clínicas

Como se ha mencionado anteriormente, *K. pneumoniae* es una enterobacteria que, al igual que otras especies de la familia *Enterobacteriaceae*, **coloniza de forma habitual el tracto gastrointestinal humano.** No obstante, bajo determinadas circunstancias, incluyendo la inmunosupresión o la alteración de barreras anatómicas, puede comportarse como un **patógeno oportunista e invasivo**, siendo responsable de una amplia gama de manifestaciones clínicas (19,61). **En 2019**, las infecciones causadas por *K. pneumoniae* provocaron aproximadamente 790.000 muertes a nivel

global con una tasa de 10,6 muertes por cada 100.000 habitantes, posicionándose como la **quinta bacteria que causó más muertes en el mundo**, solo por detrás de *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pneumoniae* (62).

Existen diversos factores de riesgo que predisponen al desarrollo de la infección. Entre ellos destacan:

- Las **edades extremas**, como neonatos o personas mayores, que presentan respectivamente inmadurez inmunitaria e inmunosenescencia.
- Las **comorbilidades**, especialmente enfermedades como la diabetes *mellitus* y la cirrosis hepática, que comprometen la respuesta inmune del hospedador.
- Los estados de **inmunosupresión**, ya sea inducida por tratamientos inmunosupresores (por ejemplo, en pacientes con trasplante de órgano sólido) o adquirida, como en el caso del cáncer o la infección por VIH.

La importancia clínica de las infecciones por *K. pneumoniae* ha aumentado de forma considerable en las últimas décadas, debido a la aparición de cepas productoras de BLEE o carbapenemasas, lo que representa un desafío terapéutico importante debido a la limitada eficacia de los antibióticos convencionales. Entre las diversas manifestaciones que se pueden dar, las que más destacan son:

Infecciones del tracto urinario (ITU)

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran entre las infecciones bacterianas más frecuentes y constituyen un motivo común de atención médica. El riesgo de desarrollarlas está influenciado por múltiples factores, entre los que se incluyen la edad, el sexo, la presencia de comorbilidades y las alteraciones anatómicas de las vías urinarias, entre otros (63).

K. pneumoniae es la **segunda causa más común de infección del tracto urinario** (ITU) después de *E. coli* (64), y es particularmente prevalente en pacientes hospitalizados, sondados o inmunodeprimidos. En el ámbito nosocomial, *K. pneumoniae* representa alrededor del 23% de las ITU (64), mientras que en la comunidad puede alcanzar el 7% (19). No obstante, estos datos pueden variar y oscilar entre el 5 y el 53% según el estudio consultado (65). A nivel mundial, las ITU causadas por *K. pneumoniae* provocaron aproximadamente **38.700 muertes en 2019, con una tasa de 0,5 muertes por cada 100.000 habitantes** (62). Como otras bacterias uropatógenas, *K. pneumoniae* sigue un mecanismo de patogénesis que implica la ascensión desde el intestino hacia la vejiga a través de la uretra (65). Una vez en la vejiga, la bacteria se adhiere a las células del epitelio vesical mediante adhesinas, dando lugar a la cistitis (ITU de vías bajas). Entre las adhesinas más importantes de *K. pneumoniae* destacan las fimbrias tipo 1, las cuales también favorecen la formación de *biofilms*. Esta capacidad es especialmente relevante en pacientes que utilizan dispositivos

urinarios, como sondas o catéteres, ya que los *biofilms* facilitan la persistencia de la infección y dificultan su erradicación. En algunos casos, la infección puede progresar por vía ascendente hacia los riñones a través de los uréteres, provocando una pielonefritis (ITU de vías altas). Si la infección no se controla, puede avanzar hacia etapas más graves. En primer lugar, la bacteria puede llegar al torrente sanguíneo y causar una bacteriemia. Si a esto se suma una respuesta inmune sistémica del organismo, puede desarrollarse una sepsis (63).

Neumonías

Tal y como se mencionó en apartados anteriores, *K. pneumoniae* fue inicialmente aislada en pacientes que fallecían a causa de neumonías adquiridas en la comunidad. Estas infecciones eran conocidas en aquel entonces como la "neumonía de Friedländer" (66). *K. pneumoniae* representa una causa de neumonía tanto en el ámbito comunitario (adquirida fuera del entorno sanitario) como en el hospitalario o nosocomial (adquirida durante la estancia hospitalaria). Sumando ambos tipos de neumonía, se estima que **en 2019 hubo 276.000 muertes a nivel global, con una tasa de 3,8 muertes por cada 100.000 habitantes** aproximadamente (62). Las neumonías comunitarias son menos frecuentes en Europa y América, representando entre el 3 y el 5% de los casos (19). Sin embargo, su prevalencia es significativamente mayor en algunas regiones de Asia, donde pueden alcanzar hasta el 15% de los casos (19,67). Esta diferencia geográfica se atribuye, probablemente, a la mayor presencia de cepas hipervirulentas en

dichas regiones. Diversos estudios han demostrado una mayor prevalencia de cepas con cápsulas hipermucoides y sobreexpresión de los genes *rmpA* y *rmpA2* en Asia (7,14,67). Las neumonías causadas por estas cepas hipervirulentas pueden evolucionar hacia formas graves de la enfermedad, como necrosis pulmonar, formación de abscesos o neumonías necrotizantes, que con frecuencia requieren ingreso en unidades de cuidados intensivos (66,67).

Las neumonías nosocomiales causadas por *K. pneumoniae*, por otro lado, se presentan con mayor frecuencia, representando hasta el 12% de los casos de neumonías nosocomiales (64). De hecho, dentro de las infecciones nosocomiales, la neumonía es la segunda más común, solo por detrás de las infecciones del tracto urinario. Este tipo de neumonía suele desarrollarse en pacientes inmunocomprometidos, con hospitalizaciones prolongadas o que requieren soporte respiratorio, como la intubación. La hospitalización favorece la sustitución de la microbiota orofaríngea habitual, compuesta principalmente por bacterias grampositivas, por especies gramnegativas, como *K. pneumoniae*. Además de la colonización, hay una disminución de los mecanismos de defensa pulmonar (disminución del aclaramiento mucociliar, presencia de microaspiraciones, etc.) que favorece el desarrollo de neumonía (68). Finalmente, la presencia de dispositivos respiratorios facilita la adhesión bacteriana a los materiales a través de adhesinas, como las fimbrias tipo 3, lo que favorece la formación de *biofilms* y dificulta su erradicación. La neumonía nosocomial conlleva

importantes consecuencias clínicas (elevada mortalidad), asistenciales (prolonga la estancia hospitalaria y dificulta el manejo del paciente) y económicas.

Abscesos hepáticos

Los abscesos hepáticos son **causados principalmente por cepas hipervirulentas** (7,14,69,70), capaces de generar abscesos piógenos incluso en individuos previamente sanos, sin enfermedad hepática subyacente (7,70). Estas infecciones, típicamente de origen comunitario, fueron descritas por primera vez en **Asia** (69,70), donde su incidencia ha aumentado notablemente, especialmente en varones diabéticos. Actualmente, representan la principal causa de abscesos hepáticos en esta región (70), aunque también se han reportado casos en Estados Unidos (69). Una vez instaurado el absceso, estas cepas tienen una alta capacidad de diseminación metastásica, lo que puede dar lugar a complicaciones graves como endoftalmitis, meningitis, celulitis o fascitis necrosante (70).

Bacteriemia y sepsis

Una de las consecuencias más graves de la infección por *K. pneumoniae* es su diseminación a través del torrente sanguíneo, lo que puede derivar en una bacteriemia. *K. pneumoniae* constituye **la segunda causa más frecuente de bacteriemia por bacilos gramnegativos,** solo por detrás de *E. coli* (64,71), y representa aproximadamente el 8% de todos los casos de bacteriemia. La

mortalidad asociada oscila entre el 27% y el 37% (19), aunque varía ampliamente en la literatura, con cifras entre el 11% y el 81% debido a diferencias metodológicas entre los estudios (71). **En 2019, hubo 265.000 muertes globales asociadas a bacteriemia con una tasa de 3,5 muertes por cada 100.000 habitantes** (62). Entre los factores asociados a una mayor mortalidad se encuentran la edad avanzada, la presencia de neoplasias, la enfermedad hepática y el uso de tratamiento antibiótico empírico inadecuado (72). Este último aspecto cobra especial relevancia en el contexto del aumento global de cepas productoras de BLEE y carbapenemasas, que dificultan la elección de un tratamiento antimicrobiano eficaz desde el inicio. Algunos estudios han demostrado que la mortalidad asociada a una bacteriemia causada por cepas productoras de carbapenemasas es hasta cuatro veces mayor en comparación con las bacteriemias ocasionadas por cepas no productoras (71,72).

Sepsis neonatal

La sepsis neonatal es una causa importante de morbilidad y mortalidad en recién nacidos (73). La incidencia de sepsis neonatal se estima en aproximadamente **17 casos por cada 1.000 recién nacidos, lo que equivale a cerca de 6.700 muertes neonatales al día a nivel mundial** (74). *K. pneumoniae* es uno de los principales agentes etiológicos de sepsis neonatal, por detrás de *E. coli* (73–75). Entre los principales factores de riesgo se encuentran la corioamnionitis, la ruptura prematura de membranas, la prematuridad y el bajo peso al nacer

(73). Diversos estudios han demostrado que esta infección se asocia con mayor frecuencia a países en vías de desarrollo, especialmente en regiones como África y el sur de Asia (74,75).

1.2. *Streptococcus pneumoniae*

1.2.1. Historia

Los estreptococos son **bacterias grampositivas** que deben su nombre a la morfología en cadena o en parejas al observarse a través del microscopio. Existen diferentes especies de estreptococos que forman parte de la microbiota normal en seres humanos y otras tienen importancia en determinados procesos industriales como los de la industria alimentaria (76). No obstante, en este género también se encuentran diversas especies asociadas a patologías humanas de importancia, entre los que destacan *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus agalactiae*.

Existen diversos sistemas de clasificación dentro del género *Streptococcus*. Históricamente, uno de los primeros métodos se basaba en la **hemólisis que las bacterias producen al crecer en placas de agar sangre** (77). Este sistema permite clasificar los estreptococos en tres grupos (**Figura 12**):

- α-hemolíticos: Producen una lisis incompleta de los glóbulos rojos, generando un halo **verdoso** alrededor de las colonias. En este grupo se encuentran *S. pneumoniae* y *Streptococcus viridans*, entre otros.

- β-hemolíticos: Provocan una lisis completa, generando un halo **transparente** alrededor de las colonias. En este grupo se encuentran *S. pyogenes* y *S. agalactiae*, entre otros.
- γ-hemolíticos: **No generan hemólisis**. En este grupo se encuentran *Streptococcus bovis*, entre otros.

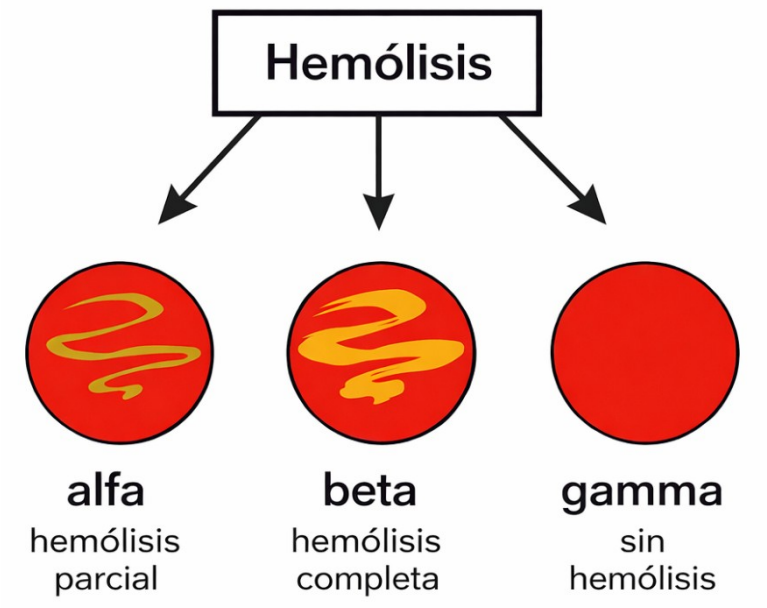


Figura 12: Clasificación de los estreptococos en función del grado de hemólisis en agar sangre. Adaptado de (78).

Posteriormente, en 1933, la microbióloga Rebecca Craighill Lancefield (1895-1981) introdujo otro sistema para clasificar los estreptococos: la **clasificación de Lancefield**. Esta clasificación se basa en la presencia de antígenos específicos en los **carbohidratos de la pared celular** (79),

permitiendo diferenciar a los estreptococos en grupos serológicos designados con letras (A, B, C, etc.).

S. pneumoniae, conocido también como **neumococo**, fue descubierto en 1881 por dos científicos de manera simultánea e independiente:

- George Miller Sternberg (1838-1915), médico del Ejército de los Estados Unidos, aisló a *S. pneumoniae* en la sangre de conejos tras inyectarles su propia saliva y lo denominó inicialmente como *Micrococcus pasteuri* (80).
- Louis Pasteur (1822-1895), químico francés, realizó un experimento similar y aisló *S*. *pneumoniae* en la sangre de conejos tras infectarlos con saliva de niños fallecidos. Lo denominó inicialmente como *microbe septicémique de la salive* (80).

Aunque inicialmente *S. pneumoniae* fue denominado con nombres distintos por cada investigador, ambos coincidieron en la descripción de un diplococo patógeno humano y con morfología ovalada y lanceolada. A partir de 1886, se empezó a denominar "pneumococcus" por el médico alemán Julius Albert Fraenkel (1864-1938) ya que lo aislaba frecuentemente en pacientes con neumonía (80). A partir de 1920 algunos estudios se referían a esta especie como *Diplococcus pneumoniae* (81). Finalmente, a partir de 1974 se denominó *Streptococcus pneumoniae* de manera oficial, adoptando la propuesta del cirujano Albert Theodor Billroth (1829-1894) a partir del griego

antiguo (streptós-kókkos: cadenas de cocos) al descubrirlos en pacientes con erisipela o en heridas infectadas (82).

1.2.2. Características y factores de virulencia

S. pneumoniae es una bacteria grampositiva, anaerobia facultativa y pertenece al filo *Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Streptococcaceae* (83). Es un estreptococo **α-hemolítico que no es agrupable según la clasificación Lancefield** (83). Se caracteriza bioquímicamente por su sensibilidad a la optoquina, lo que permite diferenciarlo de otros estreptococos α-hemolíticos (83). Su genoma tiene un tamaño que oscila entre 2,1 y 2,3 millones de pares de bases, con un genoma "core" de alrededor de 1,5 millones de pares de bases (84), y contiene alrededor de 2.200 genes (83).

Este microorganismo **coloniza el tracto respiratorio superior**, **con mayor incidencia en niños** (83,84). Se estima que entre un 5-10% de población adulta y un 20-40% de población pediátrica son portadores asintomáticos (85). El fenómeno de la colonización precede a la respuesta inmune por parte del hospedador. Por ese motivo, el estado portador suele disminuir con la edad, ya sea por haber sido expuesto al microorganismo o por la inmunización mediante las vacunas (84,85). Posteriormente a la colonización, la alteración del equilibrio entre

S. pneumoniae y el hospedador puede dar lugar a la infección, siendo la **enfermedad neumocócica invasiva (ENI)** la de mayor mortalidad.

En el proceso de infección, el neumococo posee diversos factores de virulencia que le permiten invadir tejidos estériles y pasar de colonizador a agente infeccioso. Entre los principales se encuentran: la cápsula polisacárida, la neumolisina, los ácidos teicoicos/lipoteicoicos, las proteínas de unión a la colina, las proteínas LPXTG y las lipoproteínas. Se describen en detalle a continuación:

A) **Cápsula polisacárida**

Se trata de una estructura compuesta por **polisacáridos** ramificados, cuyos esqueletos están formados por unidades repetidas de entre uno y seis monosacáridos (86). Los genes responsables de la síntesis de la cápsula están localizados en el locus *cps*, situado en la región del genoma comprendida entre los genes *aliA* y *dexB* (84). En la parte inicial de este locus se localizan los genes *cpsABCD,* que participan en la regulación de dicha síntesis.

Desde los primeros estudios realizados en 1970, ya se consideraba que la cápsula es el **principal e indispensable factor para la virulencia** de *S. pneumoniae*. Esta contribuye a procesos claves en la patogénesis de *S. pneumoniae* que se detallan a continuación (86):

- Permite evadir la acción de los residuos de ácido siálico presentes en el epitelio nasal, favoreciendo la posterior colonización.

- Reduce la acción de las inmunoglobulinas y el sistema complemento del hospedador.
- Reduce la opsonización interfiriendo en el reconocimiento de los fagocitos.
- Evade el sistema inmune mediante fenómeno “capsule switch”; *S. pneumoniae* adquiere material genético de otros neumococos y los incorpora en su propio genoma mediante recombinaciones. Este proceso se ve favorecido por la presencia de secuencias de inserción que flanquean el locus *cps*, facilitando su movilización e integración.

Las diferencias en la **composición y estructura de la cápsula polisacárida determinan los serotipos capsulares**. Actualmente, existen dos sistemas de nomenclatura para los serotipos: la americana y la danesa, siendo la danesa la más empleada ya que es la adoptada por la OMS. Hasta la fecha, hay más de 100 serotipos diferentes caracterizados (84,87).

Los distintos serotipos presentan distinta capacidad invasiva y de evasión inmunitaria (86). Según el último informe del ECDC publicado en 2025, los serotipos más prevalentes causantes de la ENI en Europa son el 3, 4, 6C, 8, 9N, 11A, 15A, 19A, 22F, 23A y 23B (88). En conjunto, estos once serotipos causaron el 73,9% de los casos de ENI notificados en 2022 en Europa (88). En un estudio realizado en Cataluña entre los años 2018 y 2022, con una cohorte de 220 casos de ENI, los serotipos

más prevalentes fueron el 3, 8, 10A, 19A, 23B y 24F, **destacando el serotipo 3** como el más frecuente (**Figura 13**).

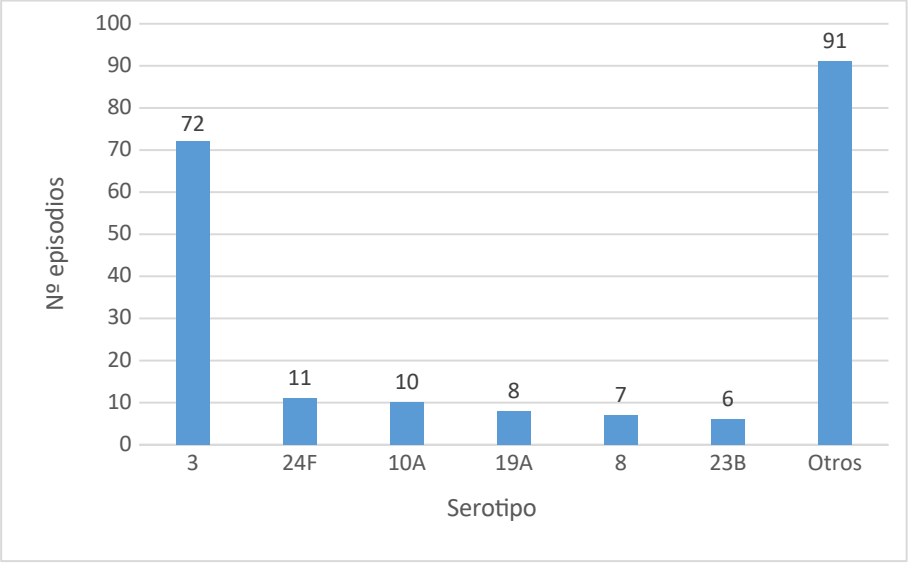


Figura 13: Distribución de serotipos observados en la cohorte de Cataluña desde 2018 a 2022. Extraído de (89).

Por otro lado, se han descrito cepas con mayor propensión a causar meningitis, aunque varían según país y cobertura vacunal de cada región. Según un estudio publicado en 2020 en Madrid, los serotipos más frecuentemente asociados a casos de meningitis fueron 10A, 11A, 19F, 23A, 23B, 24F y 35F (90).

Finalmente, se han descrito serotipos que presentan mayor resistencia a determinados antibióticos. Según un estudio realizado con cepas de neumococo en Barcelona, los serotipos más frecuentemente asociados a resistencias a β-lactámicos fueron el 9V, 11A y 14 (91).

Existen diversas técnicas para determinar el serotipo capsular de *S. pneumoniae*:

1. **Reacción de *Quellung***: También denominada reacción de Neufeld, descrita por Friedrich Neufeld, se basa en la reacción que ocurre al poner en contacto la bacteria con un antisuero que contiene anticuerpos específicos frente a un determinado serotipo capsular, lo que provoca un hinchazón capsular **visible** en un microscopio de contraste (de ahí el nombre *Quellung*, que significa hinchazón en alemán). Se trata del método ***gold standard*** por su sensibilidad y especificidad. No obstante, es laboriosa, requiere la disponibilidad de todos los antisueros y de personal técnico cualificado, por lo que se limita a centros de referencia (92–94).

2. **PCR Multiplex**: Se amplifican **genes del locus *cps*** mediante una reacción en cadena de la polimerasa. Los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) disponen de un protocolo estandarizado (95) que, posteriormente, se ha ido optimizando por distintos autores (93,94). Es un método rápido, pero con menor poder discriminativo y menor especificidad que el *Quellung* ya que no detecta todos los serotipos y puede dar reacciones cruzadas con otros estreptococos α-hemolíticos (95).
3. **Amplificación y secuenciación del gen *cpsB***: Este método es similar al anterior, pero **se amplifica únicamente el gen *cpsB*** y

se compara su secuencia con una base de datos de referencia. Fue establecido en 2012 (96) y es un método simple y económico. Sin embargo, es un método **poco preciso** ya que la base de datos de GenBank de referencia no se encuentra revisada ni validada (92).

4. **WGS**: Son las técnicas con **mayor poder resolutivo** para el serotipado, ya que permiten detectar todos los serotipos descritos mediante el **análisis del genoma bacteriano completo**. Asimismo, posibilitan la identificación de serotipos potencialmente nuevos mediante el análisis informático de la secuencia del locus *cps*, que podrían no ser detectados mediante técnicas como la PCR multiplex (al depender estas del uso de cebadores dirigidos a secuencias específicas previamente conocidas) (97). En la literatura se han descrito programas bioinformáticos validados para el serotipado de *S. pneumoniae* como PneumoCAT y SeroBA (97,98). Aunque hay países como el Reino Unido que han reportado buena experiencia con WGS (99), es una metodología costosa que requiere de recursos computacionales, conocimientos experimentales y bioinformáticos, y que suele tener un mayor tiempo de respuesta. El conjunto de limitaciones hace que, en general, esta técnica no sea implementada en la rutina de los laboratorios clínicos de microbiología para este fin (98).

B) **Neumolisina**

Se trata de una **citolisina** dependiente del colesterol presente en la membrana de las células del hospedador. Se encuentra presente en todas las cepas de *S. pneumoniae* y su síntesis se regula por el gen *ply* (84). A nivel estructural, está compuesta por cuatro dominios, nombrados de D1 a D4 (100,101). Una vez que la neumolisina se une a la membrana plasmática, entre 30 y 50 monómeros se ensamblan para formar complejos oligoméricos que generan **poros transmembrana** en la bicapa lipídica (**Figura 14**). La formación de estos poros provoca un **desequilibrio iónico**, lo que conlleva disfunción mitocondrial y la muerte celular (100–102).

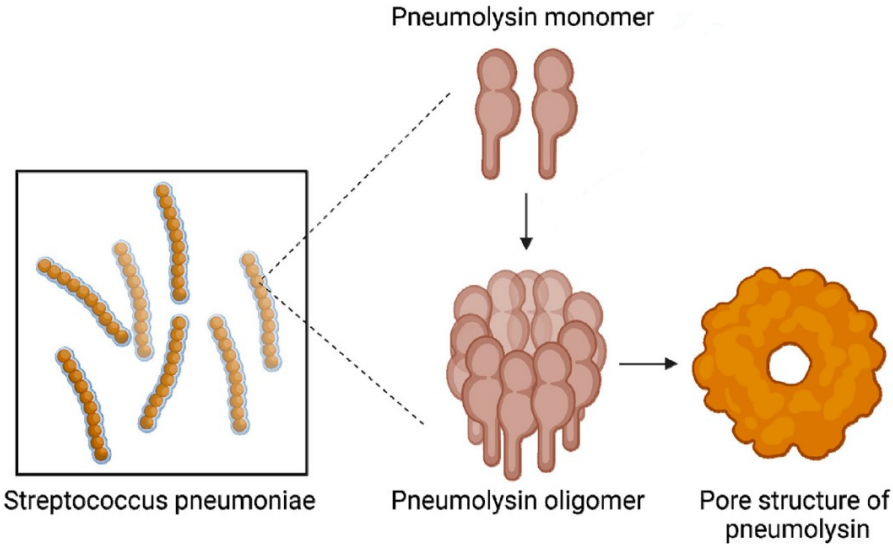


Figura 14: Mecanismo de acción de la neumolisina. Adaptado de (103).

Mediante el mecanismo descrito, la neumolisina contribuye en la patogénesis del neumococo favoreciendo la **adherencia** y colonización

del epitelio nasofaríngeo y la aparición de infecciones locales. Asimismo, al inducir la **disrupción** de las barreras epiteliales y endoteliales facilita la diseminación sistémica del microorganismo y el desarrollo de infecciones invasivas (101).

C) **Ácidos teicoicos y lipoteicoicos**

Ambos tipos de ácidos desempeñan una **función estructural** y contienen residuos de colina en forma de fosforilcolina (104). Estos residuos resultan esenciales para la unión no covalente de diversas proteínas de superficie que contribuyen a la adherencia y a la evasión inmune del neumococo (84) (véase el apartado D a continuación). Adicionalmente, se ha demostrado que la fosforilcolina de la superficie celular de *S. pneumoniae* se une al receptor del factor activador de plaquetas, induciendo así la respuesta inflamatoria (84).

D) **Proteínas de unión a la colina**

Estas proteínas de superficie se encuentran ancladas en la pared celular mediante la interacción con los residuos de colina de los ácidos teicoicos (84). Por este motivo, se conocen como proteínas de unión a la colina (en inglés, *choline-binding proteins*, CBPs). Cumplen funciones clave en la **adhesión y evasión inmune**. Entre las más relevantes se encuentran la proteína PspC (también denominada CbpA), la PspA y las hidrolasas LytA, LytC y CbpD (84,105) (106) (107).

E) **Proteínas LPXTG**

Se trata de proteínas de superficie que contienen motivos LPXTG (leucina, prolina, un aminoácido variable, treonina y glicina) en su dominio C-terminal. Son enzimas que reconocen dicho motivo y catalizan la unión covalente de estas proteínas al peptidoglicano de la pared celular bacteriana (84). Entre las proteínas LPXTG más relevantes se encuentran la **neuraminidasa NanA**, que facilita la adhesión del neumococo al epitelio respiratorio mediante la eliminación de residuos de ácido siálico de la superficie celular del hospedador y las proteínas RrgA, RrgB y RrgC, que actúan como adhesinas y favorecen la colonización y la invasión endotelial (84,108). Concretamente, RrgA contribuye a la unión del neumococo al endotelio de la barrera hematoencefálica y facilita la entrada del microorganismo al sistema nervioso central (108).

F) **Lipoproteínas**

Actúan como proteínas transportadoras que participan en la captación de nutrientes y contribuyen a la invasión epitelial (84,109). A su vez, son reconocidas por los receptores TLR2 de los macrófagos, lo que desencadena una respuesta inmune por parte del hospedador (109).

1.2.3. Clínica

En la actualidad, *S. pneumoniae* es responsable de más de 300.000 muertes anuales en niños menores de cinco años, así como de más de 690.000 muertes en adultos mayores de 70 años a nivel mundial (110). Se estima que en 2016 fue responsable de cerca de 1,2 millones de muertes (84). **En 2019, *S. pneumoniae* fue la cuarta bacteria que causó más muertes a nivel global,** solo por detrás de *M. tuberculosis*, *S. aureus* y *E. coli* (62). Gran parte de esta mortalidad se debe a las formas invasivas de la ENI, manifestadas como neumonía, sepsis o meningitis. En 2019, *S. pneumoniae* fue el patógeno asociado con el mayor número de muertes en menores de 5 años (62).

Los factores de riesgo que predisponen a desarrollar una infección grave por neumococo son (84):

- **Edad** menor a 5 años o edad superior a 65 años.
- **Inmunosupresión** debido a inmunodeficiencias congénitas o adquiridas (neoplasias, virus de la inmunodeficiencia humana, etc.).
- Presencia de **comorbilidades**: destacan la diabetes (111), las enfermedades pulmonares crónicas, las hepatopatías y la enfermedad renal crónica.

- Infecciones virales previas: destaca la infección previa por el virus de la gripe A, ya que daña el epitelio pulmonar, reduce el aclaramiento mucociliar y disminuye la capacidad de respuesta del sistema inmune (112).

En Europa, se reportaron 17.700 casos de ENI en 2022, habiendo 13,4 casos por cada 100.000 habitantes en menores de un año y 12,6 casos por cada 100.000 habitantes en mayores de 65 años (88). En la **Figura 15** se detalla la incidencia de ENI en Cataluña de 2018 a 2022.

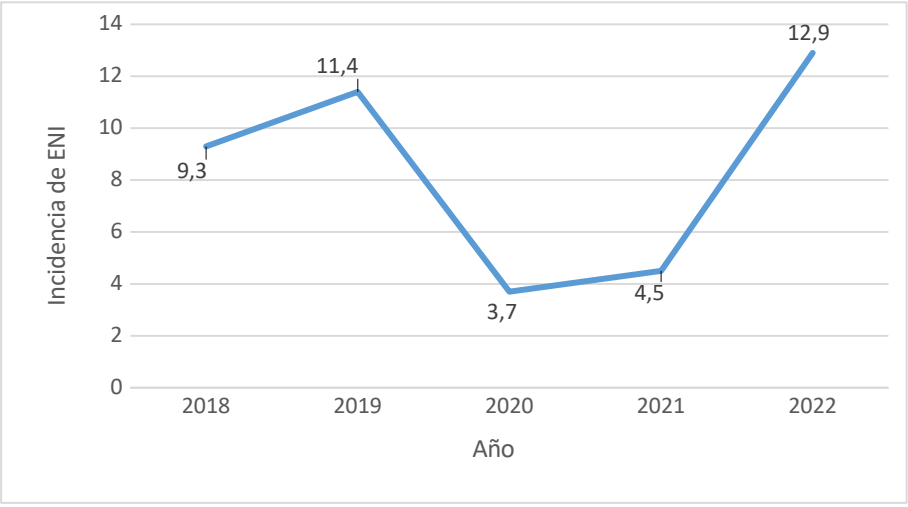


Figura 15: Incidencia de ENI en Cataluña en menores de 18 años por cada 100.000 habitantes. Se observa un descenso significativo en los años 2020 y 2021, coincidiendo con la pandemia de COVID-19, probablemente como resultado de las medidas de aislamiento y uso de mascarillas. Extraído de (89).

Con respecto a los cuadros clínicos producidos por el neumococo, al tratarse de un patógeno oportunista, puede causar un amplio espectro de enfermedades. Dichos cuadros comprenden desde infecciones

locales leves (como otitis o conjuntivitis) hasta formas graves, como neumonías o meningitis (**Figura 16**).

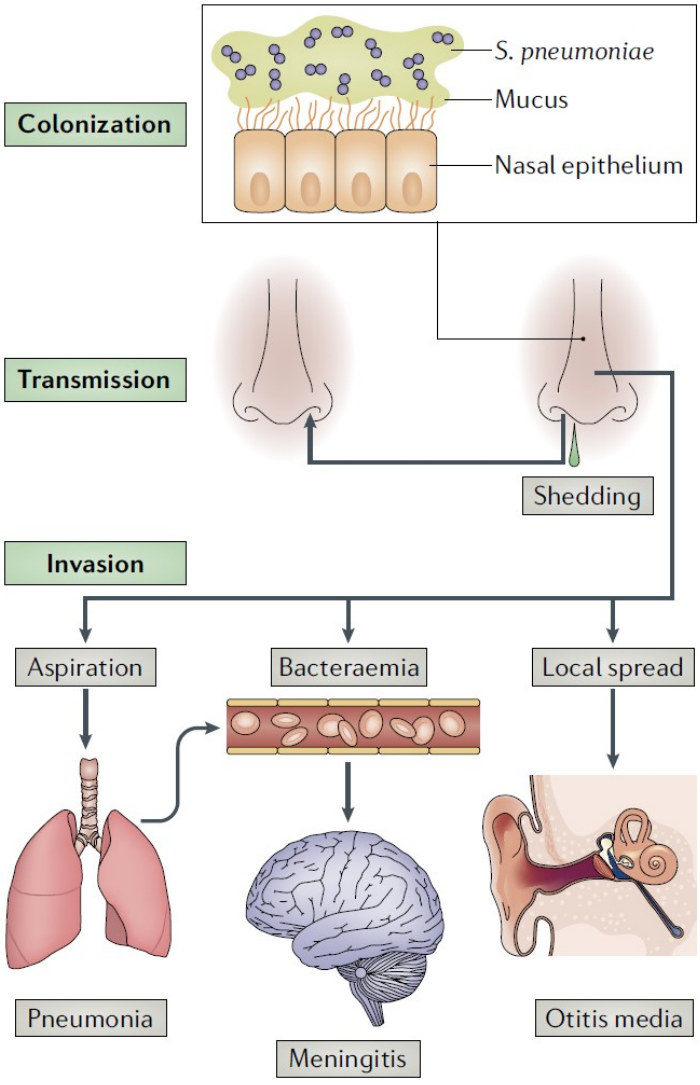


Figura 16: Colonización, transmisión y cuadros clínicos principales que puede producir *S. pneumoniae*. Extraído de (108).

Infecciones del tracto respiratorio superior

Las infecciones del tracto respiratorio superior constituyen las formas más frecuentes de enfermedad neumocócica no invasiva y suelen originarse por extensión local desde la nasofaringe tras la colonización previa, incluyendo principalmente **la otitis media y la sinusitis**.

La otitis media es una de las principales causas de consulta pediátrica y se manifiesta habitualmente con dolor otológico, fiebre, otorrea e irritabilidad. Aunque existen otitis de etiología viral, dentro de las etiologías bacterianas representa el agente etiológico más frecuente, representando unos 300 millones de casos anuales a nivel mundial (113,114). En casos de progresión, la infección puede extenderse a estructuras adyacentes y dar lugar a complicaciones como mastoiditis o meningitis.

En cuanto a la sinusitis (denominada también rinosinusitis), se define como una inflamación de los senos paranasales y se caracteriza por presentar una congestión nasal, rinorrea, dolor facial y halitosis (115). Aunque la etiología suele ser viral, el neumococo es uno de los principales agentes implicados en las sinusitis de etiología bacteriana. Suelen ser infecciones leves, pero pueden originar complicaciones orbitarias o intracraneales debido a la proximidad anatómica con estas estructuras (116).

Neumonía

Es la **forma más prevalente de ENI**. En adultos, el neumococo constituye la **principal causa de neumonía adquirida en la comunidad** (111). Las neumonías adquiridas en la comunidad (NAC) representan una importante carga de morbimortalidad en la población; en 2017, las neumonías por neumococo causaron más de 1 millón de muertes (117). En Europa, un metaanálisis ha atribuido al neumococo una proporción significativa de las neumonías comunitarias, tanto en los casos tratados de forma ambulatoria como en aquellos que requieren hospitalización o ingreso en unidades de cuidados intensivos (118).

Diversos estudios han demostrado una asociación entre infecciones virales, como la gripe o la COVID-19, y el desarrollo de neumonía neumocócica, siendo la coinfección viral un importante factor de riesgo (111). Estas infecciones virales reducen el aclaramiento mucociliar, exponen los receptores celulares (la neuraminidasa viral remueve los residuos de ácido siálico de las células), exacerban la inflamación y reducen la respuesta inmune (112).

Bacteriemia

S. pneumoniae se encuentra **entre los 10 principales microorganismos causantes de bacteriemias a nivel mundial** (119). Una vez que el neumococo invade el torrente sanguíneo puede desencadenar una disfunción multiorgánica y/o hemodinámica dando lugar a un cuadro de sepsis (120).

A nivel global, se estima que en 2019 hubo unas 125.000 bacteriemias causadas por *S. pneumoniae* en conjunto con una tasa de mortalidad de 1,6 muertes por cada 100.000 habitantes (62). En Cataluña, de una cohorte de 220 casos de ENI producidas entre 2018 a 2022, hubo 29 casos de bacteriemias (13,2% de los casos) (89) mientras que otros estudios reportan una incidencia de hasta el 30% (121).

Meningitis

A pesar de las estrategias vacunales existentes, ***S. pneumoniae*** **continúa siendo la primera causa de meningitis bacteriana a nivel mundial** (122–124). Es una de las formas más graves de la ENI (la mortalidad de los casos es alrededor de un 20%) y se estima que tiene una incidencia anual de 300.000 casos a nivel mundial con una mortalidad asociada de 40.000 muertes en el año 2017 (123,124). En un estudio nacional publicado en 2020 con 639 casos de ENI, las meningitis neumocócicas representaron el 11,4% de los casos y los serotipos más frecuentemente detectados fueron el 3, el 8 y el 24F (125).

La invasión al sistema nervioso central ocurre a través de la barrera hematoencefálica, generalmente desde los vasos meníngeos o corticales, y participan diversas proteínas (CbpA, neumolisina y RrgA), receptores endoteliales específicos (pIgR y PECAM-1), citoquinas inflamatorias y diversas interleucinas (**Figura 17**) (122,124).

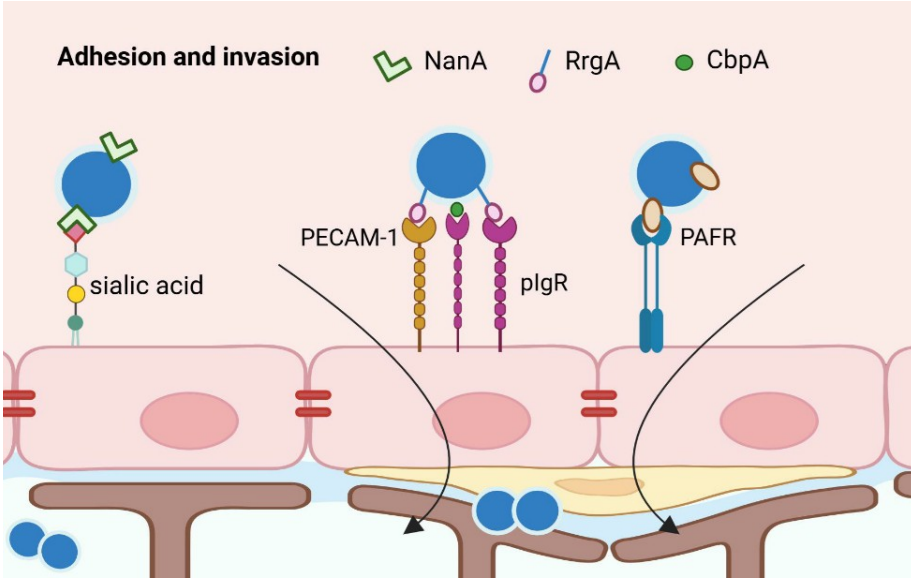


Figura 17: Endocitosis de *S. pneumoniae* al sistema nervioso central gracias a sus diferentes factores de virulencia y receptores asociados. Adaptado de (124).

A finales del siglo XIX, en determinados pacientes se observaba una concurrencia de neumonía, meningitis y endocarditis. Esta asociación fue descrita inicialmente por el anatomista austriaco Richard L. Heschl (1824-1881), lo que hizo que se llamase **Síndrome de Austrian** en su honor (121).

Otras infecciones invasivas

Además de estas manifestaciones invasivas descritas, el neumococo ha sido implicado, aunque menos frecuentemente, en **endocarditis, peritonitis y artritis séptica** (121).

- Endocarditis: Representan entre el 1 y el 3% de las endocarditis infecciosas (126,127). En la mayoría de los casos, se presentan en

el contexto de una neumonía o una meningitis (Síndrome de Austrian) (126,127).

- Peritonitis: Suelen presentarse en pacientes con patología hepática de base, especialmente en aquellos con cirrosis hepática, y generalmente se manifiestan como peritonitis primarias (translocación bacteriana desde el lumen gastrointestinal hacia las cavidades extraintestinales). Representan alrededor del 3% de peritonitis primarias (128).

- Artritis séptica: Representa alrededor del 2 al 8% de los casos de artritis séptica (129,130). La mayoría de las artritis neumocócicas tienen un origen hematógeno, es decir, no se deben a una inoculación directa en la articulación. Por esta razón, las guías clínicas recomiendan investigar la presencia de un foco primario que haya permitido la diseminación del microorganismo hacia la articulación (130).

1.2.4. Vacunas

Debido a que la exposición a un serotipo determinado genera una respuesta inmune, la vacunación se ha establecido como una **estrategia fundamental para disminuir la incidencia de la ENI.** No obstante, la gran diversidad de serotipos circulantes en cada país supone un desafío a la hora del desarrollo de vacunas efectivas, ya que

la inmunidad adquirida frente a un serotipo no confiere protección frente a otros. Por esta razón, **conocer la prevalencia y la epidemiología de los serotipos que circulan en cada región es fundamental para el desarrollo de vacunas** frente a los serotipos predominantes (97). Disponer de una **metodología rápida para el tipado de la cápsula**, aplicable en la rutina asistencial de un laboratorio clínico de microbiología, resultaría de gran valor, ya que permitiría obtener de forma ágil el serotipo de *S. pneumoniae* y contribuir de manera más eficiente a la vigilancia epidemiológica y vacunal.

A lo largo de las últimas décadas, las vacunas frente al neumococo han ido experimentando diversos cambios. **Las primeras vacunas disponibles fueron de tipo polisacárido**, abreviadas como PPSV23 (del inglés *pneumococcal polysaccharide vaccine*) o PPV23 (del inglés *23-valent pneumococcal vaccine*). Estas vacunas incluían hasta 23 serotipos, pero su limitada inmunogenicidad en poblaciones vulnerables y la falta de inducción de memoria inmunológica impulsaron el desarrollo de **vacunas conjugadas**, abreviadas como PCV (del inglés *pneumococcal conjugate vaccine*) (84). Las vacunas conjugadas se obtienen uniendo los polisacáridos capsulares a diferentes proteínas transportadoras, generalmente derivadas de toxinas. Al conjugar el antígeno polisacárido con la proteína transportadora, se induce una **respuesta inmune superior** ya que esta es T-dependiente, genera memoria inmunológica y genera anticuerpos más duraderos (131). La incidencia de la ENI se ha

reducido de manera significativa con las vacunas conjugadas antineumocócicas. Para finales del 2020, 148 de los 194 estados miembros de la OMS ya habían incorporado las vacunas antineumocócicas en su calendario vacunal (110). En la **Tabla 1** se detallan las diferentes vacunas actualmente en uso a nivel mundial para *S. pneumoniae*.

Tipo	Nombre	Compañía	Año de autorización y región	Serotipos incluidos
PPSV23	Pneumovax 23	Merck Sharp & Dohme	1983, Estados Unidos	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F y 33F
PPV23	PPV23	Sinovac	2020, China	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F y 33F
PCV10	Synflorix	GlaxoSmithKline	2009, Europa	1, 4, 5, 6B,

		Pharmaceuticals		7F, 9V, 14, 18C, 19F y 23F
PCV10	Pneumosil	Serum Institute of India	2019, India	1, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 19A, 19F y 23F
PCV13	Prevnar 13	Pfizer	2019, Estados Unidos	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F y 23F
PCV14	PCV14	BioE	2022, India	1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F
PCV15	Vaxneuvance (V114)	Merck Sharp & Dohme	2021, Estados Unidos	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F
PCV20	Prevnar 20 (Apexxnar)	Pfizer	2021, Estados Unidos	1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 8, 9V, 10A, 11A,

				12F, 14, 15B, 18C, 19A, 19F, 22F, 23F y 33F

Tabla 1. Vacunas en uso actualmente y serotipos incluidos. Adaptado de (84).

En España, la primera vacuna conjugada que se introdujo fue la PCV7, en el año 2001 (**Figura 18**). Esta vacuna incluía siete serotipos y solamente estaba financiada para la población infantil con factores de riesgo para ENI. En 2010 fue reemplazada por la vacuna PCV13 (**Figura 18**), la cual ampliaba la cobertura vacunal incluyendo los serotipos 1, 3, 5, 6A, 7F y 19A respecto a la PCV7, aunque el criterio de financiación público se mantuvo. No fue hasta el 2016 que se introdujo la vacuna PCV13 de manera sistemática en el calendario vacunal infantil (89,132).

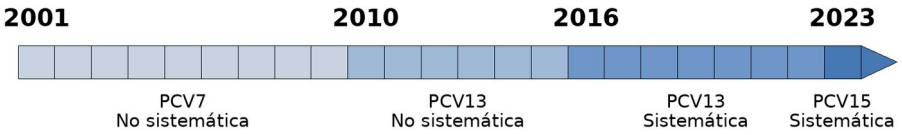


Figura 18: Cronología de las vacunas en pediatría implementadas en Cataluña hasta 2023. Adaptado de (89).

Curiosamente, aunque en Cataluña se contemple la cobertura frente al serotipo 3 con la vacuna PCV13, tal y como se observa en la **Figura 13**, el serotipo 3 sigue siendo el más frecuente en las ENI. Diversos estudios sugieren que la respuesta inmune inducida por PCV13 frente al serotipo 3 es insuficiente, ya que no logra generar unos niveles de

anticuerpos adecuados en la población pediátrica (89). Por ese motivo se actualizaron las estrategias vacunales y, desde 2023, en la población infantil se emplea la vacuna PCV15, ya que parece que esta vacuna ofrece mejor respuesta inmunológica contra el serotipo 3 (89), mientras que en la población adulta con condiciones de riesgo se emplea la PCV20 (133).

La implementación de las vacunas conjugadas ha dado lugar a un fenómeno epidemiológico conocido como **reemplazo de serotipos** (84), en el cual disminuye la circulación de los serotipos incluidos en la vacuna, pero aumenta la prevalencia de cepas no cubiertas por ella. Se trata de un **fenómeno dinámico que obliga a realizar cambios periódicos de las formulaciones de las vacunas** para incluir los serotipos más prevalentes en cada momento, dado que la presión selectiva favorece la emergencia de nuevos serotipos no contemplados inicialmente. En España este fenómeno se observó entre 2001 y 2010, la vacuna PCV7 redujo los casos de ENI por los siete serotipos incluidos, pero aumentaron los casos de los serotipos no incluidos, por lo que se tuvo que reformular la vacuna a trece serotipos y se introdujo la vacuna PCV13 (89). Este fenómeno "cíclico" ha impulsado la necesidad de explorar otras estrategias centradas en el desarrollo de vacunas "serotipo-independientes". Entre las más prometedoras se encuentran aquellas basadas en proteínas conservadas del neumococo (como PspA, PspC o Ply), vesículas de

membrana bacteriana que contienen múltiples antígenos, y vacunas de célula entera atenuada (84).

1.3. *Enterococcus faecium*

1.3.1. Historia

Los enterococos son bacterias **grampositivas** con morfología de cocos dispuestos en parejas o cadenas. Suelen ser microorganismos que **habitan en el tracto gastrointestinal** de animales y el ser humano y actúan como especie comensal, formando parte de nuestra microbiota (134,135). Se considera que este género bacteriano tiene un origen muy antiguo, estimado en alrededor de 500 millones de años, coincidiendo con la aparición de los primeros organismos multicelulares y sus sistemas digestivos. Esta larga historia evolutiva ha contribuido a su notable capacidad de adaptación a diversos ambientes (135,136). Se trata de un género descubierto de manera simultánea e independiente por dos investigadores en ese mismo año:

- M. E. Thiercelin, científico francés, aisló el microorganismo en el tracto gastrointestinal humano y le atribuyó el término *Entérocoque* para remarcar el origen entérico. Posteriormente, observó que su aislamiento era predominante en pacientes con diarrea, en quienes la bacteria podía translocarse desde el intestino hacia la sangre, provocando bacteriemia y, en algunos casos, sepsis (137,138).
- William George MacCallum (1874-1944), médico norteamericano, halló la bacteria en la sangre de un paciente de 37 años que falleció

por una endocarditis. Inicialmente la bautizó como *Micrococcus zymogene*s y, actualmente, se ha rebautizado como *Enterococcus faecalis*. Sus publicaciones describieron que se trataba de una bacteria particularmente resistente a las condiciones ambientales, característica que hoy en día sigue siendo distintiva del género *Enterococcus* spp. (138,139).

En 1906, Sir Frederick William Andrewes (1859-1932), médico inglés, junto con su colaborador T. J. Holder, describieron una bacteria de origen fecal a la que denominaron *Streptococcus faecalis* para destacar su asociación con el intestino humano (140).

En 1919, el investigador danés Sigurd Orla-Jensen (1870-1949), en el contexto de sus estudios sobre fermentación láctica, identificó una especie con un patrón fermentativo distinto, a la que denominó *Streptococcus faecium* (141). Sin embargo, no fue hasta 1960 que se reconoció esta especie de manera oficial como tal (139).

En 1935, los investigadores James Morgan Sherman (1890-1956) y Helen U. Wing describieron una nueva especie con una fermentación diferente a *S. faecalis* y *S. faecium* y la bautizaron como *Streptococcus durans* (142).

Así pues, durante varias décadas, los enterococos permanecieron clasificados dentro del género *Streptococcus*, y fueron categorizados como estreptococos del grupo D de Lancefield (138). No fue hasta 1970 que se propuso crear formalmente el taxón *Enterococcus* como

un género separado (143). Esta propuesta fue aceptada en el año 1984, cuando **estudios de secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S demostraron que *S. faecalis* y *S. faecium* presentaban diferencias genéticas suficientes para separarse del género *Streptococcus*, lo que llevó a su reclasificación definitiva como el género *Enterococcus*** (144). De hecho, a través de análisis 16S, se ha observado que el género *Enterococcus* está filogenéticamente más relacionado con los géneros *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* que con los géneros *Streptococcus* o *Lactococcus*, a pesar de que históricamente se clasificaban dentro del mismo grupo (139).

Hasta el 2024, se han identificado más de 60 especies de enterococos, siendo *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* las especies más predominantes en el intestino del ser humano (145). Concretamente, estas dos especies representan más del 90% de los aislamientos clínicos de este género (134). **Desde el punto de vista nosocomial y en términos de resistencia a los antibióticos, *E. faecium* representa un problema significativamente mayor en comparación con otras especies del género** (134,135,138). Por esta razón, la presente tesis se centra específicamente en esta especie.

1.3.2. Características y factores de virulencia

Los enterococos pertenecen al filo *Bacillota*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Streptococcaceae* (146). Desde el punto de vista metabólico, se trata de un género de microorganismos anaerobios facultativos no esporulados, con una temperatura de crecimiento óptima de 35 °C, aunque su rango de crecimiento abarca de 10 a 45 °C. Son capaces de crecer en presencia de cloruro sódico al 6,5%, hidrolizan la esculina en presencia de sales biliares y son catalasa negativa (aunque algunas especies producen catalasa incompleta) (139). Estas características metabólicas y bioquímicas han sido aprovechadas históricamente como herramientas diferenciales para distinguir a los enterococos de otros estreptococos en estudios microbiológicos (147). A su vez, la capacidad de sobrevivir en medios hipertónicos o hipotónicos, el amplio rango de temperaturas de crecimiento y la tolerancia a un intervalo de pH amplio de 4,4 hasta 9,6 contribuyen significativamente a la **resistencia de la bacteria frente a condiciones ambientales adversas** (135).

E. faecium presenta un genoma de aproximadamente 2,9 millones de pares de bases (135), el cual alberga unos 3.000 genes (148). Gracias a los estudios genómicos, se han identificado dos poblaciones principales de *E. faecium*, denominadas **clado A y clado B**:

- **Clado A**: incluye cepas tanto de origen clínico como animal, y se subdivide en A1 y A2, aunque la delimitación precisa entre ambos subclados aún requiere estudios más exhaustivos. Se estima que su divergencia ocurrió hace aproximadamente 70–80 años, coincidiendo con la introducción de los antibióticos en la medicina moderna, lo cual pudo haber impulsado esta diferenciación evolutiva (136). El clado A1 también se conoce como **complejo clonal 17** (abreviado **CC17**; véase definición de complejo clonal en el apartado 1.5.3 de esta tesis) y está constituido por cepas clínicas humanas, que presentan un mayor tamaño del genoma, así como una tasa más elevada de mutaciones espontáneas y una abundancia superior de elementos genéticos móviles. Estas características contribuyen a su **mayor resistencia a los antibióticos** y explican su frecuente **asociación con infecciones del ámbito hospitalario** (136,149,150). Por otra parte, el clado A2 está asociado principalmente a cepas de origen animal, con genomas más pequeños, menor carga de elementos móviles y menor resistencia a los antibióticos (136,150).
- **Clado B**: Tradicionalmente se consideraban cepas del entorno comunitario, no obstante, también se han identificado aislamientos clínicos dentro de este grupo, lo que ha llevado a cuestionar su definición "clásica" (136). Además, algunos estudios genómicos recientes han propuesto reclasificar el clado B como *Enterococcus lactis* (135).

La definición clásica de los clados A1, A2 y B en *E. faecium* ha sido objeto de debate, ya que diversos autores sostienen que no se trata de linajes estáticos (135,150), sino de poblaciones dinámicas en constante evolución. En este contexto, un estudio global publicado en 2022 analizó 1.128 genomas de *E. faecium* provenientes de 34 países, y encontró que el 88% de los genomas correspondían al clado A1, el 8% al clado A2 y el 4% al clado B. No obstante, un hallazgo relevante del estudio fue que detectaron presencia de genomas híbridos en algunos aislados, es decir, cepas cuyo genoma contenía material genético procedente de más de un clado. Estos resultados difuminan la definición clásica de los clados A1, A2 y B. Además, los autores concluyen que el clado A1 surgió evolutivamente a partir del clado A2, y que existe un flujo genético en forma de recombinación genética continuo entre ambos (150). Para la redacción de esta tesis, se mantendrá el uso de las nomenclaturas tradicionales de los clados A1, A2 y B, con el fin de facilitar la comparación con la literatura publicada y los antecedentes históricos.

De manera similar a *K. pneumoniae*, *E. faecium* también **dispone de su esquema de tipificación MLST**. El esquema fue publicado por Homan *et al*. en 2002 y se basa en el análisis de las secuencias de siete genes de *E. faecalis* disponibles en ese momento: *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS* y *adk* (151). A fecha de la redacción de esta tesis se han publicado más de 2.750 ST (152).

A partir del 2023 se propuso un nuevo esquema MLST desarrollado por Bezdíček *et al*. (153) analizando también siete genes (*nanB*, *dnaE*, *pbp2b*, *urvA*, *copA*, *mdlA*, *rpoD*) y una posible adhesina hipotética (proteína HP), que presentaría una capacidad discriminatoria superior al esquema tradicional de 2002, lo que permitiría observar diferencias genéticas entre cepas que antes no eran detectables. Así, esta mayor resolución podría mejorar la precisión de los estudios epidemiológicos en el contexto hospitalario (153). No obstante, a pesar de sus ventajas, es un esquema menos utilizado por razones históricas y puede generar confusión entre estudios si no usan la misma metodología. Al ser un esquema más reciente y menos utilizado en la comunidad científica, se utilizará el esquema MLST de Homan *et al*. (2002) en el transcurso de esta tesis. A fecha de la redacción de esta tesis se han publicado unos 1.200 ST según el esquema de Bezdíček *et al*. y más de 2.700 según el esquema de Homan *et al.* (152).

Entre los distintos mecanismos de resistencia antibiótica, destacan especialmente las cepas portadoras de genes de resistencia a la vancomicina, dado que este antibiótico constituye el tratamiento de elección frente a *E. faecium*. **La OMS clasifica las cepas de *E. faecium* resistente a vancomicina como "*High group*" en la "*Priority Pathogens List"*** publicada en 2024 (45). Debido a su importancia clínica, se detallará la resistencia a la vancomicina en un apartado específico más adelante.

Respecto a los factores de virulencia de *E. faecium*, a diferencia de otras bacterias grampositivas como *S. pneumoniae*, se centran en la adhesión y persistencia ambiental. Se detallan a continuación:

A) **Cápsula, ácidos teicoicos y lipoteicoicos**

Los tres componentes desempeñan un papel clave en la **resistencia a la fagocitosis, la formación de *biofilm* y la adhesión a las células del hospedador** (135). En particular, la cápsula se asocia con la evasión del sistema inmunitario, dificultando la acción de los neutrófilos. Por su parte, los ácidos teicoicos contribuyen a reducir la actividad del sistema del complemento, mientras que los ácidos lipoteicoicos están directamente implicados en la promoción de la formación de *biofilm* (136).

B) **Adhesinas y proteínas de superficie**

Tienen un papel en la formación de *biofilm* y en la **persistencia** de la bacteria en los tejidos infectados. Entre ellas, destacan las siguientes proteínas:

- **Esp**: Es una proteína de superficie de alto peso molecular, codificada por el gen *esp* (de ahí el nombre, *enterococcal surface protein*). Representa **uno de los principales factores de virulencia** de *E. faecium*, asociada de forma significativa con la formación de *biofilm*. Su presencia es característica del complejo clonal CC17 (135,136,138,154). Además, se ha implicado en la patogénesis de infecciones del tracto urinario (155).

- **Acm, Ace, Fnm, Scm, SgrA y EcbA**: Se trata de **adhesinas** de la familia MSCRAMM (del inglés *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*). Permiten a la bacteria reconocer y adherirse a componentes de la matriz extracelular del hospedador, como colágeno y fibronectina (135,138,154). En particular, se ha sugerido que Acm tiene un papel relevante en el proceso infeccioso de endocarditis (135).

- **Asa1**: Se trata de una proteína de superficie codificada por plásmidos. Es codificada por el gen *asa1* (del inglés *aggregation substance*) y facilita la aglutinación celular, así como la **adherencia** a células del hospedador (154,155). Además de facilitar la formación de *biofilm*, se ha asociado a infecciones del tracto urinario y endocarditis.

- **EfaA**: Se trata de una proteína con motivo LPXTG (explicadas en el apartado E de los factores de virulencia de *S. pneumoniae*). Contribuye a la **adhesión** al tejido cardiaco al interactuar con la fibronectina y se cree que contribuye a las endocarditis (de ahí el nombre de *endocarditis specific antigen A*) (154).

C) **Sistemas pili**

Los pili son estructuras filamentosas superficiales que desempeñan un papel clave en la **adhesión** a células del hospedador, la formación de *biofilm* y la colonización persistente de tejidos. En *E. faecium* se han identificado dos sistemas de pili funcionalmente distintos*:*

- Sistema PilA: Conocido también como PGC-1 (*Pilus Gene Cluster* 1). Es el sistema de pili menos caracterizado y está codificado por el gen *pilA* y genes asociados. Las estructuras sintetizadas son delgadas y rígidas (156).

- Sistema PilB: Conocido también como PGC-3 (*Pilus Gene Cluster* 3). Es el sistema principal de pili y el que ha sido mejor caracterizado. Su síntesis está regulada por el operón *ebpABCfm* (*endocarditis and biofilm-associated pili*), y se encuentra predominantemente en cepas del clado A1 (135,136). Este sistema ha demostrado ser esencial en la adhesión a células del epitelio urinario y a válvulas cardíacas, contribuyendo así a infecciones del tracto urinario y a las endocarditis (157). Las estructuras formadas son más gruesas y flexibles en comparación con el sistema PilA (156).

D) **Toxinas**

E. faecium puede sintetizar y secretar una serie de enzimas extracelulares que actúan como **lisinas**, contribuyendo a la **degradación de tejidos del hospedador** y a la respuesta inmune. Las más importantes son:

- Citolisina: Es codificada por el gen *cylA* y degrada los macrófagos, leucocitos y eritrocitos del hospedador. Su actividad provoca la activación de la respuesta inmune, así como facilita el progreso de la infección (138,154,155). Además, presenta actividad bactericida frente a otras bacterias grampositivas (138). En modelos animales ha demostrado tener un papel en las infecciones intraperitoneales (157).

- Gelatinasa: Peptidasa dependiente de zinc codificada por el gen *gelE.* Degrada una amplia variedad de sustratos del hospedador como la gelatina, el fibrinógeno, el colágeno, la insulina, la hemoglobina y la caseína (138,154,155). Su presencia es especialmente relevante en cepas del clado A1. Algunos estudios en modelos animales han demostrado que desempeña un papel en la patogénesis de la endocarditis y peritonitis (136,157).

- Hialuronidasa: Codificada por el gen *hyl*. Como indica su nombre, es una toxina con capacidad para degradar el ácido hialurónico del tejido conectivo del hospedador. Esta degradación facilita la disrupción de las barreras tisulares, permitiendo a la bacteria invadir más fácilmente los tejidos durante el proceso infeccioso y favoreciendo su diseminación (138,154,155).

Todas estas toxinas mencionadas han sido más estudiadas en la especie *E. faecalis* ya que su presencia en esta especie es mayor. En *E. faecium* su presencia es variable y suele ser menor (135,154).

No obstante, estudios recientes han comenzado a describir la existencia de otras toxinas menos conocidas en *E. faecium*, cuya relevancia clínica y mecanismo de acción aún requieren mayor investigación (135).

E) **Sistemas de fosfotransferencia bacteriana PTS**

Los sistemas PTS (del inglés *Phosphotransferase system*) son proteínas transmembrana especializadas que actúan como transportadores activos de carbohidratos, permitiendo su captación por parte de la bacteria mediante un proceso de fosforilación. Además de su **función metabólica**, los PTS han demostrado tener un papel clave en la colonización intestinal, la formación de biofilm y la supervivencia bacteriana en el torrente sanguíneo (135,136).

1.3.3. Resistencia a glucopéptidos

Incidencia e importancia

Como ya se ha mencionado, *E. faecium* es una bacteria con elevada resistencia a condiciones ambientales y también a numerosos tratamientos antibióticos. Esta resistencia se debe, en gran medida, a mutaciones y a la adquisición de genes de resistencia mediante transferencia horizontal. Desde la década de 1970, se observó una resistencia creciente a antibióticos β-lactámicos como a la ampicilina y

a las cefalosporinas de tercera generación (134). Esta resistencia se atribuye principalmente a mutaciones en la diana de las PBP (detalladas en el apartado 1.1.3), y en particular a alteraciones en el gen *pbp5* (135). Debido a este fenómeno de pérdida de eficacia de los antibióticos β-lactámicos, **el tratamiento de elección para las infecciones causadas por *E. faecium* pasó a ser la vancomicina** (134).

Al ser el tratamiento de elección, la adquisición de genes de resistencia a los glucopéptidos representa una preocupación crítica en salud pública. Como ya se ha mencionado en el apartado 1.3.2, esta situación ha conllevado a que el ***E. faecium*** **resistente a vancomicina** (**VREfm**, por sus siglas en inglés: *vancomycin-resistant Enterococcus faecium*) sea clasificado por la OMS como un patógeno prioritario (45,135).

En 1988 se detectó en Francia el primer caso de una cepa VREfm (158) y, a partir de la década de 1990, se comenzaron a detectar en Estados Unidos. Su aparición en Europa se produjo principalmente en Alemania en 1990, asociada al uso de avoparcina (detallado más adelante). Tras la prohibición del uso de avoparcina en Europa en 1997, las tasas de colonización en la población disminuyeron considerablemente (159). Sin embargo, a partir de los años 2000, la propagación de VREfm continuó y se extendió de forma progresiva por el resto del continente europeo (160).

A nivel global, existen variaciones significativas en la prevalencia de VREfm según la región y el país. En Estados Unidos, aproximadamente el 80% de las infecciones nosocomiales causadas por *E. faecium* son resistentes a la vancomicina (135). En Australia, la incidencia alcanzó el 46,8% en 2017, posicionándose como otro de los países con mayor tasa mundial de VREfm (161). En América del Sur se estima una incidencia del 31%, en África del 26,8% y en Asia del 22% (135).

En Europa, la prevalencia global de las infecciones por VREfm se sitúa en un 17,2% (135), aunque países como Grecia, Rumania, Chipre o Lituania superan el 40% (161). Según datos del ECDC (49), en el año 2023, los diez países europeos con mayor incidencia de VREfm fueron Lituania (60,9%), Grecia (58,6%), Chipre (53,5%), Polonia (41,3%), Rumania (41,2%), Hungría (38,2%), Malta (36,0%), Italia (32,5%), Croacia (23,5%) y Letonia (23,0%) (**Figura 19**).

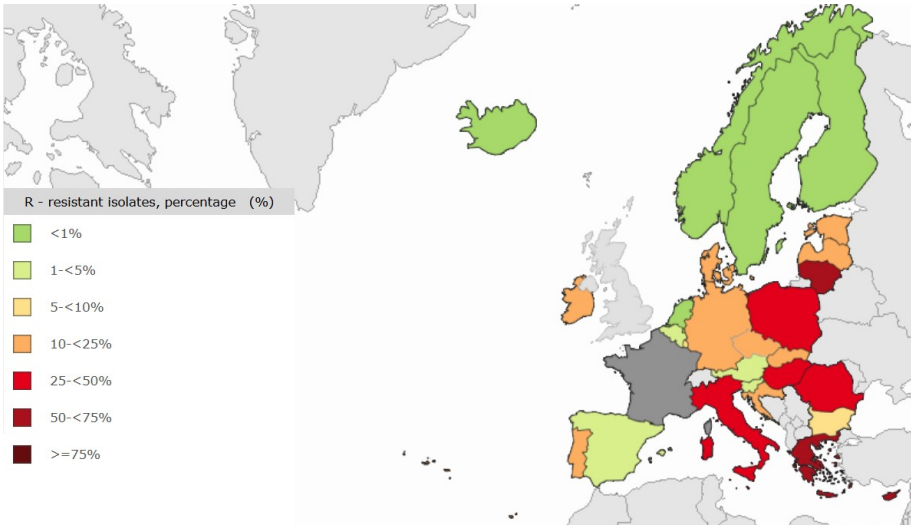


Figura 19: Mapa de Europa que muestra la proporción de aislamientos clínicos

de VREfm en 2023. Los países están categorizados en colores según el porcentaje de VREfm: verde (<1%), verde claro (1-<5%), amarillo (5-<10%), naranja (10-<25%), rojo (25-<50%), granate (50-<75%) y marrón (≥75%). Se observa una mayor incidencia en los países del sureste de Europa, mientras que países del norte de Europa mantienen cifras por debajo del 5%. Extraído de (49).

En España, el porcentaje de VREfm se ha mantenido relativamente bajo y con una tendencia estable. Los últimos datos disponibles a fecha de redacción de esta tesis son del 2023, observándose una incidencia del 4,0% respecto a un total de 1.092 aislamientos clínicos de *E. faecium* (**Figura 20**).

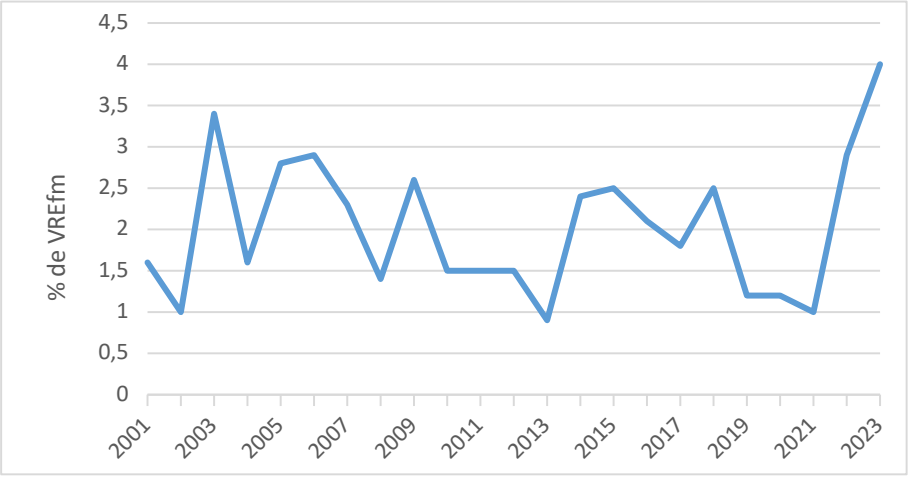


Figura 20: Evolución temporal del porcentaje de aislamientos clínicos de VREfm en España entre los años 2001-2023. Extraído de (49).

Mecanismo de resistencia

La vancomicina es un glucopéptido tricíclico derivado de la bacteria *Streptomyces orientalis.* Actúa como agente bactericida al unirse específicamente y con elevada afinidad al dímero D-alanina-D-alanina (dímero D-Ala-D-Ala) presente en los precursores del peptidoglucano

de la pared celular bacteriana (**Figura 21**). Esta unión inhibe la acción de la transpeptidasa bacteriana (enzima clave en el entrecruzamiento de las cadenas de peptidoglucano) lo que bloquea tanto la síntesis como la polimerización de esta estructura (162). Como consecuencia, **se interrumpe la formación adecuada de la pared celular,** debilitando su estructura y provocando la lisis y muerte de la célula bacteriana. La vancomicina carece de actividad frente a las bacterias gramnegativas debido a que es una molécula hidrofílica y de elevado peso molecular, lo que le impide atravesar la membrana externa lipídica que caracteriza a estas bacterias y por eso solamente es activa frente a bacterias grampositivas (163).

Se considera que uno de los principales reservorios de cepas VREfm fueron los **reservorios zoonóticos, concretamente los animales de ganadería, donde se utilizaba avoparcina**, un antibiótico glucopéptido empleado como promotor del crecimiento de los animales (163). El uso no controlado de esta molécula en el ganado animal favoreció la selección y mantenimiento de cepas resistentes a la vancomicina, que actuaron como fuente clave y facilitaron la diseminación inicial del VREfm hacia el entorno humano (159,163). Este fenómeno llevó a la prohibición del uso de avoparcina como aditivo promotor del crecimiento en animales de ganadería por parte de la Unión Europea en 1997 (163).

Las cepas VREfm se caracterizan por poseer **genes de resistencia a glucopéptidos denominados *van*** (164). Hasta la fecha, se han

identificado al menos 12 variantes que han sido denominadas de manera secuencial como *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE,* entre otras (135). De estos, ***vanA* y *vanB* son los mecanismos más relevantes** (135,164). A nivel global, las cepas portadoras del gen *vanA* son consideradas las más problemáticas debido a su amplia diseminación (160,163). Sin embargo, en regiones específicas como Alemania y Dinamarca, desde la década de 2010 se ha observado un cambio en la dinámica de resistencia, con un desplazamiento de la dominancia hacia las cepas *vanB*, las cuales actualmente predominan en los entornos hospitalarios de ese país (159,160,165).

Los genes *van* están organizados en operones ubicados en elementos genéticos móviles como transposones (el gen *vanA* se encuentra en el transposón Tn1546 y *vanB* en el Tn1549), lo que facilita su diseminación entre diferentes cepas bacterianas (135,161,164). De hecho, las cepas VREfm se consideran reservorios de genes de resistencia a glucopéptidos, ya que su diseminación no se limita a la misma especie; se han documentado casos de transferencia horizontal de transposones a otras especies bacterianas, lo que ha dado lugar a la aparición de cepas preocupantes de *S. aureus* resistentes a la vancomicina (161). Finalmente, es importante señalar que existen especies de enterococos que presentan resistencia intrínseca a los glucopéptidos, debido a la presencia cromosómica del gen *vanC*, como es el caso de *Enterococcus gallinarum* y *Enterococcus flavescens* (166).

La expresión de los genes *van* provoca la síntesis de precursores de peptidoglucano con un dímero modificado que sustituye el dímero D-Ala-D-Ala habitual mencionado, disminuyendo así la afinidad del glucopéptido por su diana y confiriendo la resistencia (**Figura 21**). Por ejemplo, en el caso de las cepas portadoras del gen *vanA* y *vanB* sintetizan un dímero D-Alanina-D-Lactato (D-Ala-D-Lac) mientras que las cepas con el gen *vanC* o *vanE* sintetizan un dímero D-Alanina-D-Serina (161).

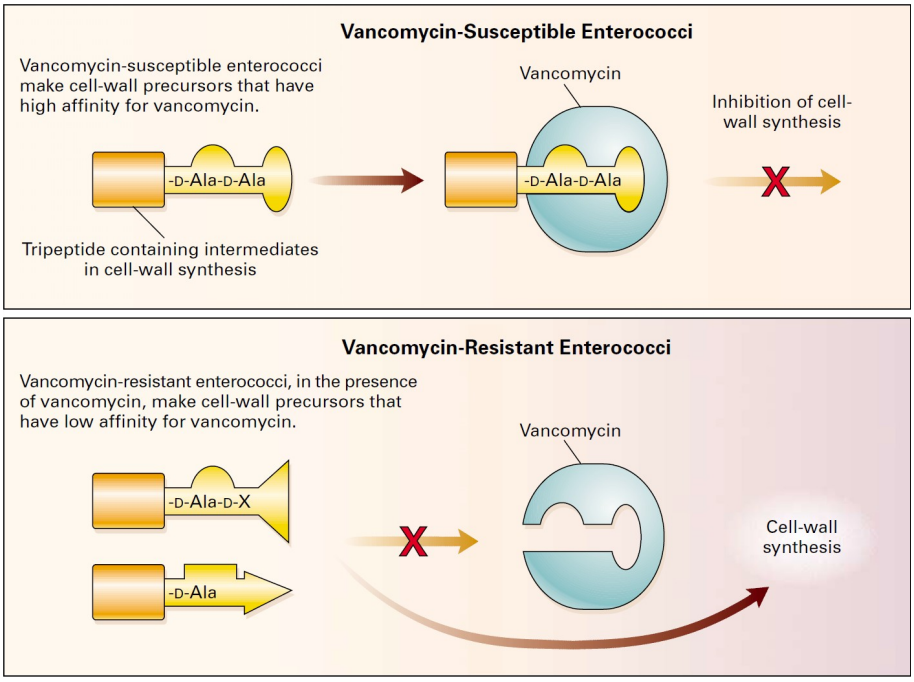


Figura 21: En la parte superior, se representa el mecanismo de acción de la vancomicina en las cepas de *E. faecium* sensibles a la vancomicina. En la parte inferior, se representa la ausencia de actividad de la vancomicina en las cepas VREfm. Extraído de (167).

Como dato adicional, las cepas portadoras del gen *vanB* siguen siendo sensibles a la teicoplanina, un antibiótico glucopéptido cuya estructura es ligeramente diferente a la de la vancomicina (168). Aunque estas cepas también sintetizan precursores de peptidoglucano terminados en D-Ala-D-Lac, la resistencia no se manifiesta frente a teicoplanina debido a diferencias en sus sistemas reguladores. El sistema sensor-regulador VanS/VanR del operón *vanB* no detecta de manera eficiente la presencia de teicoplanina como inductor porque tiene una estructura más lipofílica que limita la interacción con el sistema sensor (161,168). Como consecuencia, la presión antibiótica ejercida por la teicoplanina no activa la expresión de los genes de resistencia.

Otros antibióticos

Entre las opciones terapéuticas disponibles en nuestro entorno para el tratamiento de infecciones causadas por VREfm existen:

- **Linezolid**. Antibiótico del grupo de las oxazolidinonas. Su mecanismo de acción consiste en unirse al RNA 23S de la subunidad ribosomal 50S, inhibiendo la síntesis proteica en bacterias grampositivas (169). Sin embargo, este antibiótico puede asociarse a efectos adversos, entre los que se incluyen alteraciones hematológicas que afectan a las tres series celulares (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) y neuropatías periféricas (161). Además, se han descrito mecanismos de resistencia que involucran tanto mutaciones cromosómicas en la diana ribosomal del antibiótico

(siendo las mutaciones en el gen ribosomal 23S el mecanismo más común) como genes transferibles que modifican las dianas ribosomales (genes *cfr*, *optrA* y *poxtA*) (164,169).

- **Daptomicina**: Se trata de un lipopéptido cíclico que actúa uniéndose a la membrana celular de forma dependiente del calcio, lo que provoca una despolarización de la membrana y una alteración en el equilibrio iónico intracelular (170). Este desequilibrio iónico altera la integridad de la membrana y conduce finalmente a la muerte celular. No obstante, en la actualidad, el uso de daptomicina en infecciones sistémicas por VREfm requiere de mayor evidencia clínica para establecer la posología y las dosis óptimas que permitan alcanzar concentraciones terapéuticas adecuadas (161). No obstante, se han descrito mutaciones en las vías de respuesta al estrés de la envoltura celular, como en los genes *liaFSR* y *yycFG*, así como en genes implicados en el metabolismo de fosfolípidos de la membrana, como los genes *cls* y *gdpD*. Estas mutaciones alteran la composición y la carga de la membrana celular, lo que reduce la capacidad de la daptomicina para unirse de manera efectiva (170).

- **Dalbavancina** y **oritavancina**: Ambas moléculas son lipoglucopéptidos derivados estructuralmente de la teicoplanina y de la vancomicina, respectivamente (171). Tienen actividad frente a bacterias grampositivas incluyendo VREfm. No obstante, la dalbavancina solo tiene actividad frente a las cepas *vanB* mientras

que la oritavancina cubre tanto cepas *vanA* como *vanB* (171,172). Ambos antibióticos actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular mediante el mismo mecanismo que los glucopéptidos (explicado anteriormente). En inglés, estas moléculas se denominan *Long-Acting Lipoglycopeptides* debido a que su principal ventaja terapéutica radica en su elevado tiempo de semivida (346 y 393 horas), lo que permite regímenes de dosis única o administraciones semanales en infecciones complicadas, reduciendo la necesidad de hospitalización o terapia intravenosa prolongada (173).

1.3.4. Clínica

E. faecium se considera un patógeno de alta **relevancia en entornos hospitalarios**. Su emergencia como agente nosocomial se ha visto favorecida por factores como el uso intensivo de antibióticos de amplio espectro, la utilización de dispositivos invasivos y su notable capacidad para persistir en ambientes hospitalarios, facilitando la transmisión cruzada entre pacientes. En particular, **las cepas VREfm representan un desafío clínico aún mayor**, ya que limitan significativamente las opciones terapéuticas disponibles y aumentan la morbimortalidad y los costos asociados a la atención hospitalaria. Esta combinación de resistencia antimicrobiana, persistencia ambiental y

transmisibilidad ha posicionado a *E. faecium* como uno de los microorganismos más críticos en el control de infecciones hospitalarias a nivel mundial (135,159,161,170).

Al igual que *K. pneumoniae*, *E. faecium* está englobado en la terminología de las bacterias **ESKAPE** (46,47). Como se ha explicado en el apartado 1.1.3, esta clasificación se debe a su capacidad de adquirir mecanismos de resistencia y ser uno de los microorganismos más frecuentemente relacionado con las infecciones nosocomiales (46). Según un estudio publicado en 2022, se estima que en 2019 ocurrieron aproximadamente 219.000 muertes atribuibles a infecciones por *E. faecium*, con una tasa de 2,8 muertes por cada 100.000 habitantes, lo que la posiciona como **la décima bacteria causante de mayor mortalidad a nivel mundial** (62,135). Según el ECDC, *E. faecium* causó el 5,5% de todas las infecciones nosocomiales en Europa en 2020 (161).

Más específicamente, en relación con las cepas VREfm, los CDC estiman que en 2017 se produjeron alrededor de 54.000 infecciones nosocomiales y 5.400 muertes en los Estados Unidos, con unos costes sanitarios asociados de 539 millones de dólares (172,174). Estudios más recientes estiman que las infecciones causadas por VREfm presentan una tasa de mortalidad intrahospitalaria aproximada del 18% (135).

A continuación, se detallan las infecciones más relevantes causadas por *E. faecium* (135,161,172):

Infecciones de tracto urinario

Al igual que *K. pneumoniae*, *E. faecium* posee la capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal y, posteriormente, ascender hacia el tracto urinario, donde puede causar infecciones. De hecho, *E. faecium* es uno de los agentes uropatógenos más frecuentes en el entorno hospitalario (175–177). La ITU constituye su manifestación infecciosa más frecuente, aunque no suele ser la más grave (178). En el año 2019, se registraron aproximadamente 17.800 muertes atribuidas a infecciones por este microorganismo a nivel mundial, con una tasa de mortalidad global estimada en 0,2 por cada 100.000 habitantes (62). La ITU por *E. faecium* se asocia al ámbito nosocomial, donde está relacionada con el uso de dispositivos (sondas o catéteres urinarios) y con alteraciones anatómicas (determinadas neoplasias) (177,178).

Esta capacidad patogénica se ve potenciada por la presencia de los diversos factores de virulencia que facilitan su adhesión al epitelio urotelial (detallados en el apartado 1.3.2), entre los que destacan la proteína de superficie Esp, las adhesinas de la familia MSCRAMM, y la adhesina Asa1. A su vez, la formación de pili permite un anclaje firme a las superficies, favoreciendo la formación de *biofilms*. Como se ha comentado, los *biofilms* son películas que protegen a la bacteria frente a la respuesta inmune del hospedador, reducen la penetración de los

antibióticos y facilitan la persistencia de la infección (176). Algunos estudios han evidenciado que la presencia de enterococos en las ITU no siempre corresponde a un papel de uropatógeno principal ya que puede actuar como microorganismo "acompañante" que favorece e incrementa la colonización, patogenicidad e invasión del uropatógeno primario (178,179).

Si la infección urinaria sigue progresando, *E. faecium* puede causar pielonefritis, prostatitis, abscesos renales y, finalmente, diseminarse al torrente sanguíneo y provocar una bacteriemia (177). De hecho, la ITU constituye el segundo foco más frecuente de bacteriemias por *E. faecium*, solo superado por las infecciones de origen biliar (178).

Infecciones intraabdominales

Las infecciones intraabdominales representan alrededor del 8% de todas las infecciones en pacientes hospitalizados y representan la segunda causa infecciosa más frecuente en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (180,181). Además, entre el 10-20% de las infecciones abdominales cursan con bacteriemia (182), siendo el tracto biliar el principal foco de origen de las bacteriemias por *E. faecium*.

En un trabajo francés publicado en 2019, los autores analizaron 1.017 episodios de infecciones intraabdominales, de los cuales el 8% presentaron aislamiento de enterococos; de estos casos, el 89,5% fueron de adquisición nosocomial y *E. faecium* se aisló en el 36,8% de

los episodios. En otro estudio francés publicado en 2020 donde analizaron 226 episodios, detectaron que *E. faecium* fue el tercer microorganismo más frecuentemente detectado en las infecciones intraabdominales nosocomiales (183).

Las infecciones intraabdominales donde se aísla *E. faecium* se asocian a un peor pronóstico, ya que se relacionan con una mayor gravedad clínica, una tasa más elevada de reintervenciones quirúrgicas, necesidad de ventilación mecánica prolongada y un incremento en la mortalidad (184). En 2019 se registraron 118.000 muertes a nivel global, con una tasa de 1,5 muertes por cada 100.000 habitantes (62).

Bacteriemia

Actualmente, cuando se consideran exclusivamente las bacteriemias adquiridas en el hospital, *E. faecium* constituye el tercer microorganismo grampositivo más frecuente en Europa y Estados Unidos, por detrás de *S. aureus* y *E. faecalis* (185,186). En un estudio que analizó un total de 24.319 bacteriemias en Estados Unidos y 28.406 bacteriemias en Europa, se observó que la incidencia de bacteriemias por *E. faecium* fue de alrededor del 4% del total, situándolo como el tercer patógeno grampositivo más prevalente en estos episodios (187). Las bacteriemias por *E. faecium* se asocian con elevada morbimortalidad, del 20 al 50% según estudio consultado (185,186,188), ya que suelen afectar a pacientes de edad avanzada, inmunocomprometidos y con múltiples comorbilidades (189). En 2019

se reportaron 78.200 muertes a nivel mundial, con una tasa de 1,0 muertes por cada 100.000 habitantes (62). En un estudio nacional multicéntrico publicado en 2024 la mortalidad detectada fue del 22% (185).

Como se ha mencionado anteriormente, el principal foco de bacteriemias por *E*. *faecium* es el tracto biliar, especialmente en los casos de colangitis. Este hecho se debe a que, en este tipo de infecciones, suele haber dificultad para drenar adecuadamente el foco infeccioso, lo que favorece la persistencia de la infección y su progresión a una bacteriemia (190). En un estudio publicado en 2017 en Barcelona, se analizaron 173 bacteriemias secundarias a colangitis y observaron que *E. faecium* fue el tercer microorganismo más frecuentemente aislado en pacientes con neoplasias biliares (7,8%), solo por detrás de *E. coli* (39,3%) y *K. pneumoniae* (15,1%) (190). Por otra parte, en un estudio multicéntrico nacional publicado en 2022 se analizaron 6.313 bacteriemias de 26 hospitales españoles y se identificaron como principales factores de riesgo para bacteriemias de origen biliar la presencia de colangiocarcinoma, la presencia de prótesis biliares, la adquisición nosocomial, el uso previo de antibióticos de amplio espectro y la insuficiencia renal crónica. Más concretamente, la presencia de colangiocarcinoma multiplicó por 4,5 veces el riesgo de bacteriemia en casos de colangitis causada por *E. faecium* (182).

Aunque existe cierto debate en la literatura, diversos estudios han evidenciado que las bacteriemias causadas por cepas de *E. faecium* resistentes a vancomicina presentan una mayor mortalidad a los 30 días en comparación con las cepas sensibles a la vancomicina (161,172,177,178,188). De la misma manera, diversos trabajos han demostrado que las bacteriemias por *E. faecium* presentan una tasa de mortalidad superior a la observada en las bacteriemias causadas por *E. faecalis* (185). Una posible explicación a esta diferencia se atribuye a que *E. faecium* (y a las cepas VREfm especialmente) tienen mayor resistencia a gran parte de los tratamientos antimicrobianos empíricos. El retraso en emplear la cobertura antibiótica adecuada en las infecciones graves se asocia a peor pronóstico y mayor mortalidad (186).

Endocarditis

Los enterococos son **la tercera causa más frecuente de endocarditis bacteriana a nivel mundial**, solo precedidos de *S. aureus* y *Streptococcus viridans* (186,191,192). Se trata de una infección grave que afecta predominantemente a la válvula aórtica (193) y suele cursar de manera subaguda, manifestándose clínicamente con fiebre persistente, aparición de soplos cardíacos y presencia de lesiones características como los nódulos de Osler o las lesiones de Janeway (177). La endocarditis por *E. faecium* se ha asociado, además, con la presencia de neoplasias colónicas (193). Se calcula que hasta el 30% de los casos de bacteriemias pueden desarrollar una endocarditis, con

una mortalidad que alcanza el 35%. En 2019 se estimaron aproximadamente 4.500 muertes globales, con una tasa de 0,1 muertes por cada 100.000 habitantes (62).

Algunos estudios sugieren que las endocarditis infecciosas causadas por *E. faecium* presentan una mortalidad entre un 5% y un 10% superior en comparación con las endocarditis producidas por otros microorganismos (194). Esta mortalidad se debe a que la infección suele ocurrir en pacientes con múltiples comorbilidades, así como al diagnóstico tardío debido al curso subagudo de la enfermedad y la inespecificidad de los síntomas en fases iniciales (177).

1.4. Infección nosocomial: consecuencias y estrategias de control

1.4.1. Definición

El concepto de infección nosocomial (del latín *nosocomium*, 'hospital') hace referencia a aquella infección que se adquiere durante el transcurso de una hospitalización. Según la OMS, la infección nosocomial se define más específicamente como aquella **infección que un paciente adquiere durante el proceso de atención en un centro sanitario, y que no estaba presente ni incubándose en el momento de su ingreso** (195). Por su parte, los CDC la definen como cualquier cuadro clínico resultado de una reacción adversa a un microorganismo infeccioso o sus toxinas en el entorno sanitario, siempre que no estuviera presente ni incubándose en el momento del ingreso (196).

A efectos de vigilancia epidemiológica, se consideran nosocomiales aquellas infecciones que se adquieren tras transcurrir 48 horas a partir del ingreso o durante las primeras 48 horas posteriores al alta hospitalaria (161,197).

No todas las infecciones que no cumplen con los criterios clásicos de infección nosocomial deben clasificarse como infecciones comunitarias. **Además del concepto de infección nosocomial, en la literatura se emplea el término de infecciones relacionadas con la**

asistencia sanitaria (IRAS) o, en inglés *Healthcare-Associated Infection* (HCAI) (198). Son infecciones que, aunque no cumplen estrictamente los criterios temporales de las infecciones nosocomiales, están relacionadas de forma directa con el entorno hospitalario. Aunque existen diversas definiciones en la literatura médica, las más utilizadas son las definiciones conocidas como criterios "Duke-2002", publicadas en 2002 por el Hospital Universitario de Duke (Carolina del Norte), así como sus modificaciones posteriores (198,199).

Según estos criterios, se consideran IRAS en vez de comunitarias aquellas infecciones presentes en el momento del ingreso o que se desarrollan en las primeras 48 horas de hospitalización, siempre que el paciente haya cumplido uno de los siguientes criterios (181,199,200):

A) Haber recibido tratamientos en domicilio como determinadas terapias intravenosas.
B) Realizar determinados tratamientos ambulatorios como quimioterapia o hemodiálisis.
C) Haber estado hospitalizado durante 48 horas o más en los últimos 90 días.
D) Residir en centros sociosanitarios o de larga estancia.

No obstante, a partir de este punto, el enfoque de la presente introducción continuará centrado específicamente en la infección nosocomial, dado que el principal ámbito de aplicabilidad de esta tesis es el manejo de las infecciones adquiridas durante la hospitalización.

1.4.2. Incidencia y magnitud del problema

Las infecciones nosocomiales representan actualmente uno de los principales problemas asociados a la atención hospitalaria debido al **impacto clínico y económico** que generan (197). Según la OMS, las infecciones nosocomiales suponen un enorme coste económico para los sistemas sanitarios, debido a la prolongación de las estancias hospitalarias, la necesidad de tratamientos y el uso de antibióticos más restringidos. Además, generan un importante impacto en salud del paciente, traducido en pérdida de calidad de vida y aumento de la morbimortalidad (195)**.**

A pesar de los avances de la medicina moderna y en el cuidado del paciente, este tipo de infecciones continúa representando un **problema vigente que exige estrategias constantes para su prevención y manejo** (201). De hecho, se trata de un problema en aumento, ya que los hospitales atienden cada vez a un mayor número de pacientes con sistemas inmunitarios debilitados (edad avanzada, diálisis, pacientes en tratamientos oncológicos, etc.). A ello se suma el incremento en la realización de procedimientos médicos invasivos y el uso extendido de determinados dispositivos médicos que, en global, representan factores que incrementan el riesgo de desarrollar infecciones nosocomiales (202).

Según estimaciones de la OMS, **las infecciones nosocomiales afectan a más de 100 millones de pacientes cada año** (203). En un estudio mundial realizado en 2024 observaron que la prevalencia varía según el país (**Figura 22**). En los países desarrollados, la prevalencia de las infecciones nosocomiales es de alrededor del 7% (204). Por otra parte, en los países en vías de desarrollo, se registraron cifras un poco más elevadas, con una prevalencia de alrededor del 15% (204). Esta diferencia puede atribuirse a diversos factores: infraestructuras hospitalarias más limitadas, menores recursos económicos, escasez de personal capacitado, deficiencias en las medidas de higiene, falta de programas de control de infecciones y ausencia de políticas para el uso racional de antibióticos (202).

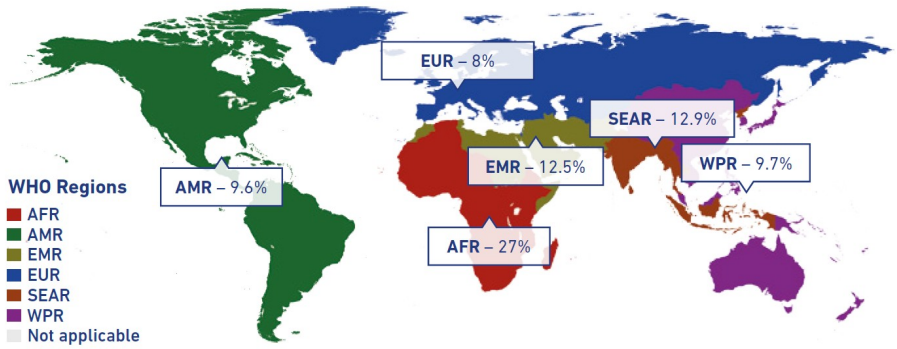


Figura 22: Prevalencia de la infección nosocomial en África (AFR), las Américas (AMR), el Mediterráneo Oriental (EMR), Europa (EUR), Asia Sudoriental (SEAR) y el Pacífico Occidental (WPR). Extraído de (204).

Según los CDC, en Estados Unidos se estima que las infecciones nosocomiales afectan cada año a 1,7 millones de personas, de las cuales cerca de 100.000 fallecen como consecuencia de las mismas.

Estas cifras suponen un coste de 6,5 billones de euros anuales (161). En el ámbito europeo, el ECDC estima que la prevalencia varía entre el 3,5% y el 14,8%. Estas cifras equivalen aproximadamente a unos 3-4 millones de infecciones nosocomiales cada año y unas 37.000 muertes, unos 16 millones de días adicionales de estancia hospitalaria y un coste de unos 7.000 millones de euros (161,205).

El **Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España** (siglas **EPINE**) nº 34, realizado en 2024, reportó una prevalencia del 7,17% de infecciones nosocomiales basada en una cohorte de 58.913 pacientes de unos 300 hospitales nacionales (206). Este valor refleja una tendencia estable durante la última década, con cifras entre el 6,8% y el 7,5% en años previos. El estudio también señala que la prevalencia mayor se detectó en las unidades de cuidados intensivos (UCI), donde superó el 25% de los pacientes ingresados. En Cataluña, según los datos de este EPINE 2024, se detectó una prevalencia de 8,20% de infección nosocomial analizando una cohorte de 4.267 pacientes (206).

Respecto a la tipología, diversos estudios señalan que **las infecciones nosocomiales más frecuentes son las infecciones del tracto urinario, las infecciones debidas al uso de catéteres endovenosos, la neumonía asociada a la ventilación mecánica y las infecciones relacionadas con la cirugía** (197). De hecho, la OMS estima que estas cuatro infecciones representan aproximadamente el 80% de todas las infecciones nosocomiales (207).

A nivel nacional, las infecciones nosocomiales más frecuentes son las infecciones quirúrgicas (23,80%), las infecciones respiratorias (22,61%), las infecciones del tracto urinario (18,66%) y las bacteriemias (13,74%). En conjunto, estas cuatro localizaciones representaron más del 75% de todas las infecciones nosocomiales registradas en el estudio (206).

1.4.3. Factores predisponentes

El desarrollo de una infección nosocomial depende de la interacción dinámica entre el paciente, el microorganismo, el entorno hospitalario y determinadas prácticas asistenciales (208). Estos factores pueden actuar de forma independiente o sinérgica, incrementando el riesgo de adquisición de la infección. A continuación, se detallan los más relevantes:

1. **Relacionados con el paciente:**

- **Edad extrema**: Los pacientes neonatos y aquellos de edad avanzada presentan una mayor susceptibilidad a las infecciones nosocomiales y, en general, a cualquier tipo de infección. En el primer extremo de edad hay una inmadurez del sistema inmunitario y en el extremo opuesto, una mayor fragilidad y un sistema inmunitario menos eficiente. Además, los pacientes de

edad avanzada suelen padecer múltiples comorbilidades o ser portadores de dispositivos médicos (201,209,210).

Concretamente, según el estudio EPINE 2024, la incidencia de infecciones nosocomiales fue del 4,18% en la franja de 0 a 9 años. Posteriormente, la gráfica por edades desciende y vuelve a aumentar a partir de los 50 años, alcanzando su máximo en el grupo de 70 a 79 años, con una prevalencia del 9,28% (206).

- **Comorbilidades**: Patologías como diabetes mellitus, insuficiencia renal crónica, hepatopatías, neoplasias o determinados estados de inmunosupresión (por ejemplo, en pacientes sometidos a quimioterapia) incrementan el riesgo (211,212), ya que se trata de pacientes que suelen presentar un estado de inmunosupresión de base y que con frecuencia acuden al hospital por exacerbaciones de sus patologías de base.

- **Dispositivos invasivos**: La presencia de un dispositivo médico es uno de los factores críticos para adquirir una infección nosocomial (207), ya que facilita la entrada de los microorganismos y la adherencia posterior mediante formación de ***biofilms*** (explicado en el apartado 1.1.2). Entre los diferentes dispositivos, destacan los **catéteres venosos** (facilitan la bacteriemia a través de catéter (213)), las **sondas urinarias y ventilación mecánica** (facilita la neumonía asociada al ventilador).

Según los datos del EPINE 2024, el 70,36% de los pacientes con bacteriemia portaba un catéter venoso, el 57,36% de los pacientes con infección urinaria tenía una sonda urinaria y el 32,20% de los pacientes con neumonía estaba sometido a ventilación mecánica (206).

2. **Relacionados con el microorganismo:**

Tal y como se ha mencionado en los apartados 1.1.3 y 1.3.4, la presencia de bacterias pertenecientes al **grupo ESKAPE** constituye un riesgo adicional, ya que se trata de microorganismos con una elevada capacidad para generar brotes, persistir en el entorno nosocomial, adquirir nuevos mecanismos de resistencia y adherirse a dispositivos médicos mediante la formación de *biofilms*.

En particular, *E. faecium* resistente a la vancomicina y *K. pneumoniae* productora de BLEE o de carbapenemasas representan una amenaza aún mayor. Las infecciones por estas bacterias incrementan aún más la presión asistencial y limitan de forma significativa las opciones terapéuticas disponibles, obligando al uso de antibióticos de última línea, más restringidos y con mayor coste económico.

3. **Relacionados con el entorno hospitalario y las prácticas asistenciales**:

- **Estancias hospitalarias prolongadas**: Las infecciones nosocomiales no solo incrementan el número de días de hospitalización, sino

que, además, **una duración prolongada de un ingreso se asocia de forma directa con un mayor riesgo de adquirir una nueva infección**. Este riesgo se ve potenciado por la necesidad de emplear dispositivos invasivos durante el ingreso, tales como catéteres vasculares, sondas urinarias o la realización de reintervenciones quirúrgicas. Un metaanálisis publicado en 2023 de 5.037 estudios identificó que permanecer hospitalizado más de dos semanas se asocia con una probabilidad significativamente mayor de desarrollar infecciones nosocomiales (*odds ratio*: 13,36) (212).

- **Unidades de cuidados intensivos**: Las UCI presentan las mayores tasas de infección relacionada con la asistencia sanitaria debido a la **gravedad clínica de los pacientes, la elevada frecuencia de procedimientos invasivos y el uso frecuente de antibióticos** de amplio espectro. La mayoría de los pacientes ingresados en estas unidades requieren dispositivos médicos como tubos endotraqueales, catéteres vasculares o sondas urinarias (214).

  Según datos del ECDC, en 2020, de un total de 87.513 pacientes ingresados en UCI, el 12,7% presentó una infección nosocomial (214). En territorio nacional, los datos del EPINE 2024 indican una prevalencia aún mayor, superando el 25% de los pacientes ingresados (206).

- **Procedimientos quirúrgicos**: La cirugía incrementa el riesgo de infección del sitio quirúrgico debido al carácter traumático del procedimiento, que implica la **ruptura de barreras anatómicas y tisulares**. Este riesgo se ve potenciado por situaciones como quemaduras, la realización de procedimientos invasivos complejos, la instrumentación prolongada o la necesidad de reintervenciones (201). La probabilidad de infección aumenta aún más cuando existen deficiencias en las medidas de asepsia, en la aplicación adecuada de profilaxis antibiótica o en el control de las condiciones del entorno quirúrgico. Según un metaanálisis publicado en 2023 en China, los procedimientos invasivos fueron uno de los principales factores de riesgo (*odds ratio*: 3,54).

- **Higiene**: La falta de adherencia a los protocolos de higiene de manos y el incumplimiento de las condiciones de esterilidad favorecen la adquisición de infecciones intrahospitalarias y la **transmisión cruzada** de estas entre pacientes.

  Tal y como se ha señalado en el apartado 1.4.2, en algunos países en vías de desarrollo las limitaciones de recursos dificultan la disponibilidad de hospitales con infraestructuras adecuadas, acceso a agua potable, personal debidamente capacitado y materiales estériles. Estudios realizados en centros hospitalarios de África subsahariana han reportado incidencias de infección nosocomial de hasta el 49% (202).

- **Uso inadecuado de antimicrobianos**: El uso irracional de antibióticos, especialmente de aquellos con un amplio espectro de acción, favorece la **selección y diseminación de microorganismos multirresistentes** (215), como las cepas productoras de β-lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas o *E. faecium* resistente a vancomicina. Estas cepas, además de presentar opciones terapéuticas limitadas, tienden a originar brotes intrahospitalarios.

1.4.4. Estrategias de prevención y control

Debido a la naturaleza intrínseca de las infecciones nosocomiales, su erradicación total en un hospital resulta imposible, ya que están vinculadas tanto a la idiosincrasia del propio paciente como a la necesidad de recibir atención médica (197). **Sin embargo, es posible reducirlas** y controlarlas disminuyendo su tasa de incidencia mediante el cumplimiento estricto de las guías de seguridad del paciente y de los protocolos de prácticas asistenciales.

El ECDC estima que **aproximadamente el 20% de las infecciones nosocomiales son prevenibles** mediante la implementación de programas multidisciplinares que integren de forma conjunta educación del personal sanitario, formación y la monitorización continua de estos programas (216).

Gran parte de la dificultad para lograr la reducción y el control radica en que, en la mayoría de los casos, dependen de factores humanos (197).

1. Medidas universales

- **Higiene de manos**

La higiene de manos constituye **la medida más sencilla y, a la vez, la más importante** que se puede llevar a cabo para prevenir la transmisión de microorganismos (207,217). Esta medida debe realizarse de forma sistemática con el fin de **no vehiculizar microorganismos** de un paciente a otro, del paciente al entorno o viceversa.

La OMS establece los denominados ***"cinco momentos"*** para la higiene de manos (207):

1. Antes del contacto con el paciente.
2. Antes de realizar un procedimiento aséptico.
3. Después de la exposición a fluidos corporales del paciente.
4. Después del contacto con el paciente.
5. Después del contacto con el entorno del paciente.

La OMS señala que el cumplimiento de la higiene de manos se encuentra por debajo de los valores óptimos. En los países desarrollados, el promedio de adherencia a los *cinco momentos* establecidos es del 64,5%, mientras que en los países en vías de

desarrollo se reduce al 9,1%. Asimismo, la OMS estima que la correcta implementación de programas de higiene de manos podría reducir hasta en un 50% la incidencia de infecciones nosocomiales y generar un beneficio económico hasta 16 veces superior a la inversión necesaria para su implementación (218).

- **Uso correcto de los guantes**

El uso de guantes puede generar en el personal sanitario una **falsa sensación de seguridad que conduzca a omitir el cumplimiento estricto de la higiene de manos**. De hecho, numerosos estudios han evidenciado que muchos profesionales sanitarios, al usar guantes, reducen su atención al tocar superficies, objetos o pacientes. Esta falsa percepción favorece que no se realicen los cambios de guantes en los momentos indicados y que no se realice la correcta higiene de manos (219).

Según la OMS, el uso de guantes no sustituye la higiene de manos y debe limitarse a situaciones en las que exista riesgo de contacto con fluidos biológicos, mucosas o piel no intacta (207).

- **Esterilización y desinfección de material médico**

Como se ha mencionado en los apartados 1.1 y 1.3, **ciertos microorganismos son capaces de formar *biofilms* y persistir en superficies inanimadas o en dispositivos médicos**. La falta de una adherencia estricta a los protocolos de limpieza, desinfección y esterilización de superficies, mesas, camas, así como del material

médico reutilizable favorece la diseminación intrahospitalaria de dichos microorganismos hacia el siguiente paciente en el que se utilicen (220). Este riesgo es especialmente crítico en dispositivos que atraviesan las barreras anatómicas y entran en contacto directo con zonas estériles del paciente (como los endoscopios), ya que su contaminación puede tener consecuencias aún más graves ya que facilitan la entrada de los microorganismos a tejidos habitualmente estériles (221).

Esta problemática es más frecuente en los países en vías de desarrollo, donde la adherencia a los protocolos es menos estricta por falta de recursos. En estos países, algunos estudios detectan que hasta el 95% de dispositivos y materiales médicos pueden estar colonizados por microorganismos (222).

- Seguir **protocolos asistenciales** para evitar determinadas infecciones nosocomiales

La aplicación sistemática de protocolos asistenciales específicos y el **cumplimiento riguroso** de estas medidas reduce significativamente la incidencia de infecciones asociadas a dispositivos invasivos y procedimientos quirúrgicos. En inglés son conocidas como ***bundle* de medidas**: conjunto de intervenciones basadas en la evidencia científica. Entre las principales recomendaciones se incluyen:

- Para la ITU asociada a sonda vesical: inserción con técnica aséptica, revisión diaria de la indicación de mantenerla y retirada de la sonda cuando sea posible (223).
- Para la bacteriemia asociada a catéter: inserción con técnica aséptica, higiene de manos previa a la inserción, desinfección de la piel con clorhexidina, mantenimiento y retirada del catéter cuando no sea necesario (224).
- Para la neumonía asociada a ventilación mecánica: elevación de la cabecera a 30-45°, minimizar la sedación y retirar la intubación cuando sea posible (225).
- Para la infección quirúrgica: profilaxis antibiótica adecuada, antisepsia preoperatoria, control glucémico y control de la temperatura corporal durante la operación (226).

- **Precauciones de aislamiento**

Los microorganismos infecciosos pueden presentar distintos mecanismos de transmisión en función de su ciclo biológico y de su patogenia, lo que condiciona las estrategias de prevención a implementar. Algunas bacterias se transmiten principalmente por contacto directo con superficies contaminadas o a través de las manos del personal sanitario, otras se diseminan mediante gotas expulsadas al hablar, toser o estornudar, o incluso a través de partículas en suspensión capaces de permanecer viables en el aire durante períodos prolongados. La aplicación de determinadas medidas según el tipo de transmisión resulta esencial para **interrumpir la cadena de**

transmisión en entornos cerrados como los hospitales. Ejemplos de estas medidas incluyen el uso de mascarillas en caso de patógenos transmitidos por vía aérea, la higiene de manos en caso de transmisión por contacto y la señalización visible en las habitaciones de pacientes en aislamiento.

En relación con las bacterias multirresistentes (MDR) objeto de esta tesis, como *K. pneumoniae* productora de BLEE o *E. faecium* resistente a vancomicina, se conoce que **su principal mecanismo de transmisión es por contacto**. Aunque los CDC recomiendan las medidas de aislamiento de contacto para estos patógenos (227), hay bibliografía diversa respecto si realmente son necesarias las medidas de aislamiento de contacto para estos microorganismos. Esta discrepancia se debe, en parte, a que no hay estudios experimentales suficientes y a que la efectividad de dichas medidas puede depender de factores como la idiosincrasia y recursos de cada centro sanitario, la prevalencia local de microorganismos MDR y el nivel de adherencia del personal a los protocolos de higiene universales (228,229).

- **Uso racional de antibióticos**

La OMS reconoce que el uso excesivo de antibióticos constituye un problema global y subraya la necesidad de implementar programas y políticas orientadas a su utilización racional (230). La ausencia de iniciativas de control, como los **Programas de Optimización del Uso de**

Antibióticos (**PROA**), favorece el uso indiscriminado de estos medicamentos, generando una presión antibiótica que facilita la aparición de cepas MDR. Numerosos estudios demuestran que es esencial **establecer políticas de uso racional de antibióticos** para concienciar al personal sanitario y llegar a utilizar los antibióticos de manera adecuada (202,212). En ocasiones, la implementación de programas multidisciplinares requiere del apoyo de entidades gubernamentales ya que dependen de una coordinación institucional efectiva.

Estos programas también pueden establecerse a nivel nacional. En España, desde 2014, se aprobó el **Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos** (**PRAN**) cuyo objetivo es vigilar el consumo de antibióticos y reducir las resistencias bacterianas (231).

- **Formación continua del personal sanitario**

La formación continua del personal sanitario constituye un pilar fundamental ya que permite **reforzar de forma constante** la aplicación de los protocolos asistenciales, garantizar el correcto cumplimiento de la higiene de manos, promover la **educación** sobre la relevancia de la infección nosocomial, asegurar la adherencia rigurosa a los conjuntos de medidas y fomentar el cumplimiento de las guías PROA (223,225,227).

2. Vigilancia epidemiológica activa

Según los CDC, la **vigilancia sistemática activa** es clave para prevenir y controlar las infecciones nosocomiales mediante una detección temprana, seguimiento sistemático y respuesta inmediata ante casos o brotes. Una vigilancia activa implica una **búsqueda sistemática y continua de información clínica, microbiológica y epidemiológica para la detección precoz de posibles brotes**, especialmente de cepas MDR, y poder aplicar las medidas adecuadas a tiempo para evitar su expansión (227).

De acuerdo con la OMS, para realizar esta vigilancia, los hospitales deben contar con un **grupo de control de infecciones nosocomiales**, **de carácter multidisciplinar**, integrado por profesionales como infectólogos, microbiólogos, farmacéuticos, personal de enfermería especializado, entre otros. Las funciones de este grupo incluyen: promover programas de prevención de infecciones nosocomiales, analizar los datos de la vigilancia, fomentar y supervisar las prácticas asistenciales seguras, dar respuesta ante la sospecha de brotes y evaluar los riesgos asociados al uso de nuevos dispositivos médicos (232).

Otro componente fundamental de este sistema de vigilancia activa es la existencia de **circuitos de notificación rápidos y eficientes** entre los laboratorios de microbiología (donde se detectan las cepas MDR) y los equipos de control de infección nosocomial (227).

Asimismo, es fundamental disponer de **indicadores y sistemas informáticos** que permitan:

- Calcular las tasas de infección nosocomial.
- Analizar datos estadísticos y tendencias de microorganismos MDR.
- Monitorizar el consumo de antibióticos.
- Generar informes periódicos de sensibilidad antimicrobiana para detectar incrementos en los patrones de resistencia.

La disponibilidad de esta información desglosada por unidades o servicios asistenciales ofrece aún mayor valor, ya que permite identificar áreas específicas que requieren intervención, así como realizar comparaciones internas en distintos periodos de tiempo o externas entre diferentes hospitales (227).

En España, existen programas de vigilancia activa que han demostrado su eficacia en la monitorización de las infecciones nosocomiales. A nivel nacional, el EPINE (mencionado en el apartado 1.4.2) realiza anualmente una recogida sistemática de datos de todos los pacientes hospitalizados para estimar la prevalencia de estas infecciones y sus factores de riesgo. En Cataluña existe el **programa VINCat** (**Vigilància de les Infeccions Nosocomials a Catalunya**), que realiza una vigilancia continua de la incidencia de infecciones nosocomiales, del consumo de antibióticos y de los perfiles de sensibilidad antimicrobiana a nivel autonómico (233).

3. Rol del laboratorio de microbiología clínica en la detección y el control de la infección nosocomial

Además de disponer de circuitos de comunicación eficaces con los equipos de control de infecciones y de la sensibilidad antimicrobiana actualizada de manera periódica, los CDC recomiendan que los laboratorios cuenten con protocolos de conservación de bacterias MDR. El objetivo es poder realizar **técnicas de tipificación clonal cuando hay sospechas de brotes** y poder así confirmar o descartar la relación epidemiológica reciente entre los casos detectados (227). En el ámbito de la microbiología, **se define como relación clonal aquella existente entre cepas bacterianas genéticamente idénticas que descienden de un ancestro común**.

En este contexto, las técnicas moleculares y, especialmente, **la WGS constituyen el método de referencia para la caracterización clonal**. **Sin embargo, su aplicación en la práctica rutinaria de los laboratorios de microbiología se ve limitada** por factores como el alto coste, la necesidad de infraestructura experimental y soporte bioinformático especializado, así como los tiempos de respuesta elevado**s** (234).

Disponer de técnicas discriminatorias rápidas aportaría un valor añadido al papel del laboratorio de microbiología en el manejo de las infecciones nosocomiales. En este contexto, **la tecnología de espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier** (siglas **FTIR** en inglés, *Fourier transform infrared spectroscopy*) se presenta

como una herramienta de cribado inicial para la caracterización de brotes nosocomiales. Se trata de una técnica que se podría incorporar en la rutina asistencial y facilitaría la toma rápida de decisiones por parte de los equipos de control de infección nosocomial. La presente tesis versa sobre la incorporación de esta técnica en la rutina asistencial y su funcionamiento se detallará más adelante en el apartado 1.6.

1.5. Técnicas de estudio de brotes

1.5.1. Concepto

Según la OMS y los CDC, **un brote epidemiológico se define como una situación en la que se produce un incremento de casos superior al habitual en una región, población y periodo determinados** (235,236). La naturaleza de un brote puede ser muy diversa, abarcando desde un episodio de salmonelosis en un núcleo familiar o un brote de gripe en una residencia de ancianos, hasta situaciones mundiales como la pandemia de COVID-19.

En la práctica hospitalaria habitual, se considera brote por una bacteria MDR la aparición de dos o más casos de infección o colonización causados por el mismo microorganismo MDR, que presentan un **vínculo epidemiológico** y circunscritos a un intervalo de tiempo y lugar determinados. Aunque cada centro o autor puede establecer el umbral de casos que considere oportuno, **tanto los CDC como la OMS utilizan el criterio de dos o más casos como referencia en sus guías** para la identificación de un brote (237,238).

Dentro del ámbito de brotes causados por microorganismos MDR, existen aquellos causados por la transferencia de elementos móviles (como plásmidos conjugativos) que codifican genes de resistencia (239). No obstante, este tipo de brotes no constituye el objeto de estudio de la presente tesis, la cual se centrará exclusivamente en los

brotes de tipo clonal. Según los CDC y el ECDC, **la confirmación de un brote requiere demostrar la relación clonal entre los aislados implicados** mediante técnicas de tipado (227,240). En el contexto de las bacterias, las diferentes técnicas de tipado tienen como objetivo caracterizar y discriminar si diferentes aislados pertenecen o no a un mismo clon (240).

1.5.2. Métodos epidemiológicos convencionales

Las técnicas de tipificación microbiológica, por sí solas, no son suficientes para establecer con certeza la existencia de un brote. **Los resultados microbiológicos requieren siempre del apoyo de criterios epidemiológicos.** La información epidemiológica no solo es fundamental para la detección inicial del brote en aquellas situaciones en las que no se realice vigilancia sistemática mediante técnicas moleculares, sino también para la **interpretación adecuada** de los resultados obtenidos posteriormente.

Los métodos epidemiológicos convencionales constituyen el pilar fundamental e histórico en la investigación de brotes, especialmente si no se dispone de técnicas moleculares. Durante los siglos XVIII y XIX, figuras como Edward Jenner (1749-1823) y John Snow (1813-1858) llevaron a cabo importantes estudios en este ámbito. Jenner, observando la dinámica de los brotes de viruela en Inglaterra, pudo

desarrollar la primera vacuna preventiva. Por otra parte, Snow, investigando los brotes de cólera en Londres, identificó el agua contaminada como la fuente de transmisión. Se considera que las contribuciones de ambos sentaron las bases de la epidemiología actual y del control de enfermedades infecciosas (241).

El objetivo de aplicar los métodos epidemiológicos en un brote es **identificar la magnitud, el origen y las vías de transmisión** del mismo, para establecer las medidas específicas de control. Tanto la OMS como los CDC establecen que las herramientas epidemiológicas se han de **aplicar de forma sistemática y por fases para el manejo del brote**, desde la identificación inicial del brote, las intervenciones de control y la comunicación de los resultados (242,243). Para llevar a cabo adecuadamente las investigaciones epidemiológicas, es fundamental que el hospital disponga de un grupo de control de infecciones. A continuación, se detallan las fases de la investigación epidemiológica de un brote:

1. **Vigilancia activa**

Como se ha explicado en el apartado 1.4.4, la vigilancia epidemiológica activa se basa en la **recopilación sistemática de datos epidemiológicos, clínicos y microbiológicos** (incremento de la incidencia, cambios en los patrones de resistencia, aparición de nuevos casos de microorganismos MDR, etc.) **con el objetivo de identificar un brote de manera precoz** (242,243).

En caso de que haya sospecha de brote, se puede valorar implementar las primeras medidas de control para evitar que se siga expandiendo. Una de las más eficaces y sencillas para los brotes de microorganismos MDR, como se ha comentado, es reforzar la higiene de manos.

2. Definición de caso

Una vez detectado un posible brote, se procede a **establecer una definición de caso que incluya criterios microbiológicos** (por ejemplo, la detección de un determinado microorganismo MDR), **criterios espaciales** (como la detección en una unidad hospitalaria determinada) **y criterios temporales** (la detección en un intervalo temporal conocido como "periodo epidémico"). La definición de caso se puede ir adaptando y optimizando a medida que se obtiene más información de la dinámica del brote (242).

El objetivo de establecer una definición de caso es **maximizar la sensibilidad** identificando aquellos relacionados con el brote ("verdaderos positivos") **y evitar la inclusión de casos no vinculados** con el brote que podrían requerir un uso innecesario de recursos de control ("falsos positivos") (243,244).

Habitualmente, la definición de caso permite clasificar a los pacientes en casos confirmados (cumple criterios y además existe confirmación mediante la correspondiente prueba de laboratorio), probables (cumple todos los criterios, pero no existe confirmación) o

sospechosos/posibles (cumple algunos criterios, pero no existe confirmación) (242,244).

3. Recogida de información epidemiológica

La **recopilación sistemática de información** se realiza mediante la revisión de historias clínicas de los casos o incluso mediante entrevistas al personal sanitario y, en determinados casos, a los propios pacientes o sus familiares. Los datos recogidos suelen incluir antecedentes de hospitalización, procedimientos invasivos realizados, tratamientos antibióticos recibidos, dispositivos médicos empleados, fecha de inicio de los síntomas, recorrido del paciente por las distintas unidades del hospital y posibles contactos con otros pacientes (242).

4. Análisis descriptivo: persona, lugar y tiempo

El análisis descriptivo constituye una de las fases fundamentales de la investigación epidemiológica de brotes. Su objetivo es **caracterizar el brote, establecer un posible origen y determinar las posibles rutas de transmisión**. En esta fase se analiza la dinámica del brote mediante la evaluación sistemática de tres "dimensiones" (242,243):

- **Persona**: Se analizan las características demográficas y clínicas de los pacientes afectados.
- **Espacio**: Se analiza la localización espacial dentro del hospital (unidad, servicio, quirófano, etc.) elaborando mapas de casos (245).

- **Tiempo**: Generalmente se elaboran curvas epidémicas donde se representa la distribución cronológica de los casos.

5. **Investigación ambiental y de procedimientos**

Se deben analizar y evaluar las prácticas asistenciales que podrían estar favoreciendo la transmisión, así como **inspeccionar posibles fuentes ambientales** que puedan actuar de reservorios o de fuente. Generalmente, esta fase suele incluir la **revisión de protocolos** de higiene de manos, la limpieza y desinfección de superficies, la esterilización de material y la evaluación de equipos médicos. Además, las investigaciones se pueden complementar con la recogida de muestras ambientales para cultivos microbiológicos (242,246).

6. **Análisis de la cadena de transmisión**

En esta fase se estudian los factores de riesgo implicados, las rutas de transmisión, la identificación del probable caso índice y de posibles casos secundarios, así como la localización de reservorios. El objetivo principal es **confirmar o descartar las hipótesis planteadas** mediante herramientas como la elaboración de diagramas de flujo, la construcción de mapas de contactos y la realización de análisis epidemiológicos, incluyendo estudios de cohortes o de casos y controles (242,243). Estas metodologías intentan **comprender la dinámica del brote** para poder implementar las medidas de control más eficaces.

7. **Implementar y evaluar las medidas de control implementadas**

Tal como se ha mencionado en la fase de vigilancia activa, en las primeras etapas de un brote pueden aplicarse medidas de control universales; sin embargo, las medidas de control específicas a implementar dependerán del análisis detallado del brote, su magnitud, las rutas de transmisión identificadas, la infraestructura del hospital y los recursos disponibles (243).

Paralelamente, **elaborar indicadores de la eficacia** de las medidas adoptadas resulta crucial para evaluar y determinar su impacto en el manejo y control del brote (247).

8. **Comunicación de resultados**

Finalmente, la última fase consiste en la elaboración de informes y mensajes dirigidos a los servicios o unidades implicadas en el brote detallando los riesgos identificados, las medidas implementadas y la evolución del brote. El objetivo final de esta etapa es **educar y mejorar** futuras actuaciones con el fin de prevenir la aparición de brotes similares (242,243).

Limitaciones de la epidemiología convencional

Aunque la epidemiología convencional continúa siendo una herramienta esencial para la investigación inicial de brotes, presenta **ciertas limitaciones** significativas:

- **Poder discriminatorio**: La investigación basada únicamente en criterios clínicos, temporales y espaciales no permite determinar si las cepas tienen relación clonal entre ellas o si los casos detectados corresponden a múltiples orígenes independientes. Esto puede sesgar las relaciones epidemiológicas y sobreestimar o subestimar la magnitud del brote.
- **Calidad de la información**: Tal y como se ha mencionado anteriormente, los estudios epidemiológicos dependen en gran medida de la información contenida en las historias clínicas de los pacientes (antecedentes, movimientos dentro del centro, procedimientos realizados, etc.). Los registros inexactos, incompletos o de baja calidad dificultan el análisis posterior, la interpretación de resultados, la reconstrucción de las cadenas de transmisión y, en consecuencia, reducen la efectividad de las medidas de control (248).
- **Subjetividad**: Existe un componente inherente de subjetividad derivado de la experiencia y formación del investigador que analiza los datos. Factores como la definición inicial de caso, la selección de variables a registrar o la interpretación de datos recogidos manualmente pueden condicionar las conclusiones y las intervenciones que se realicen (249,250).

A pesar de que los datos epidemiológicos son fundamentales, por sí solos no pueden confirmar o descartar con absoluta certeza un brote epidemiológico, ya que no permiten demostrar la relación clonal

entre los casos implicados. Por lo tanto, no tienen capacidad para validar de manera definitiva las hipótesis sobre el origen y la dinámica de transmisión del brote.

Por esta razón, las guías actuales de la OMS, los CDC y el ECDC recomiendan que los métodos de epidemiología convencional se utilicen de forma **complementaria** a los métodos moleculares y de tipificación microbiológica para una caracterización precisa del brote (227,240).

1.5.3. Métodos moleculares

Los métodos moleculares **constituyen el pilar para demostrar la relación clonal entre aislados** y, por tanto, contribuyen a la confirmación o exclusión de un brote epidemiológico (251,252). A diferencia de la epidemiología convencional, basada en el análisis de persona-lugar-tiempo, **estas técnicas se centran en el estudio comparativo de los genomas bacterianos**, que permite establecer con precisión las relaciones clonales entre los aislados. En general, las técnicas moleculares ofrecen un **elevado poder discriminativo** (capacidad para distinguir si las cepas están relacionadas o no) y una elevada reproducibilidad (permite comparar resultados a lo largo del tiempo, entre distintos centros y con la literatura publicada). Sin embargo, también presentan ciertas desventajas. Suelen implicar un

consumo considerable de **recursos económicos** debido a la necesidad de personal cualificado y reactivos costosos, y suelen ser técnicas laboriosas y prolongadas, resultando en un tiempo de respuesta elevado, limitando por tanto su disponibilidad en todos los centros (234,251).

En la literatura existen numerosos métodos moleculares para la tipificación bacteriana que han ido surgiendo a lo largo de la historia. Entre ellos se encuentran el tipado de la proteína A estafilocócica (en inglés *Spa [staphylococcal protein A] typing*), que se basa en la secuenciación de la región X del gen *spa* (253); los métodos basados en MLVA (del inglés *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*), que analizan el patrón de repeticiones en tándem de secuencias cortas de ADN presentes en varios loci del genoma (254); los métodos basados en PCR-RFLP (del inglés *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), que combina la amplificación por PCR de una región específica del genoma con la posterior digestión mediante enzimas de restricción (255); y métodos basados en AFLP (del inglés *Amplified Fragment Length Polymorphism*), que consisten en la digestión de todo el genoma mediante enzimas de restricción seguida de una posterior amplificación de los fragmentos resultantes mediante PCR (256). No obstante, aunque existen más métodos moleculares que tienen como objetivo tipar bacterias para establecer relaciones clonales, la

presente tesis se centrará exclusivamente en los métodos más conocidos y utilizados en nuestro entorno:

Electroforesis en gel de campo pulsado

Conocida en inglés como ***pulsed-field gel electrophoresis*** (siglas **PFGE**), es una técnica que se basa en el análisis de los patrones de restricción del genoma de la bacteria. Esta técnica fue desarrollada por los investigadores americanos David C. Schwartz y Charles R. Cantor en 1984. La metodología que publicaron permitía separar fragmentos grandes de ADN que la electroforesis convencional no era capaz, mediante cambios periódicos en la dirección del campo eléctrico (257).

En la técnica del campo pulsado, el genoma de cada bacteria se digiere mediante endonucleasas específicas (por ejemplo, *XbaI* o *SmaI*) y los fragmentos resultantes se separan en un gel de agarosa al aplicar un campo eléctrico en pulsos (258). El resultado es un **patrón de bandas determinado** (una especie de "huella cromosómica") que se compara entre los diferentes aislados empleando los **criterios de Tenover** (259). Aunque estos criterios fueron publicados en 1995, todavía son utilizados para clasificar aislados en función de las diferencias entre el patrón de bandas obtenido (260). Este sistema categoriza la comparación de los aislados como (259):

- **Indistinguibles**: No se observan diferencias entre los fragmentos de los diferentes aislados analizados, considerándose que están relacionados (**Figura 23**).
- **Estrechamente relacionados**: Se observan 2-3 diferencias entre los fragmentos de los diferentes aislados.
- **Posiblemente relacionados**: Se observan 4-6 diferencias entre los fragmentos de los diferentes aislados.
- **Diferentes**: Se observan más de 6 diferencias entre los fragmentos de los diferentes aislados, considerándose que las cepas no tienen relación.

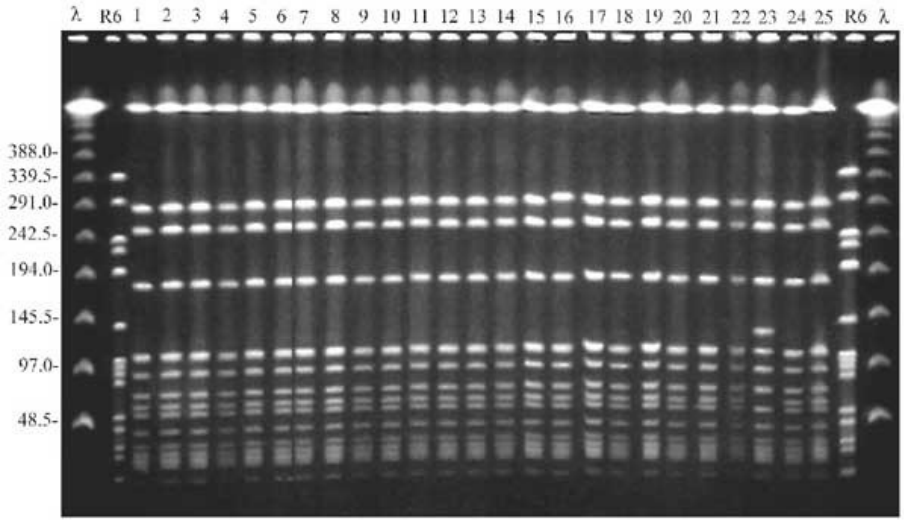


Figura 23: Ejemplo de un brote causado por *S. aureus*. Excepto el aislado número 23, el resto de aislados muestran una relación indistinguible. Los marcadores de peso molecular corresponden al fago lambda (λ) digerido y se expresan en kilobases. Extraído de (261).

Por lo general, la técnica del PFGE ha sido una metodología muy utilizada y ha sido considerada una técnica de referencia con un poder

de discriminación aceptable para identificar relaciones clonales (262). Desde hace décadas se ha utilizado en numerosos brotes nosocomiales producidos por diferentes microorganismos como *K. pneumoniae* productora de BLEE (263), *S. aureus* (264) o *E. faecium* (265). No obstante, **es una técnica cada vez más en desuso** debido a sus inconvenientes que han favorecido su progresivo reemplazo por técnicas de WGS:

- **Procedimiento laborioso y** técnicamente más **exigente** que la misma WGS, generando un tiempo de respuesta prolongado (266).
- **Reproducibilidad limitada entre centros** y estudios: Pequeñas variaciones experimentales pueden generar diferencias significativas en los patrones obtenidos, lo que obliga a la utilización de protocolos estandarizados para homogeneizar y permitir la comparación de resultados (262,267).

  Existen redes internacionales dedicadas a la estandarización de la PFGE, como *PulseNet*, creada por los CDC en 1996, aunque su aplicación se centra principalmente en infecciones de transmisión alimentaria (268).
- **Interpretación parcialmente subjetiva**: La comparación de patrones de bandas depende, en parte, de la experiencia del analista. Existen programas de análisis digital que facilitan este proceso (269).
- **Poder de resolución inferior a las técnicas de WGS**: Mientras que la PFGE permite detectar diferencias en el patrón de restricción, las

técnicas actuales de WGS tienen la capacidad de detectar variaciones puntuales en los nucleótidos (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs) y establecer relaciones filogenéticas con mayor precisión.

Multilocus Sequence Typing

Las técnicas de *Multilocus Sequence Typing* (siglas **MLST** en inglés) se basan en el **análisis de polimorfismos presentes en un conjunto de, generalmente, siete genes conservados** (en inglés denominados ***housekeeping genes***), aunque en algunos casos el número puede llegar a ser de hasta nueve (270). Este método fue desarrollado en 1998, siendo *Neisseria meningitidis* el primer microorganismo al que se aplicó (271).

En términos metodológicos, el procedimiento se lleva a cabo de la siguiente manera: se secuencian fragmentos de aproximadamente 400-500 pares de bases de cada uno de los genes presentes en el esquema (272,273) y a cada secuencia única identificada se le asigna un número alélico específico. La combinación de los números alélicos obtenidos define un tipo de secuencia (***Sequence Type***, **ST**) (**Figura 24**) (274). Cuando varios ST difieren únicamente en uno de los siete genes del esquema, se considera que son cepas que comparten un ancestro común y se denominan **complejo clonal** (en inglés ***clonal complex***, **CC**) (157,275).

ST	arcC	aroE	glpF	gmk	pta	tpi	yqiL
188	3	1	1	8	1	1	1

Figura 24: Ejemplo combinación alélica de los genes *arcC* (3), *aroE* (1), *glpF* (1), *gmk* (8), *pta* (1), *tpi* (1) y *yqiL* (1) para *S. aureus*, que corresponde al ST188. Extraído de (274).

Tradicionalmente, el método consiste en utilizar cebadores (en inglés *primers*) específicos de los genes del esquema MLST correspondiente y posteriormente secuenciarlos mediante el método Sanger (272). Actualmente, una alternativa cada vez más utilizada es obtener el ST mediante los datos obtenidos por las técnicas de WGS (ver apartado siguiente).

Como se ha mencionado en el apartado 1.1.1 y 1.3.2, estos esquemas permiten asignar los distintos tipos de ST en *K. pneumoniae* y *E. faecium,* a partir de los cuales es posible determinar posibles linajes clonales. No obstante, actualmente existen esquemas de MLST disponibles en la base de datos de acceso público PubMLST (https://pubmlst.org/) para al menos 144 especies bacterianas, según la información disponible en el momento de la redacción de esta tesis (276).

A diferencia del PFGE, las técnicas MLST generan **resultados y nomenclaturas estandarizadas a nivel internacional** (266,273). Los datos obtenidos pueden almacenarse de forma fácil y estructurada, lo que permite su estandarización y comparación entre distintos laboratorios, regiones y trabajos existentes en la literatura,

así como en el mismo laboratorio en diferentes periodos de tiempo. Debido a estas ventajas, se trata de una herramienta que tiene una utilidad en la vigilancia epidemiológica molecular ya que permite el seguimiento de determinados clones y complejos clonales a escala mundial, como por ejemplo el ST307 de *K. pneumoniae* o el CC17 de *E. faecium*.

Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones. En el contexto de un brote, su **poder de discriminación es inferior al del PFGE**; habitualmente, los casos asociados a un mismo brote comparten el mismo ST, ya que derivan de un mismo clon, pero que dos cepas compartan ST no implica necesariamente que pertenezcan al mismo brote (por ejemplo, el ST307 de *K. pneumoniae* se encuentra ampliamente distribuido entre los hospitales de España). En este sentido, el MLST puede emplearse como herramienta de cribado, dado que compartir el mismo ST presenta un alto valor predictivo negativo, pero un bajo valor predictivo positivo.

Whole Genome Sequencing

La técnica de secuenciación del **genoma completo** (en inglés *Whole Genome Sequencing*, WGS*)* permite determinar prácticamente la totalidad de la secuencia genómica de un microorganismo.

A partir de la secuencia genómica obtenida del microorganismo de interés, se pueden realizar múltiples aplicaciones en el ámbito de la microbiología (277), entre las que se incluyen:

- **Clasificación taxonómica** precisa del microorganismo.
- **Epidemiología genómica de alta resolución**: mediante estudios de genómica comparativa, se compara la secuencia genómica de interés con otras secuencias de estudio para detectar similitudes y diferencias en los genomas (278).
- Elaborar **árboles filogenéticos** que permiten inferir el ancestro común más probable de las cepas estudiadas (278). De acuerdo con las directrices del ECDC, **la WGS y el posterior estudio de epidemiología genómica se considera el método de referencia para determinar la relación genómica** entre cepas de bacterias MDR involucradas en brotes nosocomiales (227,240).
- Caracterización genómica para **identificar genes y mutaciones asociadas a resistencia a los antimicrobianos** (por ejemplo, permite caracterizar BLEE o carbapenemasas), **así como factores de virulencia** (por ejemplo, permite caracterizar la cápsula bacteriana) para predecir su fenotipo (279).

No obstante, dado las múltiples aplicaciones de las técnicas de WGS, la presente tesis solo se centrará en el estudio de brotes bacterianos.

Como se ha mencionado anteriormente, durante más de 20 años los laboratorios de microbiología han empleado la tecnología del PFGE para la investigación de brotes bacterianos. No obstante, en los últimos años, las técnicas de WGS han revolucionado la capacidad de resolución ya que ofrecen **información mucho más precisa y detallada** (278,280), que ayudan a optimizar y orientar de forma más eficaz las

intervenciones de los equipos de control de infecciones. Por ejemplo, si mediante WGS se confirma la ausencia de clonalidad en un brote, pueden finalizarse las medidas de aislamiento, reabrirse unidades y suspenderse cribados en los pacientes, con el consiguiente ahorro de recursos y la minimización del impacto asistencial (281). En la literatura, se han publicado numerosos estudios que han demostrado la utilidad de la WGS como herramienta de apoyo a las investigaciones epidemiológicas convencionales en situaciones de brote por diversas bacterias (282–287).

A continuación, se detallarán las distintas fases del proceso de WGS:

1. Procedimiento experimental

La secuencia genómica se obtiene mediante **tecnologías de secuenciación de nueva generación** (en inglés ***Next Generation Sequencing***, **NGS**) que pueden generar millones de **lecturas** (en inglés ***reads***) o secuencias en paralelo. Estas tecnologías de NGS pueden clasificarse en (**Figura 25**):

- **NGS de 2ª generación**: generan **lecturas cortas** de cientos de pares de bases, e incluye las tecnologías de **Roche-454®** (Roche, Basilea, Suiza), **Ion Torrent®** (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, Estados Unidos) e **Illumina®** (Illumina Inc., San Diego, California).
- **NGS de 3ª generación**: generan **lecturas largas** de hasta millones de pares de bases, e incluye las tecnologías de **PacBio®** (Pacific

Biosciences, California, Estados Unidos) y **Nanopore®** (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, Reino Unido) (270,278).

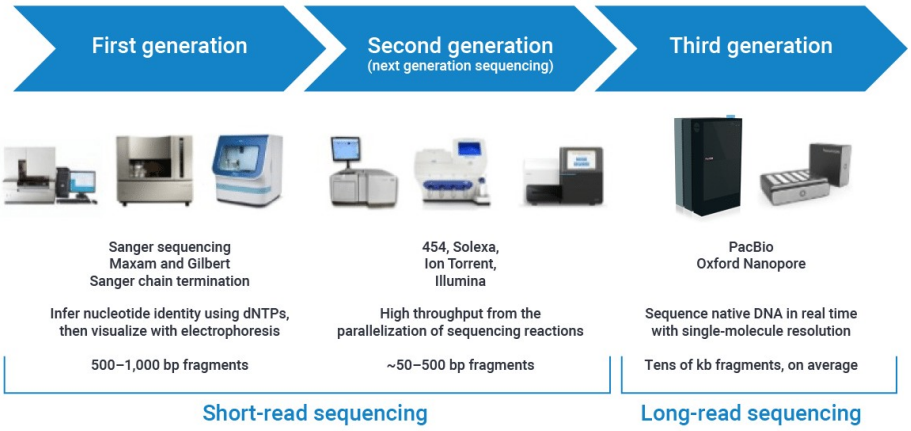


Figura 25: Distintas generaciones de secuenciación y equipos representativos. Extraído de (288).

A su vez, **el proceso experimental de NGS se subdivide en tres pasos** (277), que serán detallados a continuación para la secuenciación de lecturas cortas mediante la tecnología de Illumina®, más comúnmente utilizada en nuestro entorno (289), así como en la presente tesis:

1.1. **Fragmentación del ADN genómico** previamente extraído: Este paso puede realizarse mediante métodos físicos o químicos, y su objetivo es obtener fragmentos de ADN de menor tamaño y homogéneos.

1.2. **Preparación de librerías**: El ADN previamente fragmentado es **marcado con oligonucleótidos que actuarán como identificadores únicos**. Dichos identificadores permitirán multiplexar diferentes muestras en una misma carrera de secuenciación y también facilitarán

la posterior fijación de los fragmentos a la superficie donde tendrá lugar la reacción de secuenciación.

1.3. **Secuenciación masiva** en paralelo de los fragmentos finales: En este punto tiene lugar la inmovilización de los fragmentos sobre una superficie sólida (*flowcell*) seguida de la **amplificación clonal en puente** (***bridge amplification***). Los cebadores necesarios para iniciar la amplificación se encuentran fijados a la superficie y son complementarios a los identificadores añadidos durante la preparación de librerías. Finalmente, los fragmentos amplificados se someten a la reacción de secuenciación propiamente dicha, denominada **secuenciación "por síntesis"**; a partir de una molécula de ADN que actúa como molde, se van incorporando secuencialmente los distintos nucleótidos (adenina, guanina, timina y citosina) y en cada incorporación se emite una señal luminosa que es registrada por el equipo. Los nucleótidos de la reacción se encuentran modificados y contienen un terminador reversible que impide que se incorpore más de una base por ciclo de amplificación. Tras cada ciclo, se elimina el terminador y se incorpora el siguiente nucleótido, obteniéndose así la cadena complementaria.

2. Análisis bioinformático

Los fragmentos individuales de secuencias generados por el secuenciador (*reads*) deben **ensamblarse** como paso previo para la

mayoría de los análisis genómicos posteriores. El ensamblado consiste en detectar las regiones de nucleótidos idénticas o muy similares entre las lecturas obtenidas y unirlas progresivamente para obtener secuencias de mayor longitud y **reconstruir así el genoma completo**. Para determinadas metodologías de análisis bioinformáticos, como el *Split Kmer Analysis*, no es necesario un ensamblado previo, ya que el análisis se basa en las lecturas "crudas" (detallado más adelante).

Existen dos métodos para el ensamblado:

A) **Ensamblado "*de novo*"***:* Se reconstruye el genoma mediante el **solapamiento de lecturas** idénticas o muy similares entre sí sin necesidad de disponer de un genoma de referencia. Este tipo de ensamblado es útil cuando se analizan regiones genómicas que contienen mutaciones relevantes respecto a un genoma de referencia y también para detectar variantes estructurales del genoma.

B) **Ensamblado por mapeo frente a un genoma de referencia**: Consiste en reconstruir el genoma alineando las lecturas obtenidas con la ayuda de un genoma de referencia. A partir de este alineamiento (enfrentar dos secuencias para identificar las regiones de similitud), se genera una **secuencia consenso** (secuencia representativa que se obtiene a partir del alineamiento de dos o más secuencias de ADN al combinar sus regiones solapadas) que representa el genoma del microorganismo analizado.

Esta metodología es útil cuando existe un genoma de referencia similar y bien caracterizado.

La **calidad de los genomas reconstruidos obtenidos depende de parámetros como la cobertura y la profundidad**. La cobertura hace referencia al número de lecturas que se alinean y solapan una posición concreta del genoma. Cuanto mayor sea el valor, **mayor será la proporción del genoma secuenciado** respecto al genoma total del microorganismo. La profundidad corresponde al número de veces que se ha secuenciado una base en cada posición; cuanto mayor sea el valor, más veces estará dicha base secuenciada en los *reads* obtenidos y **mayor fiabilidad** tendrá el genoma reconstruido (270).

La NGS permite analizar de forma simultánea millones de fragmentos individuales, lo que proporciona una elevada profundidad de lectura, pero **generalmente, las tecnologías de lectura corta presentan una mayor profundidad;** generan un número más elevado de lecturas, lo que aumenta la probabilidad de que una misma base sea leída múltiples veces y, por tanto, aumenta la precisión del consenso y la fiabilidad en la detección de variantes (cambios entre las secuencias de ADN de distintos aislamientos de un mismo microorganismo). Por el contrario, también implica una mayor probabilidad de que existan regiones repetitivas del genoma para las que no pueda obtenerse una secuencia de calidad debido a la forma en que se solapan los fragmentos en el posterior análisis bioinformático de las lecturas crudas de secuenciación, ya que al generarse fragmentos de un

tamaño máximo de unos 300 pb imposibilitará que se mapeen secuencias repetidas a su ubicación genómica específica. En este contexto, las lecturas cortas como la tecnología de Illumina® es especialmente **útil en la investigación de brotes** ya que la detección de variantes e identificación de diferencias nucleotídicas entre aislamientos es esencial para establecer relaciones de transmisión (véase el principio del apartado de WGS) (277).

En las técnicas de **lectura larga ocurre lo contrario; la cobertura suele ser superior**, ya que es menos probable que queden regiones sin cubrir al generar fragmentos de millares de pares de bases que solapan fácilmente. Sin embargo, este tipo de tecnologías suele tener menor profundidad ya que se obtienen un menor número de lecturas (**Figura 26**) (277,290).

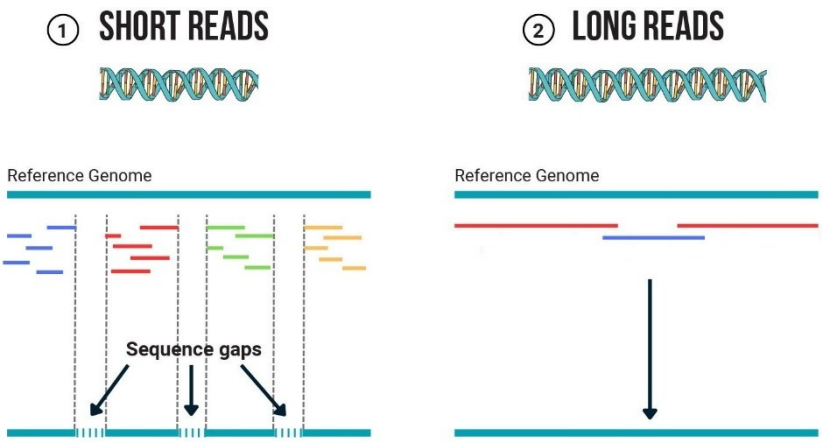


Figura 26: Diferencias entre las técnicas de secuenciación de lecturas cortas y lecturas largas en cuanto a la longitud de las lecturas generadas, la profundidad y la cobertura del genoma y la capacidad para resolver regiones repetitivas y evitar gaps en el ensamblado. Adaptado de (291).

Una vez obtenidas las secuencias genómicas, se pueden realizar distintos tipos de análisis bioinformáticos, que se describen a continuación:

1. **MLST**

Como se ha explicado en el apartado anterior, analizando un conjunto de genes conservados presentes en todas las cepas de una especie bacteriana (**Figura 27**), se puede determinar el ST. Aunque históricamente se han empleado métodos de secuenciación específicos, lo más habitual en la actualidad es obtener el ST mediante técnicas de WGS (272). Las secuencias obtenidas para cada uno de los genes presentes en el esquema MLST se **comparan con bases de datos que contienen las secuencias específicas de cada alelo** de cada gen. El alelo (número) se asigna cuando la secuencia del gen presente en la muestra coincide exactamente con una secuencia presente en la base de datos. No obstante, como se ha explicado, **no es un método suficientemente resolutivo** para diferenciar cepas en un brote epidemiológico (277).

2. ***Core genome Multi Locus Sequence Typing*** y ***whole genome Multi Locus Sequence Typing***

El *core genome Multi Locus Sequence Typing* (siglas **cgMLST**) es una técnica de tipificación que analiza los genes del genoma central (genoma *core*) presente en la mayoría de las bacterias de una especie determinada (**Figura 27**). La comparación de los diferentes alelos

(variantes de un mismo gen) de los genes centrales permite establecer relaciones entre aislados y determinar su grado de similitud genética (270). A diferencia de la metodología MLST, que analiza un conjunto reducido de genes, **el cgMLST analiza un genoma *core* constituido por miles de genes**, lo que le confiere un mayor poder de resolución. Existen esquemas cgMLST para multitud de microorganismos, entre los cuales se encuentran *K. pneumoniae* (analiza un genoma *core* de 2.358 genes) y *E. faecium* (analiza un genoma *core* de 1.423 genes) (292).

Por su parte, el **wgMLST** (*whole genome Multi Locus Sequence Typing*) es similar al cgMLST pero **analiza la totalidad del genoma incluyendo el genoma accesorio** (genoma que no está siempre presente y que puede variar entre distintos aislados de la misma especie bacteriana (293)) (**Figura 27**). Al igual que el cgMLST, el análisis wgMLST requiere de esquemas de genes, en este caso, accesorios que se analizan en conjunto con los genes *core*. Existen esquemas de genes accesorios para diversos microorganismos entre los que se incluyen *K. pneumoniae* (2.526 genes accesorios) y *E. faecium* (1.124 genes accesorios) (292). Al incluir la totalidad del genoma (*core* y accesorio), el wgMLST ofrece una resolución aún mayor que el cgMLST para discriminar relaciones genéticas (270). **Tanto en el análisis cgMLST como wgMLST la distancia genómica entre aislamientos se calcula mediante diferencias alélicas**, es decir mediante el número de diferentes variantes genómicas en los genes presentes en el esquema.

Como ventajas, ambos métodos ofrecen una resolución superior (en particular el wgMLST) en comparación con el MLST y la PFGE, **disponen de esquemas estandarizados y generan resultados reproducibles y comparables** tanto a nivel intra- como inter-laboratorio. Además, cuentan con programas bioinformáticos específicos (por ejemplo, MBioSEQ Ridom Typer (Massachusetts, Estados Unidos)) que facilita la ejecución y estandarización de los análisis (294).

Ambos métodos se han utilizado en la literatura para analizar brotes causados por *K. pneumoniae, K. oxytoca, E. faecium, M. tuberculosis, Acinetobacter baumannii, S. aureus, Salmonella enterica*, etc., obteniendo buenos resultados que han complementado y apoyado las investigaciones realizadas mediante la epidemiología convencional (295–298).

No obstante, la principal limitación de estas metodologías es que, aunque los esquemas están estandarizados, **no existe un criterio universalmente aceptado para establecer el umbral que determine si dos aislados están genéticamente relacionadas o no** (277,297). Por ejemplo, para *K. pneumoniae* existen trabajos que emplean un umbral de 4 diferencias alélicas (297), mientras que otros utilizan rangos de 5 a 10 diferencias alélicas (296), e incluso otros trabajos emplean umbrales de 10 diferencias (293). En un estudio multicéntrico de Cataluña publicado en 2020, se utilizó un umbral de 15 diferencias alélicas (299); el mismo valor utilizado en esta tesis. Por otro lado, para *E. faecium* hay estudios que emplean un umbral de 9 diferencias

alélicas (300) mientras que otros utilizan 20-25 diferencias alélicas (293,301,302). La razón principal por la que **no existe un valor de corte universal es que este depende de múltiples factores**, entre ellos la especie bacteriana analizada, el intervalo temporal transcurrido entre los aislamientos implicados en un brote, su capacidad de recombinación genética y, especialmente, la información epidemiológica, la cual debe integrarse de forma conjunta con los resultados genómicos para garantizar una interpretación adecuada de los datos.

Otra desventaja de estos métodos es que, aunque suelen tener resultados concordantes con los obtenidos mediante análisis de SNPs (303,304), pueden presentar un poder de resolución inferior a estos últimos (295). En este contexto, algunos autores plantean la posibilidad de utilizar inicialmente estos métodos más sencillos y, en caso de que los resultados no sean concluyentes con la epidemiología convencional, proceder con un análisis más exhaustivo y resolutivo mediante SNPs (298).

3. *Filogenia basada en core genome y whole genome **Single Nucleotide Polymorphisms***

Los ***Single Nucleotide Polymorphisms*** (o **SNPs**) son variaciones genéticas generadas por una **sustitución de una base nucleotídica en una posición específica del genoma respecto a otro genoma** o respecto a un genoma de referencia (270,304). En el primer caso el

análisis se denomina en inglés *pairwise genome comparison* y en el segundo se denomina *reference-based SNP calling* o *reference mapping.* Para estos análisis, las secuencias genómicas de las cepas problema o referencia se alinean entre sí y se comparan base por base con el fin de detectar las variaciones de nucleótidos presentes en cada posición, lo que permite determinar el número exacto de SNPs existentes entre aislados. Estos métodos basados en SNPs se caracterizan por su **elevada resolución**, ya que pueden analizar tanto genoma core (**cgSNP**) como todo el genoma bacteriano (**wgSNP**) (**Figura 27**), incluyendo tanto las regiones codificantes como las no codificantes (270).

Al igual que los métodos cgMLST y wgMLST, los enfoques basados en SNPs se han utilizado ampliamente en la literatura para análisis de brotes causados por diversidad de microorganismos: *P. aeruginosa*, *A baumannii*, *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. faecium, M. tuberculosis, etc.* (293,303–306).

No obstante, como se ha comentado para cgMLST y wgMLST, los métodos basados en SNPs presentan la **desventaja de la ausencia de un umbral universal (o *cut-off*) de SNPs que defina una relación genómica clonal**. Por ejemplo, para *K. pneumoniae* hay estudios que aplican un umbral de 16-18 SNPs (293,307), mientras que trabajos más recientes publicados en 2025, emplean umbrales de 5 a 10 SNPs (305,308). En el caso de *E. faecium*, algunos autores han propuesto un

umbral de 16 SNPs (293), mientras que otros trabajos más recientes han establecido umbrales de 7 a 10 SNPs (301,302).

Tanto los análisis de cgSNP como wgSNP, **se complementan habitualmente con una reconstrucción filogenética** basada en los SNPs identificados. Se trata de una representación gráfica que permite analizar si los distintos aislados presentan una distancia genómica inferior al umbral de SNPs establecido y se agrupan dentro de un mismo clado. Esta agrupación indicaría que comparten un origen monofilético reciente, así como una relación clonal y de transmisión epidemiológica reciente.

Por lo tanto, de la misma manera que cgMLST y wgMLST, el punto de corte para las metodologías basadas en SNPs también debe ser establecido considerando la especie bacteriana, su capacidad de recombinación genética, el tiempo transcurrido entre los aislamientos y la información epidemiológica (270,293).

Otra limitación de los análisis basados en SNPs es que, cuando se realizan en base a un genoma de referencia, la elección de este genoma constituye un factor crítico; en el caso de emplear este método, es fundamental seleccionar un genoma de referencia lo más genéticamente similar a los aislados a estudiar del brote para garantizar un alineamiento óptimo y minimizar los errores en la detección de SNPs. No obstante, no siempre se dispone de un genoma

de referencia óptimo, lo que puede reducir la precisión de los resultados y la reproducibilidad entre estudios (304).

4. ***Split Kmer Analysis***

Mediante esta metodología **se comparan secuencias de longitud fija *k*, denominadas *kmer***, entre muestras. Los pares de *kmers* que se dividen en dos partes iguales separadas por una base central que difiere entre el par, se conocen como ***split kmer*** (SKA) (**Figura 27**). Cada *split kmer* se contabiliza como un SNP (277,309,310).

Esta metodología permite detectar polimorfismos **de forma rápida y sin necesidad de ensamblar las lecturas ni de utilizar genomas de referencia** y, por ello, requiere de menos recursos bioinformáticos que los análisis genómicos del apartado anterior (302,310). Sin embargo, **al tratarse de un método más sencillo, también presenta una precisión inferior** (310).

Aunque algunos autores describen este tipo de análisis como prometedor, es un método menos empleado en el estudio de brotes de acuerdo con la literatura, ya que existe **poca experiencia** o los resultados reportados son contradictorios. Por ejemplo, mientras que hay estudios que indican que para el estudio de brotes causados por *E. faecium* SKA es un buen método, hay otros estudios más recientes que observan una tasa de falsos negativos del 14,7% para esta bacteria (310).

Como limitaciones adicionales, vuelve a surgir la **inexistencia de un umbral universal** para determinar la relación genómica clonal. Además, a diferencia de los enfoques cgMLST y wgMLST, SKA no dispone de esquemas estandarizados y trabaja directamente sobre las lecturas sin ensamblar, por lo que depende en mayor medida de la calidad de los *reads*.

Por lo tanto, aunque SKA es un método que aún requiere de más estudios que respalden su utilidad, algunos autores consideran que puede constituir una herramienta inicial de cribado rápido en situaciones en las que no se disponga de los recursos necesarios para llevar a cabo análisis de SNPs de mayor resolución (310).

En este contexto, la concordancia entre diferentes métodos de tipado bacteriano puede evaluarse mediante diversos índices estadísticos que permiten comparar los agrupamientos obtenidos. Entre los más utilizados se encuentran el índice de Rand ajustado (*Adjusted Rand*, AR) y el índice de Wallace ajustado (*Adjusted Wallace*, AW). El índice de Rand mide el grado global de concordancia entre dos particiones de un mismo conjunto de aislados, mientras que el índice de Wallace estima la probabilidad de que dos aislados clasificados conjuntamente por un método también lo estén según otro método.

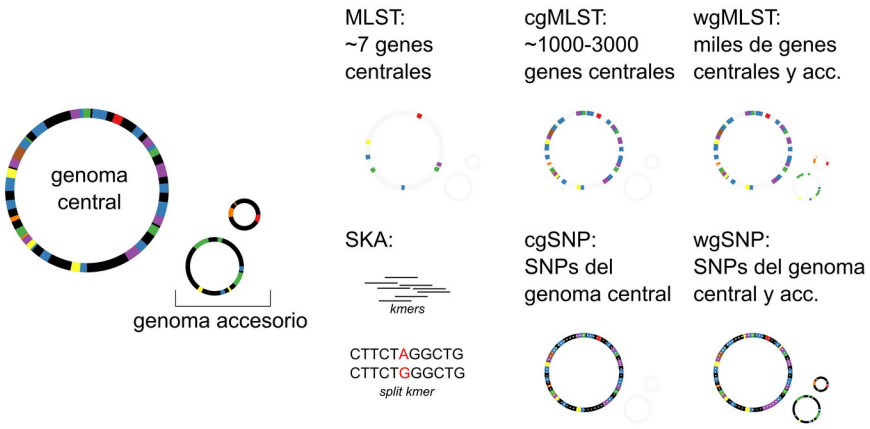


Figura 27: Representación esquemática de los distintos análisis bioinformáticos descritos basados en WGS. Con el fin de ilustrar las diferentes metodologías, el genoma accesorio se representa mediante plásmidos; no obstante, otros elementos móviles, como fagos, islas de patogenicidad o genes de resistencia antibiótica, también pueden formar parte del genoma accesorio e incluso integrarse en el cromosoma.

1.5.4. Necesidad de métodos rápidos y eficientes

Como se ha expuesto en el apartado anterior 1.5.3, existen numerosos métodos moleculares que han sido fundamentales en el estudio de brotes epidemiológicos. Actualmente, la WGS se considera la herramienta con mayor poder resolutivo para delimitar brotes, reconstruir cadenas de transmisión y orientar las intervenciones de los equipos de control de infecciones.

No obstante, tanto las técnicas de PFGE como las metodologías basadas en WGS pueden requerir tiempos de respuesta de varios días

o incluso semanas desde el inicio del procedimiento hasta la interpretación de los resultados. Concretamente para la WGS, además hay que disponer de la **infraestructura** necesaria para llevar a cabo la parte experimental y de análisis bioinformático, incluyendo a **personal técnico cualificado** y **especialistas** en genómica microbiana y bioinformática de manera que pueda llevarse a cabo tanto la implementación de esta tecnología como la interpretación correcta de los resultados (277,281,295). Por lo tanto, los **tiempos de respuesta y los costes asociados** a estas técnicas pueden limitar su aplicación en la rutina de un laboratorio asistencial de microbiología o impedir su disponibilidad en todos los centros.

De aquí surge el **interés por investigar metodologías alternativas rápidas y coste-efectivas que puedan integrarse en la práctica asistencial diaria** y ofrecer una respuesta ágil a las necesidades de los equipos de control de infección nosocomial en la investigación de brotes, como sería la tecnología basada en la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier.

1.6. Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier

1.6.1. Fundamento de la tecnología FTIR

La **espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier** (en inglés **FTIR**; *Fourier Transform Infrared*) es un **método fenotípico** utilizado históricamente en los ámbitos de la industria química y alimentaria para determinar la composición molecular de diferentes tipos de muestras (311). Otras aplicaciones consisten en, por ejemplo, la detección de contaminantes, bacterias o químicos en el agua (312). No obstante, la presente tesis se centrará exclusivamente en la aplicabilidad de la tecnología FTIR en el campo de la microbiología clínica.

Se trata de una herramienta analítica basada en la energía de vibración y rotación que presentan los átomos de una molécula cuando es expuesta a **radiación infrarroja**. Esta radiación excita los enlaces químicos de los grupos funcionales presentes en la bacteria, tales como hidratos de carbono, lípidos y proteínas, generando diferentes señales en forma de "picos" en el espectro. Estos picos se denominan bandas de absorción y su magnitud depende de la concentración relativa de cada molécula en la muestra (312). **El conjunto de estas bandas es lo que constituye un espectro de absorbancia, que es característico de cada microorganismo** (**Figura 28**) (313–317).

La transformada de Fourier fue desarrollada por el matemático y físico francés Jean-Baptiste Joseph Fourier (1768-1830), quien introdujo el análisis de funciones periódicas mediante su descomposición en series de senos y cosenos de distintas frecuencias, conocidas como series de Fourier. Este principio constituye la base de **la transformada de Fourier**, **una herramienta matemática para el análisis de señales**.

La tecnología FTIR analiza el **rango de longitudes de onda** correspondiente a la región del infrarrojo del espectro electromagnético comprendido entre **4.000 y 400 cm^{-1}**. Dentro de este intervalo se distinguen **cinco subregiones principales**, cada una asociada a distintos componentes celulares (**Figura 28**) (313):

1. **Región de los lípidos**: Corresponde al intervalo comprendido entre 3.000 y 2.800 cm^{-1} y está principalmente influida por las vibraciones asociadas a los ácidos grasos.
2. **Región de las proteínas y péptidos**: Desde 1.800 a 1.500 cm^{-1}. Condicionada por las bandas amida I (estiramiento de los enlaces carbono-oxígeno) y amida II (flexión de los enlaces nitrógeno-hidrógeno).
3. **Región mixta**: Desde 1.500 a 1.200 cm^{-1}. Se trata de una región donde determinadas proteínas (grupos amida III), ácidos grasos y grupos fosfato emiten absorbancia.

4. **Región de los polisacáridos**: Desde 1.200 a 900 cm^{-1}. Es una región que está principalmente influenciada por los **carbohidratos presentes en la pared celular bacteriana**.
5. **Región de "huella dactilar"**: Desde 900 a 700 cm^{-1}. Se relaciona con espectros de absorbancia específicos de determinadas bacterias. Sin embargo, hasta la fecha no se ha logrado asignarlos de forma concluyente a componentes celulares o grupos funcionales concretos, lo que limita su análisis en estudios microbiológicos debido a la ausencia de correlación bioquímica clara (313).

Según diversos autores, para los análisis de tipificación y caracterización bacteriana, las regiones del espectro con **mayor poder discriminativo se encuentran entre 1.300 y 800 cm^{-1}**, ya que en este intervalo se localizan las señales influenciadas por los polisacáridos, los cuales derivan principalmente de los **hidratos de carbono presentes en la pared celular** (318,319).

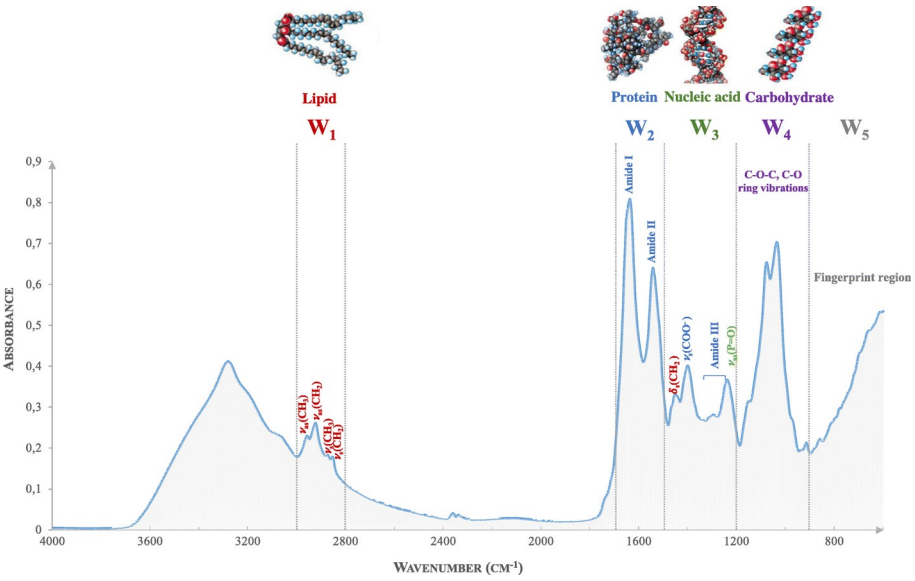


Figura 28: Espectro de absorbancia FTIR correspondiente a una cepa de *K. pneumoniae*. Se distinguen las cinco subregiones principales del espectro (W_1-W_5), cada una asociada a un intervalo de longitud de onda y a diferentes componentes moleculares, tal y como se ha descrito en el texto. Extraído de (313).

Los primeros estudios aplicando la espectroscopia de infrarrojos en microorganismos se publicaron en los años 1950 (320). A partir del 1965, aproximadamente, se desarrollaron los primeros espectrómetros basados en la Transformada de Fourier, que mejoraron el análisis espectral de infrarrojos al aportar mayor sensibilidad y velocidad (313,321). Sin embargo, no fue hasta la década de 1990 que se establecieron los principios de la técnica en la microbiología, las condiciones experimentales y las posibles aplicaciones (322).

A partir de entonces, una utilidad de esta técnica en el ámbito de la microbiología ha sido su capacidad para la identificación y caracterización de microorganismos. Los diversos estudios, así como las aplicaciones en microbiología se analizarán detalladamente en el apartado 1.6.4.

1.6.2. Modos de obtención de espectros

El procedimiento mediante el cual interacciona la luz infrarroja con la muestra, se detecta la señal por el equipo y la transforma en un espectro interpretable se denomina la **adquisición de un espectro**. En la espectroscopia FTIR, existen diversos tipos o modos de adquisición de espectros. Para la caracterización bacteriana, los más conocidos son **transmitancia**, la **reflectancia difusa** y la **reflexión total atenuada**. A continuación, se detallan las características de cada uno:

Transmitancia

El modo de transmitancia ha sido el **más empleado** históricamente para la adquisición de espectros FTIR. **La energía de infrarrojos atraviesa la muestra y se detecta la cantidad de radiación absorbida**. En el ámbito de la microbiología, se requiere una preparación estandarizada de la muestra, la cual consiste en elaborar una suspensión bacteriana que se deposita sobre una placa óptica. Posteriormente se deja secar la muestra hasta formar un *biofilm*, el

cual será atravesado por un haz de infrarrojos y analizada por el equipo (**Figura 29**) (312,313).

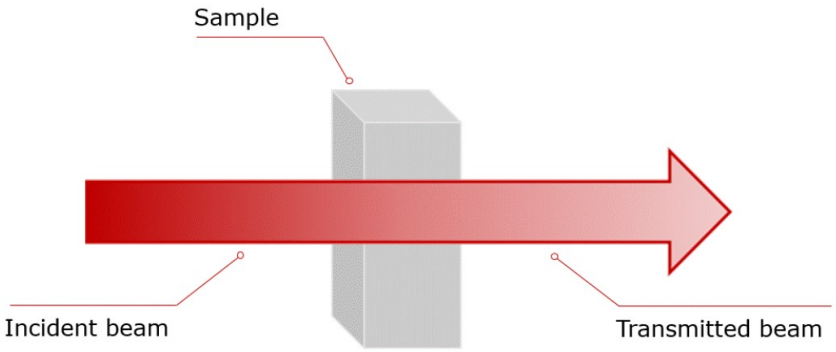


Figura 29: Modo de transmitancia en la adquisición de espectros FTIR. La radiación infrarroja emitida por la fuente atraviesa la muestra y, tras transmitirse, es registrada por el detector para generar el espectro correspondiente. Extraído de (323).

Como ventajas, permite obtener **espectros de elevada calidad y con picos bien definidos**. A su vez, es una técnica con alto rendimiento ya que puede analizar múltiples muestras a la vez. No obstante, requiere una preparación previa de las muestras en la placa óptica (aproximadamente 2-3 horas por placa) y puede existir una variabilidad en los espectros obtenidos debido a las diferencias en la cantidad o en el espesor de la suspensión bacteriana depositada en la placa óptica (312,313). Debido a esta variabilidad, algunos fabricantes recomiendan realizar diversas réplicas técnicas de cada muestra depositadas en la misma placa.

Uno de los espectrómetros más conocidos que utiliza este modo y que está comercializado en España es el equipo **IR Biotyper®** de la empresa Bruker Corporation (Massachusetts, Estados Unidos). **A lo largo del desarrollo de esta tesis ha sido el equipo que se ha evaluado y utilizado.** Existen otros analizadores de transmitancia pero que se reservan para uso de investigación o no pertenecen al ámbito de la microbiología clínica. Entre ellos se encuentran el IRis-F1 de la empresa IRsweep (Zúrich, Suiza) y el Nicolet iS50 de la empresa Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, Estados Unidos). Este último tiene la capacidad de operar tanto en modo de transmitancia como en reflexión total atenuada.

Reflectancia difusa

Conocida en inglés por las siglas **DRIFTS** (*Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy*). El modo de reflectancia difusa se emplea principalmente para el análisis de pequeñas cantidades de muestras sólidas, tales como granulados, polvos o liofilizados. En vez de transmitir la radiación a través de una muestra, la radiación penetra parcialmente en las partículas y, debido a su irregularidad y porosidad, se dispersa en múltiples direcciones (**Figura 30**) (312).

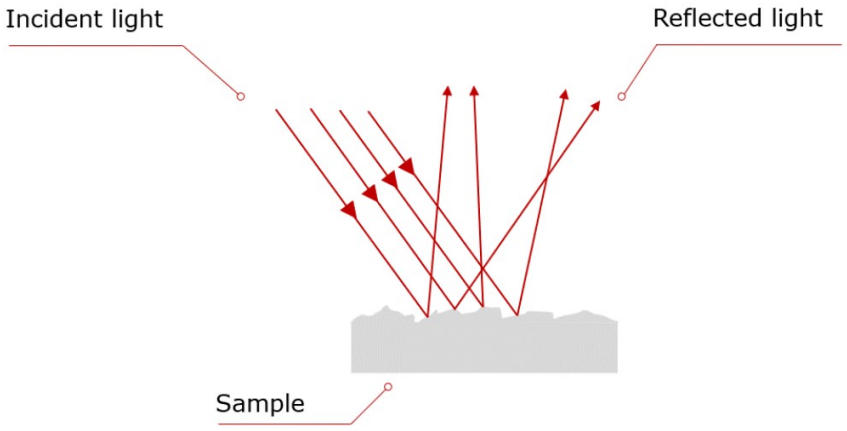


Figura 30: Modo de reflectancia difusa en la adquisición de espectros FTIR. La radiación infrarroja incide sobre la muestra y se dispersa en múltiples direcciones. Extraído de (323).

No obstante, **su uso en bacterias ha sido limitado y apenas se ha implementado** en estudios microbiológicos debido principalmente a costes económicos (accesorios específicos de reflectancia) y limitaciones técnicas (requiere disponer de las bacterias en forma de polvo seco o liofilizado para garantizar la señal adecuada) (313).

Reflexión total atenuada

Conocida en inglés por las siglas **ATR** (*Attenuated Total Reflectance*). En esta técnica, la muestra se deposita sobre un cristal óptico denso con alto índice de refracción (por ejemplo, de diamante). La radiación infrarroja se refleja en el interior del cristal, generando una onda evanescente; es decir, una fracción de la radiación se proyecta unos micrómetros fuera del cristal y penetra ligeramente en la muestra y la

señal resultante se detecta como una atenuación de la radiación (**Figura 31**).

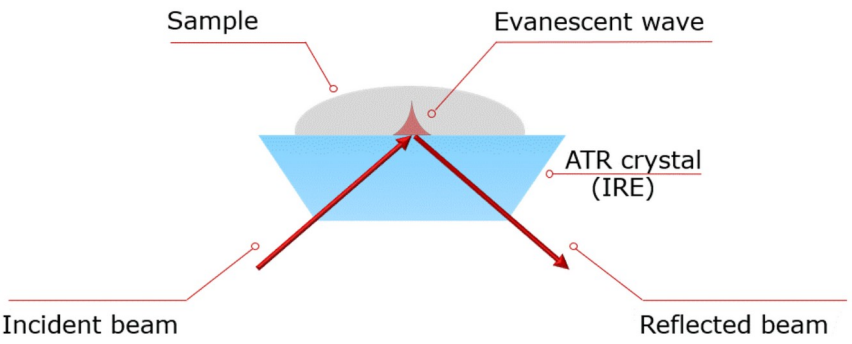


Figura 31: Modo de reflexión total atenuada de adquisición de espectros FTIR. El haz infrarrojo incide sobre el cristal de alta refracción (IRE), se refleja en su interior y genera una onda evanescente que penetra unos micrómetros en la muestra, cuya absorción se registra como atenuación. Extraído de (323).

Sus principales ventajas son la **simplicidad y bajo coste del análisis**, lo que lo convierte en un método utilizado para estudios bacterianos. No obstante, es una técnica con bajo rendimiento ya que únicamente permite analizar una muestra a la vez. Espectrómetros que aplican este modo de adquisición son el equipo Spectrum Two™ de la empresa PerkinElmer (Massachusetts, Estados Unidos) y el Nicolet iS50 de la empresa Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, Estados Unidos).

1.6.3. Técnicas de análisis de espectros

Una vez obtenidos los espectros mediante FTIR, estos deben ser analizados. Tradicionalmente, la interpretación de los datos se ha basado en la comparación de la intensidad o la posición de las bandas presentes en el espectro. No obstante, se trata un método poco resolutivo y con limitaciones ya que se usan los espectros "en bruto", los cuales pueden contener artefactos, ruido y variabilidad intrínseca de determinadas bandas que dificultan la interpretación (312). A estas limitaciones se añade que la tecnología FTIR suele generar una gran cantidad de información espectral, lo que hace necesario **recurrir a otras metodologías de procesado y análisis de datos como las técnicas de análisis multivariante**, que permiten optimizar los resultados y mejorar la capacidad de discriminación de los espectros (312,313,324).

Dentro de las metodologías de análisis multivariante se distinguen **dos grandes tipos**: las técnicas no supervisadas y las supervisadas. **Las técnicas no supervisadas**, como el análisis de conglomerados o el análisis de componentes principales, permiten agrupar y describir los datos **sin necesidad de aportar información previa** sobre los grupos a las que pertenecen. En cambio, **las técnicas supervisadas**, como el análisis discriminante lineal, **requieren definir previamente grupos o categorías** (a veces denominados "**etiquetas**" o *labels*) **mediante una**

técnica de referencia. A partir de estas categorías, el algoritmo se "entrena" para clasificar las nuevas muestras que se analicen y optimizar la discriminación entre grupos.

Las técnicas supervisadas tienen una alta capacidad predictiva, mayor autonomía en el proceso de análisis (requiere menor intervención por parte del usuario) y pueden tener mayor poder discriminativo que los métodos no supervisados. No obstante, al presentar un rendimiento que depende directamente de la calidad y representatividad de los datos empleados en el entrenamiento, **requiere disponer de una cohorte o *dataset* de referencia inicial amplia, bien caracterizada y fiable** para cada microorganismo de manera independiente. Además, **esta cohorte debe actualizarse de manera periódica y continua** ya que, en microbiología, la diversidad genómica bacteriana puede ir evolucionando con el tiempo. En este contexto, la WGS constituye el método de referencia y resulta indispensable aplicarla en paralelo para ir etiquetando con precisión los distintos aislados de cada especie bacteriana utilizados en el entrenamiento del modelo FTIR. Sin una validación periódica en paralelo y la actualización constante del modelo, los sistemas supervisados corren el riesgo de acumular errores en la asignación de etiquetas y, con el tiempo, perder fiabilidad diagnóstica. Además, estos modelos no son generalizables a etiquetas o grupos no incluidos previamente en el *dataset* de entrenamiento.

Para la rutina asistencial de un laboratorio clínico de microbiología, las técnicas no supervisadas pueden resultar más útiles para la implementación y el uso rutinario de equipos como el IR Biotyper®. Estas técnicas permiten analizar espectros y agrupar los aislamientos sin requerir etiquetas previas obtenidas mediante técnicas de referencia más laboriosas y poco aplicables al día a día, como la WGS. De este modo, podrían actuar como herramienta de cribado preliminar (por ejemplo, caracterización de aislados o análisis de brotes), reservando la confirmación mediante WGS únicamente para aquellos casos en los que los resultados no sean concluyentes. A continuación, se detallarán las técnicas más conocidas de análisis multivariante:

Análisis de conglomerados

En inglés se conoce como ***hierarchical cluster analysis*** (**HCA**). Es una metodología que se basa en el cálculo de una **matriz de distancias** entre espectros, a partir de la cual se van uniendo progresivamente aquellos que presentan mayor proximidad hasta construir una estructura jerárquica denominada **dendrograma** (325).

Esta representación gráfica facilita la identificación de aislamientos con perfiles similares y permite detectar posibles relaciones entre aislamientos, por ejemplo, en el contexto de un brote. La principal

ventaja del HCA radica en su **simplicidad interpretativa**, aunque su rendimiento depende de la elección del algoritmo de agrupamiento y de la métrica de distancia utilizada. En los estudios publicados en el ámbito del FTIR, el algoritmo de agrupamiento más frecuentemente utilizado es el método de enlace promedio (o en inglés *unweighted pair-group method with arithmetic mean,* UPGMA) y la métrica de distancia más frecuente suele ser la euclidiana. El UPGMA es un método de agrupamiento que calcula la distancia entre dos grupos usando el promedio de todas las distancias posibles entre los elementos que los forman (326). De este modo, se generan agrupamientos más equilibrados y menos sensibles a valores extremos. Por otro lado, la distancia euclidiana se obtiene calculando la raíz cuadrada de la suma de las diferencias al cuadrado entre dos espectros (327). Este cálculo intenta emular una "distancia geométrica" entre los espectros: cuanto menor es el valor obtenido, mayor es la similitud entre las muestras comparadas.

En la presente tesis, se ha empleado el método HCA con enlace promedio y distancia euclidiana para el análisis de brotes causados por *K. pneumoniae* y *E. faecium*.

Análisis de componentes principales

Conocida en inglés como ***principal component analysis*** (**PCA**). Se trata de una metodología estadística no supervisada que **simplifica el conjunto de datos espectrales transformándolos en nuevas variables denominadas componentes principales**. Estos componentes son combinaciones matemáticas de las variables originales que integran la mayor parte de la información contenida en los espectros y se ordenan según la varianza que explican (componente 1, componente 2, componente 3, etc.). De este modo, **los primeros componentes del PCA son los que integran las diferencias más relevantes entre los espectros analizados** (328). En la presente tesis, es uno de los métodos de análisis de datos evaluado para determinar el serotipo de *S. pneumoniae*.

Análisis discriminante lineal

También denominada ***linear discriminant analysis*** (**LDA**). Es una técnica supervisada que busca **maximizar la separación entre grupos previamente definidos**, optimizando la capacidad de clasificación de nuevas muestras. Para ello, el LDA calcula combinaciones lineales de las variables originales que maximizan la varianza entre grupos y minimizan la varianza dentro de cada grupo. El resultado es un **modelo predictivo que permite asignar una muestra desconocida a una categoría previamente establecida** (por ejemplo, especie o linaje

bacteriano). No obstante, como se ha mencionado anteriormente, su rendimiento depende en gran medida de la calidad y representatividad del conjunto de entrenamiento empleado, lo que obliga a mantener actualizados los modelos con nuevas cepas de referencia y a validar periódicamente la clasificación mediante técnicas de referencia como la WGS.

En la presente tesis, es uno de los métodos de análisis de datos evaluado para determinar el serotipo de *S. pneumoniae*.

1.6.4. Aplicaciones en la microbiología clínica

Una vez comprendidos los principios de la técnica de FTIR en el ámbito de la microbiología, se han desarrollado numerosos estudios que han evaluado su utilidad en bacterias. Estas investigaciones han demostrado el potencial de la espectroscopia FTIR no solo para la identificación de microorganismos, sino también para la caracterización celular y la tipificación a distintos niveles taxonómicos, que abarcan desde el serotipo hasta el linaje clonal (313). Se detallan a continuación diversas aplicaciones del FTIR en la microbiología:

Identificación microbiana

La tecnología FTIR se ha empleado para la identificación de microorganismos a partir de los espectros de absorbancia generados (324,329). Los espectros FTIR reflejan la variabilidad de la composición química y estructural de proteínas, lípidos y carbohidratos de la bacteria analizada. Estos patrones espectrales de infrarrojo pueden compararse con espectros de referencia almacenados en bases de datos (librerías de espectros), lo que posibilita la **identificación bacteriana**.

Diversos estudios publicados han demostrado buena experiencia en la identificación de distintos microorganismos, entre los que se incluyen *Listeria* spp., *Bacillus* spp., *Stenotrophomonas maltophila*, *E. coli*, *Shigella* spp., entre otros (330–332).

No obstante, la mayoría de los trabajos publicados incluyen un número reducido de muestras, se centran en un número limitado de géneros bacterianos y emplean bibliotecas desarrolladas internamente (330). En consecuencia, las principales limitaciones de la aplicabilidad del FTIR en la identificación bacteriana radican en la **falta de protocolos estandarizados y en la ausencia de bases de datos amplias y consolidadas**.

Estas desventajas reducen la aplicabilidad de esta metodología en la identificación bacteriana frente a tecnologías de referencia utilizadas más ampliamente en la actualidad, como la espectrometría de masas

MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*), la cual sí que dispone de librerías de espectros bien curadas y validadas que garantizan una mayor fiabilidad (324,329).

Estudios de crecimiento y resistencia bacterianos

La espectroscopia FTIR se ha aplicado al estudio de las fases de crecimiento bacteriano mediante el análisis de los **cambios en los perfiles espectrales a lo largo de la curva de crecimiento**. A diferencia de los métodos convencionales, como el recuento en placa o la medición de la densidad óptica, esta técnica permite detectar variaciones en el contenido relativo de ácidos nucleicos, proteínas y carbohidratos, especialmente durante las fases de latencia y crecimiento exponencial (333,334). Por ejemplo, en un estudio publicado en 2020, los autores detectan que hay marcadores espectrales en *S. aureus* con elevada sensibilidad que reflejan cambios y adaptación metabólica en poblaciones con bajo número de células, los cuales no serían detectados mediante métodos ópticos convencionales (333).

En el ámbito de la microbiología clínica, esta aplicabilidad podría tener interés en la **monitorización de la respuesta bacteriana bajo condiciones adversas, como la exposición a antibióticos**. Estudios recientes han demostrado que FTIR, combinado con análisis multivariado y diversos algoritmos, permite detectar el crecimiento

bacteriano en condiciones de presencia antibiótica de *S. aureus* y enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella aerogenes* y *Citrobacter freundii,* entre otras) con resultados más rápidos que los métodos convencionales mencionados (**Figura 32**) (335–337).

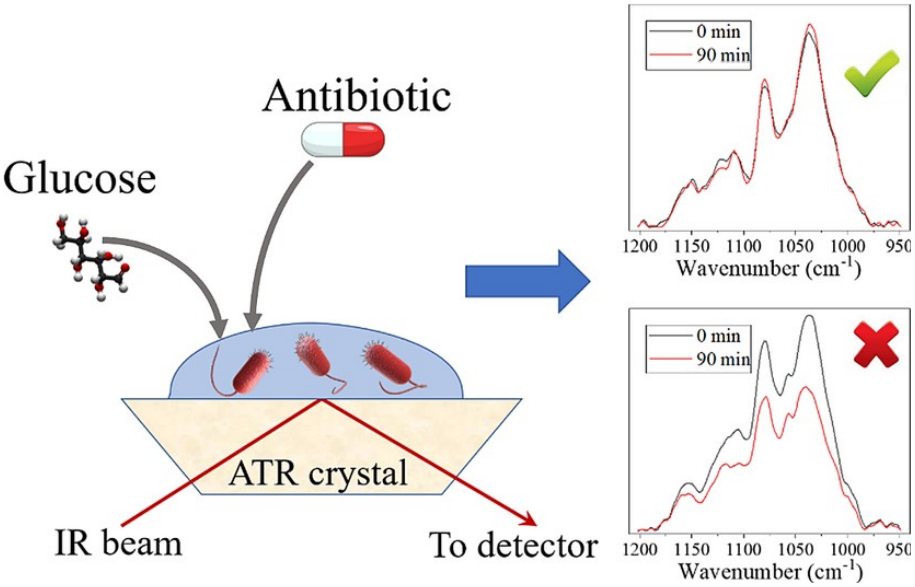


Figura 32: Esquema representativo de un experimento de espectroscopia FTIR-ATR para el análisis de bacterias en presencia de glucosa y antibióticos. En la parte superior derecha se muestra un escenario en el que los espectros obtenidos a 0 y 90 minutos se superponen, indicando ausencia de cambios en presencia del antibiótico y, por tanto, una falta de actividad antimicrobiana. El escenario representado en la parte inferior derecha representa la situación inversa, reflejando una susceptibilidad bacteriana frente al antibiótico. Extraído de (335).

No obstante, su aplicabilidad presenta algunas limitaciones. Al igual que en los estudios de identificación mencionados en el apartado anterior, la interpretación de los espectros para el crecimiento bacteriano requiere el uso de bases de datos de referencia y

protocolos de estandarización ya que existe una influencia en las condiciones/medio de cultivo sobre los espectros, lo que puede generar variabilidad en los resultados (324). Debido a estas limitaciones, la aplicabilidad en estudios de crecimiento se reserva más para un **uso en investigación** y no tanto en la clínica rutinaria.

Caracterización de la pared celular

La pared celular es una de las estructuras bacterianas que el FTIR permite analizar con mayor resolución. Esta capacidad ha sido aprovechada para estudiar y comparar grupos funcionales de bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas, así como caracterizar otras estructuras clave como el peptidoglicano y el lipopolisacárido bacteriano (324,338).

En el ámbito de la microbiología clínica, una de las aplicaciones destacadas es la **evaluación de la interacción de determinados antibióticos con la pared celular**, así como el análisis del efecto de determinadas nanopartículas con actividad antimicrobiana que se unen a los componentes de la pared celular. Por ejemplo, en un trabajo publicado en 2023, los autores estudiaron la penetración de la rifampicina en *E. coli* mediante FTIR, analizando cambios en la pared bacteriana por la acción del antibiótico (339). De forma similar, en otro estudio realizado en 2023, se demostró que el FTIR tiene la capacidad de detectar con elevada resolución las alteraciones producidas por

diferentes nanopartículas metálicas (de plata y grafeno principalmente) en bacilos gramnegativos (340).

Se trata de una aplicabilidad que está más **orientada a la investigación** y no tanto a la rutina asistencial: la interpretación de los espectros requiere conocimiento especializado y, como las aplicaciones anteriores, se requiere estandarización de los protocolos de preparación y elaborar bases de referencia (324).

Identificación de serotipos bacterianos

Como se ha explicado previamente, al poder caracterizar la pared celular, una de las aplicaciones más interesantes del FTIR es la tipificación bacteriana basándose en la composición química y estructural de los componentes de la pared bacteriana (329).

Históricamente en microbiología, el tipado de las bacterias se ha basado en técnicas de serotipado empleando antisueros específicos. Aunque son ampliamente conocidas, suelen ser metodologías manuales, con cierto grado de subjetividad y a veces son algoritmos tiempo ineficientes (341). Además, requieren disponer de cada uno de los diferentes antisueros para tipar a esa bacteria, lo cual suele incrementar el coste de estos métodos.

A diferencia de las técnicas serológicas, la espectroscopia FTIR aporta una metodología rápida, reproducible, objetiva y automatizable.

Diversos estudios han evaluado la **capacidad del FTIR en la diferenciación de serotipos de determinados microorganismos** clínicamente relevantes:

- ***Salmonella enterica***: Las infecciones por *Salmonella enterica* se asocian principalmente a cuadros gastrointestinales y su correcta serotipificación, basada en los antígenos somáticos O y flagelares H, es fundamental para la **clínica y la vigilancia epidemiológica**. En este contexto, diversos estudios han demostrado que la espectroscopia FTIR permite discriminar entre *Salmonella* Typhi y Paratyphi, serogrupos O e incluso entre serovariedades (342–345).
- ***Legionella pneumophila***: Se trata de una bacteria ambiental asociada a sistemas acuáticos artificiales que puede causar enfermedad del legionario y fiebre de Pontiac. Actualmente existen 16 serogrupos diferentes, siendo el serogrupo 1 el más importante (346). En este contexto, la serotipificación resulta crítica para la **investigación de brotes, ya que permite identificar un posible origen y detectar aguas contaminadas**, contribuyendo a la implementación de medidas correspondientes. Diversos estudios han demostrado que la espectroscopia FTIR permite discriminar *L. pneumophila* serogrupo 1 frente a los serogrupos 2-16 y frente a otras especies de *Legionella* spp., posicionándose como una herramienta útil de cribado en la investigación de brotes (346–348).

- ***Listeria monocytogenes***: Se trata de un patógeno de relevancia en salud pública debido a su capacidad para provocar **brotes de transmisión alimentaria**. En personas inmunocompetentes puede producir cuadros autolimitados y leves, pero en poblaciones vulnerables como inmunocomprometidos, recién nacidos y mujeres embarazadas puede producir encefalitis, bacteriemias y abortos. La serotipificación de los antígenos somáticos O y flagelares H es fundamental para **establecer vínculos epidemiológicos entre casos clínicos y alimentos contaminados**, siendo los serotipos 1/2a y 1/2b los más frecuentemente implicados (349). En este contexto, distintos estudios han demostrado que la espectroscopia FTIR, combinada con algoritmos de aprendizaje automático, permite discriminar los serotipos más prevalentes y podría constituir una herramienta para el análisis de brotes en la industria alimentaria (350,351).

- *K. pneumoniae*: La cápsula de polisacáridos constituye un marcador epidemiológico de gran interés ya que, como se ha mencionado en el apartado 1.2.2, **determinados tipos capsulares se asocian a determinados linajes con mayor patogenicidad**. La caracterización capsular se ha realizado con técnicas serológicas para determinar el K-tipo. Actualmente, las técnicas serológicas han caído en desuso y han sido sustituidas por métodos de WGS que analizan el locus *cps* dando lugar a la clasificación según el KL-

tipo. No obstante, los métodos de WGS no siempre son accesibles en la rutina diaria del laboratorio clínico.

En este contexto, un trabajo publicado en 2020 con 154 aislados demostró la capacidad del FTIR para discriminar 19 KL-tipos diferentes con una elevada concordancia respecto a los métodos moleculares (352). Más recientemente, un estudio publicado en 2025 demostró una concordancia del 100% entre los resultados obtenidos mediante FTIR y la asignación de los KL-tipos; no obstante, en este trabajo se emplearon menor número de muestras (73 aislados) y menor diversidad de KL-tipos (siete tipos) (353). En ambos trabajos, los autores concluyeron que la espectroscopia FTIR constituye una herramienta fiable, rápida y coste-efectiva para el tipado capsular de *K. pneumoniae.*

- *S. pneumoniae*: La determinación del serotipo capsular del neumococo resulta esencial para la **vigilancia epidemiológica de la ENI y para la optimización de las estrategias vacunales**. Entre las múltiples técnicas de caracterización de la cápsula del neumococo, la reacción de *Quellung* (descrita en el apartado 1.2.2) sigue siendo la técnica *gold standard*, pero su disponibilidad suele estar restringida a centros de referencia por las limitaciones ya explicadas.

  Diversos trabajos han evaluado la capacidad discriminativa del FTIR para diferenciar serotipos de neumococo comparándola con la

técnica de *Quellung*. Un estudio publicado en 2024 demostró una concordancia superior al 95% tras analizar 76 aislados pertenecientes a 18 serotipos de neumococo (354). Más recientemente, un estudio publicado en 2025 con 188 aislados de 21 serotipos reportó una concordancia algo menor, oscilando entre el 68,1% y el 86,7%, en función del algoritmo empleado (355). A pesar de estas diferencias, ambos autores coinciden posicionado la técnica FTIR como una alternativa rápida, sencilla y aplicable a la rutina asistencial de un laboratorio clínico de microbiología para el serotipado de *S. pneumoniae*.

En el marco de esta tesis, se evalúa la aplicabilidad del FTIR en el serotipado de *S. pneumoniae* mediante la implementación de los algoritmos HCA, PCA, LDA y un algoritmo de inteligencia artificial.

Estudios de brotes

Además de su utilidad en la identificación de serotipos, la tecnología FTIR ha demostrado capacidad para **discriminar incluso a nivel de linaje clonal**. Esta característica enlaza con otra de las aplicaciones más útiles de la tecnología en el ámbito clínico, que es la de **dar apoyo al diagnóstico de brotes nosocomiales**.

La confirmación de un vínculo epidemiológico requiere confirmar la existencia de una relación clonal entre los casos bajo sospecha mediante técnicas de tipado. Generalmente, las técnicas de

confirmación suelen ser moleculares (siendo la WGS la *gold standard*) pero estas suelen ser costosas, laboriosas o estar relacionadas con tiempos de respuesta poco prácticos como para integrarlas en la rutina asistencial.

En este contexto, la capacidad del FTIR de discriminar hasta nivel de linaje clonal en determinadas bacterias puede **aportar resultados ágiles para dar respuesta a la demanda asistencial e implementar precozmente las medidas de control oportunas**. De este modo, esta técnica contribuye a optimizar el uso de recursos, ya que evita destinar esfuerzos a situaciones que no corresponden a una relación epidemiológica real, y focaliza las medidas de control en aquellos escenarios en los que realmente proceda.

Diversos estudios han demostrado la **utilidad de la tecnología FTIR aplicada de manera rutinaria en el estudio de brotes causados por microorganismos relevantes a nivel hospitalario**. Entre ellos se incluyen *Enterobacter cloacae* complex, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* y *E. faecium.* Diversos autores han mostrado buena correlación entre los resultados obtenidos por FTIR y los obtenidos mediante técnicas de WGS (318,319,329,356,357).

Más recientemente, se han publicado investigaciones de gran relevancia que han evaluado el rendimiento de FTIR en el tipado de brotes producidos por aislamientos productores de BLEE y productores de carbapenemasas, incluyendo *E. coli* productora de

OXA-48 y productora de NDM, *K. pneumoniae* productora de BLEE y productora de NDM, así como *K. oxytoca* productora de VIM (315–317,358). Como se ha mencionado en el apartado 1.1.3, los brotes causados por este tipo de bacterias MDR presentan una gran relevancia clínica y epidemiológica, lo que hace que su detección precoz y el establecimiento rápido de medidas de control sean críticos.

En la elaboración de esta tesis, se ha evaluado la capacidad discriminatoria de la tecnología FTIR como herramienta para la caracterización de brotes nosocomiales causados por *K. pneumoniae* productora de BLEE y *E. faecium* resistente a vancomicina.

En resumen, la espectroscopia FTIR se posiciona como una herramienta prometedora para el tipado bacteriano de determinados microorganismos con interés clínico y/o epidemiológico ofreciendo una **alternativa frente a las limitaciones de las técnicas serológicas convencionales**. A su vez, constituye una **metodología rápida y eficiente para la discriminación de linajes bacterianos**, lo que la convierte en un recurso valioso para la confirmación y la respuesta precoz a brotes nosocomiales.

2. Justificación y objetivos

2.1. Justificación de la unidad temática de la tesis

En las últimas décadas, uno de los desafíos más relevantes en el ámbito de la salud pública global ha sido el aumento constante y acelerado de las resistencias antimicrobianas. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), este fenómeno representa actualmente una de las principales amenazas para la salud humana, animal y ambiental (359), y las predicciones indican que será la primera causa de muerte en el año 2050 (360). Las resistencias antimicrobianas reducen la eficacia de los tratamientos antibióticos existentes, dificultan el manejo de las enfermedades infecciosas, incrementan los costes sanitarios y aumentan la morbimortalidad de los pacientes (361,362).

El fenómeno de las resistencias se ve facilitado por el uso indiscriminado de antibióticos (tanto en medicina humana como veterinaria), por la falta de políticas regulatorias efectivas y por la escasez en el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (361,362). A pesar de que existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes antibióticos, esta tarea presenta enormes desafíos. El desarrollo de nuevas terapias antimicrobianas implica una elevada inversión económica, largos tiempos de investigación y un retorno financiero escaso para la industria farmacéutica (especialmente si se compara

con otros campos terapéuticos como el tratamiento del cáncer u otras enfermedades crónicas (363)) ya que la velocidad a la que emergen nuevas resistencias puede superar la velocidad con la que se descubren y aprueban nuevos antibióticos.

La emergencia de microorganismos portadores de mecanismos de resistencia suele ir acompañada de su propagación a nivel mundial, y la diseminación global de las resistencias a los antibióticos desde su emergencia está teniendo lugar a un ritmo creciente principalmente debido a los viajes internacionales (364). Algunos de estos microorganismos multirresistentes (MDR) son conocidos como "superbacterias" (*superbugs* en inglés) porque provocan infecciones difíciles de tratar (365). Las bacterias MDR son especialmente problemáticas en entornos sanitarios, como los hospitales, ya que tienden a causar brotes infecciosos difíciles de controlar. Los microorganismos MDR más frecuentemente asociados a brotes nosocomiales son *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. y *Enterococcus* spp., conocidos también como el grupo "ESKAPE" (47,366). En Europa, la incidencia de las infecciones causadas por *K. pneumoniae* productora de BLEE en 2023 fue del 34,8% (48) y, concretamente, en España fue del 25,3%, con una tendencia al alza en los últimos años (49,367).

Los brotes nosocomiales causados por bacterias MDR no solo incrementan la morbimortalidad de los pacientes afectados, sino que

también generan un aumento considerable en los costes hospitalarios, requieren el uso de antibióticos restringidos, e incrementan los días de estancia hospitalaria (368,369). Por ello, la detección precoz de brotes nosocomiales es clave para su eficaz contención, evitando así su diseminación y reduciendo su impacto clínico y económico.

Para la confirmación de brotes hospitalarios es necesaria la utilización de métodos moleculares, como la electroforesis en campo pulsado (PFGE) (267) y, desde la última década, la WGS (251,252,370). No obstante, aunque la WGS es altamente precisa y se considera la técnica de referencia, presenta ciertas limitaciones que pueden dificultar su implementación y utilidad en la práctica clínica diaria de un laboratorio asistencial: requiere de equipamiento y personal especializado, es costosa y el tiempo de respuesta puede ser demasiado elevado (234). Ante estas limitaciones, identificar y optimizar otras técnicas que puedan aplicarse en la confirmación de brotes nosocomiales causados por microorganismos MDR de manera rápida y eficiente podría mejorar las estrategias de control en ámbitos hospitalarios.

En este sentido, una de las tecnologías emergentes es la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR), una técnica ampliamente empleada en el campo de la industria alimentaria y farmacéutica para el análisis de compuestos químicos (322), que en los últimos años está siendo evaluada y aplicada en el ámbito de la microbiología clínica.

La tecnología FTIR permite obtener un perfil de infrarrojos característico de cada aislado bacteriano que se basa en la vibración de enlaces moleculares presentes en lípidos, proteínas y polisacáridos de la pared celular; este perfil puede ser utilizado como una "huella dactilar" fenotípica con el potencial de diferenciar aislamientos. Sus principales ventajas radican en su rapidez (resultados en pocas horas) y bajo coste por muestra. Recientemente, algunos estudios han demostrado la utilidad del FTIR en la discriminación clonal de cepas durante brotes hospitalarios, especialmente en el caso de enterobacterias MDR (313,319,358).

La presente tesis se centra en la evaluación del FTIR como herramienta de primera línea para la caracterización de brotes nosocomiales causados por *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, dos microorganismos MDR pertenecientes al grupo ESKAPE, clasificados dentro del "*Critical priority group*" y "*High priority group*", respectivamente, en la "*Priority Pathogens List"* publicada por la OMS en 2024 (45).

Por otra parte, dada la capacidad de la tecnología FTIR de analizar polisacáridos de la pared celular, esta tesis también pretende evaluar el FTIR para tipificar las cápsulas de cepas de *Streptococcus pneumoniae*. *S. pneumoniae* es el principal responsable de la neumonía adquirida en la comunidad y sigue siendo una causa relevante de bacteriemia y meningitis, conocidas conjuntamente como enfermedad neumocócica invasiva (ENI). Algunos serotipos

capsulares están más asociados a formas graves de la enfermedad y a la resistencia a los antimicrobianos (371). Disponer de la información respecto al serotipo de manera rápida y precisa es esencial para la vigilancia de la ENI y para el desarrollo de vacunas (88). El método de referencia actual para determinar el serotipo es la técnica de *Quellung*, aunque se trata de un procedimiento laborioso, subjetivo, manual y habitualmente disponible solo en centros de referencia. Diversas publicaciones han sugerido el uso de la tecnología FTIR para analizar los azúcares de la cápsula de polisacáridos del neumococo y determinar su serotipo (341,354,355,372).

Por todo ello, el objetivo central de esta tesis ha sido explorar y optimizar aplicaciones de la tecnología FTIR en el laboratorio clínico, con el fin de integrarla en la rutina asistencial como una herramienta rápida para la tipificación bacteriana. Esta incorporación permitiría mejorar la caracterización y el estudio de brotes nosocomiales, incluyendo aquellos causados por microorganismos MDR, optimizando su manejo clínico y epidemiológico. Asimismo, la implementación de la técnica también posibilitaría realizar el serotipado de cepas de *S. pneumoniae*, reduciendo el tiempo de respuesta y contribuyendo directamente en la vigilancia epidemiológica de la ENI. En conjunto, se pretende que esta tecnología aporte un valor añadido al laboratorio de microbiología, fortalezca su papel dentro del hospital y contribuya a mejorar la atención al paciente.

2.2. Objetivos planteados

1. Evaluar la tecnología de espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) como herramienta para caracterizar brotes de *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE en un entorno hospitalario, en comparación con los métodos de epidemiología convencional, utilizando métodos de análisis de epidemiología genómica basados en secuenciación del genoma completo (WGS) como método de referencia.

1.1 Caracterizar los brotes y las relaciones entre los aislados mediante epidemiología convencional, WGS y FTIR.

1.2 Evaluar la concordancia en cuanto a la composición y al número de brotes detectados mediante las diferentes metodologías, utilizando la WGS como método de referencia.

2. Evaluar la tecnología FTIR como herramienta para estudiar brotes de *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina en un entorno hospitalario utilizando métodos de análisis basados en WGS como método de referencia.

2.1 Determinar el número de brotes y su composición mediante diferentes análisis bioinformáticos aplicados a datos de WGS, incluyendo *core genome Multi Locus Sequence Typing* (cgMLST),

core genome Single Nucleotide Polymorphisms (cgSNP) y *Split Kmer Analysis* (SKA) y mediante FTIR.

2.2 Evaluar la concordancia en cuanto a la composición y al número de brotes detectados mediante los diferentes análisis bioinformáticos y FTIR utilizando el análisis cgMLST como método de referencia.

3. Evaluar la tecnología FTIR como técnica para determinar el serotipo de *Streptococcus pneumoniae* utilizando la técnica de *Quellung* como método de referencia.

3.1 Predecir el serotipo mediante técnicas de análisis de espectros: análisis jerárquico de conglomerados (HCA), análisis de componentes principales (PCA) y análisis discriminante lineal (LDA), y mediante el modelo de inteligencia artificial (*PneumoClassifier*).

3.2 Evaluar la concordancia entre los serotipos obtenidos mediante las técnicas de análisis de espectros y el modelo de inteligencia artificial utilizando la técnica de *Quellung* como método de referencia.

3. Resumen y discusión global de los resultados obtenidos

3.1. Artículo I: *Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Outbreaks in the Hospital Setting*

En este primer trabajo se analizó la utilidad de la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) como herramienta de tipado rápido para la caracterización de brotes hospitalarios causados por la bacteria gramnegativa *Klebsiella pneumoniae* productora de β-lactamasas de espectro extendido (*Kp*-BLEE), comparando sus resultados con los obtenidos mediante la epidemiología convencional y la WGS como método de referencia.

El estudio incluyó 63 aislados de *Kp*-BLEE analizados de manera retrospectiva y recogidos a lo largo de tres años (2018-2021**).** A partir de los criterios epidemiológicos habituales para definir la existencia de un brote epidemiológico (dos o más casos nosocomiales en misma unidad en menos de un mes), se identificaron ocho brotes nosocomiales (ocho "*clusters* epidemiológicos") que englobaban 40 de los 63 aislados (**Tabla Suplementaria 1, Artículo I**). Sin embargo, cuando se analizó la cohorte mediante WGS, se observó un escenario más complejo; 11 "*clusters* genómicos" que agrupaban 42 aislados, y

21 aislados no relacionados genómicamente (*singletons*) (**Figura 1, Artículo I**). Estos resultados de WGS revelaron que: 1) los brotes establecidos mediante criterios de epidemiología convencional resultaron ser de naturaleza policlonal, es decir, que coexistieron múltiples cadenas de transmisión simultáneamente; y 2) la existencia de relaciones clonales entre aislados procedentes de distintas unidades hospitalarias que no habían sido detectadas mediante la epidemiología convencional, que se denominaron "brotes ocultos".

La tecnología FTIR permitió identificar 10 *clusters* que agrupaban 47 aislados y 16 *singletons*. Al comparar estos resultados con los obtenidos por WGS, el FTIR obtuvo unos índices de concordancia de Rand ajustado (AR) de 0,475 (IC 95%: 0,262-0,691) y de Wallace ajustado (AW) de 0,521 (IC 95%: 0,377-0,665), los cuales fueron mayores y con una diferencia estadísticamente significativa que los correspondientes índices obtenidos al comparar la epidemiología convencional con la WGS (AR=0,134; IC 95%: 0,000-0,278 y AW=0,134; IC 95%: 0,000-0,281, p = 0,009). En consecuencia, se obtuvo mejor concordancia en la comparativa de FTIR *vs*. WGS que la comparativa de epidemiología convencional *vs*. WGS.

En concreto, el FTIR fue capaz de identificar correctamente la gran mayoría de los aislados pertenecientes a *clusters* genómicos confirmados por WGS (38/42 aislados; 90,5%) (**Figura 1, Artículo I**), mientras que la epidemiología convencional solo logró hacerlo en algo más de la mitad de los casos (24/42 aislados; 57,1%).

Los resultados de este estudio evidencian las limitaciones de la epidemiología convencional; la definición clásica de brote epidemiológico (basada en la coincidencia temporal y espacial de los casos) puede resultar insuficiente en entornos hospitalarios donde pueden coexistir múltiples cadenas de transmisión o implicar diferentes unidades asistenciales.

La WGS es la herramienta más precisa para establecer relaciones clonales entre aislados. No obstante, su coste, el tiempo de respuesta y la complejidad experimental y del análisis bioinformático pueden limitar su uso en la práctica diaria habitual. En este contexto, el FTIR se presenta como una herramienta con una precisión superior a la de la epidemiología convencional. Es cierto que la resolución de la técnica es inferior a la WGS ya que el análisis espectral del estudio se ha limitado solamente a la región espectral de los polisacáridos (tal y como indica la bibliografía y el fabricante) y la variabilidad genómica entre clones de ESBL-*Kp* podría no ser detectada por FTIR, al tratarse de una técnica fenotípica.

No obstante, aún teniendo esta menor resolución, el FTIR permitió identificar de forma rápida la mayoría de los *clusters* genómicos y detectar relaciones entre aislados que, de otro modo, habrían pasado desapercibidas mediante la epidemiología convencional. En nuestra cohorte de estudio, hubo seis *clusters* que detectó la WGS y que no cumplían los criterios epidemiológicos. Como se comentó anteriormente, estos se denominaron “brotes ocultos” ya que no

cumplían los criterios clásicos de definición de brote (al pertenecer a diferentes plantas/unidades), pero compartían un origen clonal común. En nuestro trabajo, el FTIR permitió detectar cuatro de los seis brotes ocultos (*clusters* IV, V, VIII y XI de la **Figura 1A**, **Artículo I**), lo que demuestra un valor añadido del FTIR para aportar información adicional no alcanzable mediante la epidemiología convencional.

Desde un punto de vista técnico, es importante tener en cuenta que existen ciertas limitaciones de la metodología FTIR ya que se requiere una validación y estandarización previa. Los espectros obtenidos pueden variar según el medio de cultivo y las condiciones de cultivo empleadas. Está descrito que el uso de los diferentes medios de cultivo y el tiempo de incubación pueden variar el crecimiento y la composición de la pared celular y, por lo tanto, la señal espectral (373–375). Por otra parte, la técnica requiere una validación interna previa con una técnica de referencia para establecer el punto de corte óptimo; para *K. pneumoniae* el fabricante dispone de una recomendación de establecerlo en el rango de 0,20-0,25 (358). En nuestro estudio se obtuvo un valor óptimo de 0,240 (**Figura Suplementaria 1**, **Artículo I**).

Respecto a otros estudios que han empleado el FTIR para estudiar brotes (319,358,373,374), en nuestro trabajo se obtuvieron índices de concordancia inferiores en comparación a la WGS. Estas diferencias podrían explicarse por varios factores, entre los que destacan los siguientes:

1. Mayor diversidad de la cohorte empleada. El *dataset* del estudio engloba aislados recogidos desde julio del 2018 a octubre de 2021 y procedentes de distintas unidades y plantas de hospitalización. En cambio, en los estudios previos suelen analizar aislamientos procedentes de una misma unidad o planta recogidos en un intervalo temporal más corto, lo que favorece una mayor homogeneidad genética.
2. La metodología de referencia empleada para definir un *cluster* genómico. En este trabajo, la WGS se utilizó combinando los enfoques de cgMLST y cgSNP (376) con el objetivo de establecer el punto de corte más adecuado para nuestra cohorte. Teniendo en cuenta que no existe un umbral "universal" aceptado para la delimitar un brote, puede haber variabilidad entre estudios.

Desde un punto de vista metodológico, existen otras limitaciones del trabajo que deben ser consideradas. En primer lugar, no se pudieron analizar mediante ambas metodologías todos los aislados de *Kp*-BLEE detectados durante el periodo de estudio, por lo que puede que no se detectaran todas las cadenas de transmisión o reservorios. En segundo lugar, no se pudo determinar la variabilidad biológica de los aislados, ya que cada uno se analizó una única vez por cada metodología. Por último, los experimentos no se realizaron bajo unas condiciones de temperatura y humedad controladas; según el fabricante, estos factores ambientales pueden influir en los resultados obtenidos mediante FTIR.

Desde el punto de vista "clínico" y epidemiológico, es importante destacar que el uso del FTIR puede generar una "sobreestimación" de las relaciones clonales ya que clasifica aislados no relacionados genómicamente entre ellos como parte del mismo *cluster* (**Tabla 2**, **Artículo I**). No obstante, en un contexto de un brote nosocomial, esta falta de resolución podría considerarse "aceptable", ya que prioriza la detección e implementación de medidas rápidas frente al riesgo de subestimar un brote en curso. En este sentido, el FTIR puede actuar como una herramienta de cribado inicial, favoreciendo la implementación precoz de medidas de control de la infección mientras se esperan los resultados confirmatorios de WGS. Tras la validación obtenida en este estudio, en nuestro centro se ha implementado con éxito la metodología FTIR para la caracterización de brotes de *Kp*-BLEE, empleándose como herramienta de cribado inicial. En aquellos casos en los que los resultados obtenidos son incoherentes o el brote no puede ser controlado, se recurre a la WGS como técnica confirmatoria.

En conjunto, este primer trabajo demuestra que la integración del FTIR en la rutina del laboratorio de microbiología clínica aporta un valor añadido significativo a las investigaciones epidemiológicas convencionales. Su rapidez y facilidad de implementación lo convierten en una herramienta de cribado, complementaria a la epidemiología convencional y previa a la confirmación mediante WGS, optimizando así el control de brotes de *Kp*-BLEE en el entorno hospitalario.

Artículo I

Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreaks in the Hospital Setting

Jun Hao Wang-Wang†, Antoni E. Bordoy†, Elisa Martró, María Dolores Quesada, María Pérez-Vázquez, Mercedes Guerrero-Murillo, Andrea Tiburcio, Marina Navarro, Laia Castellà, Nieves Sopena, Irma Casas, Verónica Saludes*, Montserrat Giménez* y Pere-Joan Cardona*

Frontiers in microbiology, 2022 Jun 9;13:897161

frontiers | Frontiers in Microbiology

ORIGINAL RESEARCH
published: 09 June 2022
doi: 10.3389/fmicb.2022.897161

Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Outbreaks in the Hospital Setting

Jun Hao Wang-Wang[1,2†], Antoni E. Bordoy[1,3†], Elisa Martró[1,2,3,4], María Dolores Quesada[1,2,4], María Pérez-Vázquez[5,6], Mercedes Guerrero-Murillo[7,8], Andrea Tiburcio[1], Marina Navarro[1], Laia Castellà[9], Nieves Sopena[10], Irma Casas[11], Verónica Saludes[1,2,3,4‡], Montserrat Giménez[1,4‡] and Pere-Joan Cardona[1,2,3,12‡]*

[1]Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [2]Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, [3]Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Spain, [4]Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, [5]Reference and Research Laboratory for Antibiotic Resistance and Health Care Infections, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, [6]Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, [7]Clinical Genomics Research Unit, Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Can Ruti Campus, Badalona, Spain, [8]Clinical Genomics Unit, Clinical Genetics Service, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital, Can Ruti Campus, Badalona, Spain, [9]Enfermería Control de Infección, Dirección Enfermería, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [10]Infectious Diseases Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [11]Preventive Medicine Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [12]Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Early detection of pathogen cross-transmission events and environmental reservoirs is needed to control derived nosocomial outbreaks. Whole-genome sequencing (WGS) is considered the gold standard for outbreak confirmation, but, in most cases, it is time-consuming and has elevated costs. Consequently, the timely incorporation of WGS results to conventional epidemiology (CE) investigations for rapid outbreak detection is scarce. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) is a rapid technique that establishes similarity among bacteria based on the comparison of infrared light absorption patterns of bacterial polysaccharides and has been used as a typing tool in recent studies. The aim of the present study was to evaluate the performance of the FTIR as a first-line typing tool for the identification of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kp) outbreaks in the hospital setting in comparison with CE investigations using WGS as the gold standard method. Sixty-three isolates of ESBL-Kp collected from 2018 to 2021 and classified according to CE were typed by both FTIR and WGS. Concordance was measured using the Adjusted Rand index (AR) and the Adjusted Wallace coefficient (AW) for both CE and FTIR clustering considering WGS as the reference

OPEN ACCESS

Edited by:
Pablo Power, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Reviewed by:
Angela Novais, University of Porto, Portugal
Yanyan Hu, Zhejiang University, China

***Correspondence:**
Pere-Joan Cardona
pcardonai.germanstrias@gencat.cat

[†]These authors have contributed equally to this work and share first authorship

[‡]These authors have contributed equally to this work and share senior authorship

Specialty section:
This article was submitted to Antimicrobials, Resistance and Chemotherapy, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: *15 March 2022*
Accepted: *19 May 2022*
Published: *09 June 2022*

Citation:
Wang-Wang JH, Bordoy AE, Martró E, Quesada MD, Pérez-Vázquez M, Guerrero-Murillo M, Tiburcio A, Navarro M, Castellà L, Sopena N, Casas I, Saludes V, Giménez M and Cardona P-J (2022) Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Outbreaks in the Hospital Setting. Front. Microbiol. 13:897161. doi: 10.3389/fmicb.2022.897161

method. Both AR and AW were significantly higher for FTIR clustering than CE clustering (0.475 vs. 0.134, $p = 0.01$, and 0.521 vs. 0.134, $p = 0.009$, respectively). Accordingly, FTIR inferred more true clustering relationships than CE (38/42 vs. 24/42, $p = 0.001$). However, a similar proportion of genomic singletons was detected by both FTIR and CE (13/21 vs. 12/21, $p = 1$). This study demonstrates the utility of the FTIR method as a quick, low-cost, first-line tool for the detection of ESBL-Kp outbreaks, while WGS analyses are being performed for outbreak confirmation and isolate characterization. Thus, clinical microbiology laboratories would benefit from integrating the FTIR method into CE investigations for infection control measures in the hospital setting.

Keywords: cluster analysis, Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR, *Klebsiella pneumoniae*, outbreak, whole-genome sequencing, conventional epidemiology, nosocomial infection

INTRODUCTION

Nosocomial infections cause a high impact on the healthcare system due to an increase in antimicrobials use, patient morbidity and mortality, and hospitalization length. Nosocomial infection prevalence has ranged from 5% to 10% in recent years (World Health Organization, 2016, 2021). It is well established that early detection of pathogen cross-transmission events along with a quick implementation of correct infection control measures is required to prevent the spread of nosocomial infections (Brouqui et al., 2017; Haque et al., 2018). The bacterial species most frequently involved in nosocomial infections are *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., and *Enterococcus* spp., which are also known as the ESKAPE pathogens and usually exhibit multidrug resistance and virulence (Santajit and Indrawattana, 2016; Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Among them, *Klebsiella pneumoniae* is one of the microorganisms with the highest burden in healthcare settings (Santajit and Indrawattana, 2016). Specifically, in 2020, the reported rate of ESBL-Kp in Spain was 26.8% (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020) and it was 21.5% in our hospital.

For successful nosocomial outbreak control, it is necessary to identify as soon as possible any potential transmission routes and any likely associated environmental reservoirs through conventional epidemiology (CE) investigations that must be confirmed later by bacterial typing. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) has been widely used as the gold standard molecular method for outbreak identification based on bacterial typing (Peacock et al., 2002). However, over the last decade, whole-genome sequencing (WGS) has become the gold standard method due to its higher discriminatory power and increased accessibility (Bertelli and Greub, 2013; European Centre for Disease Prevention and Control, 2018). The potential of WGS for establishing precise relationships between bacterial isolates makes this technique the ideal tool for outbreak investigation in scenarios where other routinely used methods lack sensitivity (Peacock et al., 2018; European Centre for Disease Prevention and Control, 2019). Nevertheless, WGS-based laboratory methods and bioinformatics analyses require skilled staff and are laborious and time-consuming. Besides, bioinformatics analyses of WGS data require large computational resources to be processed, and the obtained results often require expert interpretation. Thus, WGS is difficult to implement in the routine clinical practice in most clinical microbiology laboratories. Therefore, the implementation of quicker and easier to use approaches for bacterial typing could facilitate the task of outbreak identification by CE teams in the hospital setting.

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy is a phenotypic technique introduced in the 1950s based on the comparison of infrared light absorption patterns after the application of the Fourier transform (Naumann et al., 1991; Griffiths and de Haseth, 2007). Such patterns vary according to the functional groups present in biomolecules such as carbohydrates, lipids, and proteins. The polysaccharide region (1,200–900 cm^{-1}) contributes more significantly than others to the spectral differences observed between strains from the same species (Helm et al., 1991; Naumann et al., 1991). Based on the polysaccharide region, recent studies have demonstrated that the most interesting wavelength of the infrared spectrum for bacterial typing is 1,300–800 cm^{-1} (Martak et al., 2019; Vogt et al., 2019). FTIR spectroscopy is used by the IR Biotyper system (Bruker GmbH, Leipzig, Germany), which offers a rapid and low-cost typing technique (both sample processing and amount and number of reagents are minimal) with a short turn-around time (3–4 h). Similarity between transformed spectra is established by multivariate data analysis of spectral peaks, and relationships between isolates can then be identified (Quintelas et al., 2018; Burckhardt et al., 2019; Martak et al., 2019; Novais et al., 2019; Rakovitsky et al., 2020). Thus, FTIR could be an alternative method for the quick identification of nosocomial outbreaks. However, the few studies performed so far regarding the utility of FTIR toward ESBL-Kp outbreak detection have focused on the comparison of FTIR typing results to genomic analysis, but none of them have compared FTIR to CE, although CE constitutes the most frequently used outbreak investigation tool in many healthcare settings. The aim of the present study was to evaluate the performance of the IR Biotyper as a first-line bacterial typing tool for the identification of ESBL-Kp outbreaks in the hospital setting in comparison with CE investigations using WGS as the gold standard method.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

A retrospective and cross-sectional study was performed in a tertiary care hospital. This center is the general hospital for 200,000 inhabitants and the reference hospital for 1,200,000 inhabitants of the Northern Metropolitan Area of Barcelona (Catalonia, Spain).

The study dataset comprised 63 ESBL-Kp isolates collected from patients admitted to the reference hospital ($n = 61$) and from the environment ($n = 2$) from July 2018 to October, 2021. Among them, 40 isolates belonged to epidemiological outbreaks identified by CE during the study period by the hospital infection prevention and control team. The CE criterion used in the present study to declare a nosocomial outbreak (epidemiological cluster) was the detection of two or more nosocomial ESBL-Kp infections (detected after the first 48 h of hospital admission which were not present at the time of admission; Horan et al., 2008) in the same hospital unit/ward in less than a month (Centers for Disease Control and Prevention, 2012). Additionally, in critical units (cardiac care unit, intensive care unit, neonatal intensive care unit, and both SARS-CoV-2 intensive care units) nosocomial ESBL-Kp colonization cases were also considered for outbreak declaration. The date of outbreak closure was set when no ESBL-Kp isolates were identified in the same hospital unit/ward for 3 months since the last identification. The remaining 23 isolates were randomly selected among cases that did not meet the nosocomial outbreak criteria and therefore were considered epidemiological singletons.

ESBL-Kp isolates were pseudonymized using a consecutive number in order to maintain patient confidentiality. All ESBL-Kp isolates were obtained for routine clinical diagnosis purpose and no additional sampling was required; therefore, informed consent was waived.

Routine Microbiological Diagnostics and Antimicrobial Susceptibility Testing

All isolates were firstly identified at the species level by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Antibiotic susceptibility was interpreted following European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2021). All isolates were subsequently conserved in storage media at −80°C until further analyses.

Sample Preparation for FTIR Analysis

All ESBL-Kp isolates were cultured in BD MacConkey II agar medium (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) for 24 h at 37°C. Then, all bacterial isolates were subcultured in Mueller-Hinton agar medium from a single colony (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) for another 24 h at 37°C before testing. For bacterial suspension preparation, the modified H_2O-EtOH protocol was used (Hu et al., 2021); a loopful of bacterial cells was suspended in 50 µl of deionized water in a 1.5-ml suspension vial with metal beads (Bruker GmbH, Leipzig, Germany) and homogenized through vortex. Then, 50 µl of 70% (v/v) ethanol was added in each vial and suspensions were homogenized again. Subsequently, 15 µl of each suspension vial was placed in quadruplicate on a 96-spot silicon plate (Bruker GmbH, Leipzig, Germany). As quality control, 12 µl of two infrared test standards (IRTS 1 and IRTS 2, each standard containing an *Escherichia coli* strain with a specific spectrum) was placed in duplicate on the same silicon plate. The plate was dried for 30 min at 37°C before introducing it into the Biotyper system.

Spectrum Analysis of FTIR Data

For FTIR analysis, manufacturer's recommendations were followed. Briefly, all samples were tested in quadruplicate using the default analysis settings (wavelength region 1,300–800 cm^{-1}) and OPUS 8.2.28 software (Bruker GmbH, Leipzig, Germany). Samples that did not meet the quality criteria were excluded. The OPUS software generates an average spectrum using the four obtained spectra of each replicate for each sample. It then analyzes the similarity between the average spectra from different samples and generates a dendrogram based on hierarchical cluster analysis (HCA) using Euclidian metric distance and average linkage method. The FTIR software suggests a cutoff value for clustering based on Simpson's Index of Diversity (Hunter and Gaston, 1988). For *K. pneumoniae*, manufacturer recommends using a cutoff ranging from 0.20 to 0.25, with an initial validation to determine the best value using a molecular method as gold standard. Accordingly, a subset of the study isolates comprising the first 17 isolates with available WGS results (12 forming a genomic cluster plus five singletons) was used to determine an initial cutoff. The obtained cutoff was then validated using all 63 isolates by maximizing the overall congruence between FTIR and WGS results. When two or more isolates had a FTIR spectrum distance less or equal to the designated cutoff value, they were considered to belong to the same FTIR cluster, and isolates that did not meet this criterion were considered FTIR singletons.

Sample Preparation for WGS Analysis

All ESBL-Kp samples were cultured in Mueller–Hinton agar (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) overnight at 37°C. Then, a single colony was subcultured in thioglycolate broth (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) overnight at 37°C with agitation. DNA was extracted from 1.5 ml of grown thioglycolate broth using the DNeasy Ultra Clean™ Microbial kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) following manufacture's recommendations. Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc., San Diego, United States) was used for dual-indexed library preparation according to the manufacturer's instructions, and paired-end sequencing was performed using the Illumina MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, United States).

Bioinformatic Analyses of WGS Data

For WGS clustering analysis of ESBL-Kp isolates, two approaches were combined to increase the discriminatory power of WGS

analysis as previously described (Raro et al., 2020): (i) core genome multilocus sequence typing (cgMLST) of 2,358 chromosomal target genes and (ii) phylogenetic analysis of core-genome single nucleotide polymorphisms (cgSNP). A genomic cluster of ESBL-Kp isolates by WGS was defined when the following two conditions were met based on an internal validation according to recorded epidemiological data: (i) ≥2 cases of the same sequence type (ST) with a genetic distance of ≤15 alleles in the cgMLST analysis and (ii) a common monophyletic origin in the phylogenetic tree supported by a bootstrap value ≥70% with a genetic distance of ≤17 SNP provided by cgSNP analysis. Isolates that did not meet these criteria were classified as genomic singletons. Each genomic cluster and singleton were considered a different ESBL-Kp introduction event into the hospital.

cgMLST analysis was performed with Ridom SeqSphere+ software 5.1.0 (Ridom GmbH, Münster, Germany; Jünemann et al., 2013) using *assembly de novo* settings with SPAdes 3.11.1 (Bankevich et al., 2012) and the parameter "pairwise ignoring missing values." From this analysis, ST data were obtained, and a minimum spanning tree was built to visualize allele distance between isolates.

Prokka v.1.14 (Seemann, 2014) was used to annotate *de novo* assemblies, and these annotated assemblies were used as input for Roary v3.13.0 (Page et al., 2015). An alignment of 3,524 core genes (present in >99% of isolates) comprising 3,481,593 bp was generated. Variable positions of the alignment were extracted (78,071 SNPs), and a maximum-likelihood phylogenetic tree of SNPs was constructed using RAxML v7.0.4 (Stamatakis, 2006) with a general time-reversible (GTR) model and a gamma correction for site rate variation. Node support was assessed through bootstrapping with 100 replicates.

Additionally, resistance analysis was performed using KmerResistance 2.2 online tool with default parameters (Clausen et al., 2016, 2018; Center for Genomic Epidemiology, 2021). Those genes with "template_ID" lower than 98%, "template_coverage" lower than 100% and a "depth" that did not reach 40X were filtered out.

Concordance Between Clustering Methodologies

To assess the concordance of the clustering results obtained by both the CE investigations and FTIR vs. WGS as the reference method, the Adjusted Rand index (AR) and the Adjusted Wallace coefficient (AW) were calculated with 95% CI using an online tool (Comparing Partitions, 2011). AR compares the overall congruence between two typing methods (Santos and Embrechts, 2009), while AW compares the agreement of two typing methods considering one of them as the reference method (Severiano et al., 2011). AR and AW values may range from 0 to 1, where 0 means agreement expected by chance and 1 means perfect correlation between both methods (Severiano et al., 2011; Hoffman et al., 2015). Additionally, p values comparing the AW and AR values for (i) CE vs. WGS clustering and (ii) FTIR vs. WGS clustering were obtained according to the jackknife pseudo-values resampling method (Comparing Partitions, 2011).

Besides, the proportion of isolates correctly clustered by either FTIR or CE was calculated using WGS as the reference method. Proportions were compared using the Fisher's exact test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Conventional Epidemiology Identified Eight Outbreaks

CE investigations detected eight nosocomial outbreaks over the study period, which accounted for 40 out of 63 studied isolates. Specifically, the outbreaks were located at the CCU (outbreak A, $n = 4$), the OW (outbreak B, $n = 2$), the NPHD (outbreak C, $n = 3$; and outbreak H, $n = 4$), the ICU (outbreak D, $n = 9$; and outbreak E, $n = 8$), the SICU 1 (outbreak F, $n = 4$), and the SICU 2 (outbreak G, $n = 6$). According to the used CE criterion, the remaining 23 isolates presented no evident epidemiological links among them or the isolates related to outbreaks A-H. Distribution for all isolates according to source and ward where they were detected can be found in **Supplementary Table 1**; **Supplementary Text 1**.

WGS Detected 32 Different Introductions of ESBL-Kp

The cgMLST allele distance among the 63 isolates is depicted in a minimum spanning tree shown in **Figure 1A**. Additionally, the phylogenetic tree of a cgSNP alignment of 78,071 high-quality sites is shown in **Figure 1B**. In both **Figure 1** panels, the clusters that meet the combined cgMLST and cgSNP criteria are identified.

According to WGS clustering results, sequenced isolates represented at least 32 different introductions of ESBL-Kp into the hospital over the study period; 11 different clusters (namely I–XI, 42 isolates), plus 21 singletons were identified (**Figure 1**; **Supplementary Table 1**). WGS analysis confirmed two monoclonal outbreaks (B and C) and six polyclonal outbreaks (A, D, E, F, G, and H) caused by 10 different genomic clusters (I–IV and VI–XI) plus nine singletons (**Table 1**). The isolates were assigned to 17 different ST by cgMLST; among them, 41 out of 63 isolates (65.1%) belonged to high-risk clones ST147, ST307, and ST392, being ST307 the most prevalent one (22/63, 34.9%; **Figures 1A, 2A**). Genomic clusters I, III, V, X, and XI belonged to different STs, but genomic clusters II, IV, VI–IX belonged to ST307. Mean allele distances between isolates of a genomic cluster ranged from 1 to 9.5 (**Supplementary Text 2**). Six out of the 11 genomic clusters included isolates from more than one hospital location over the study period (**Figure 2B**). Cluster I isolates were the most spread in the hospital, affecting up to six different wards/units. The analysis of antibiotic resistance from WGS data confirmed the presence of at least one ESBL-resistance gene in all cases, being CTX-M-15 the most frequently detected ESBL, present in 95% (60/63) of the isolates (data not shown).

As for the comparison between WGS and CE results, outbreaks detected by CE included two or more isolates that were confirmed by WGS to belong to the same genomic cluster in 24 out of

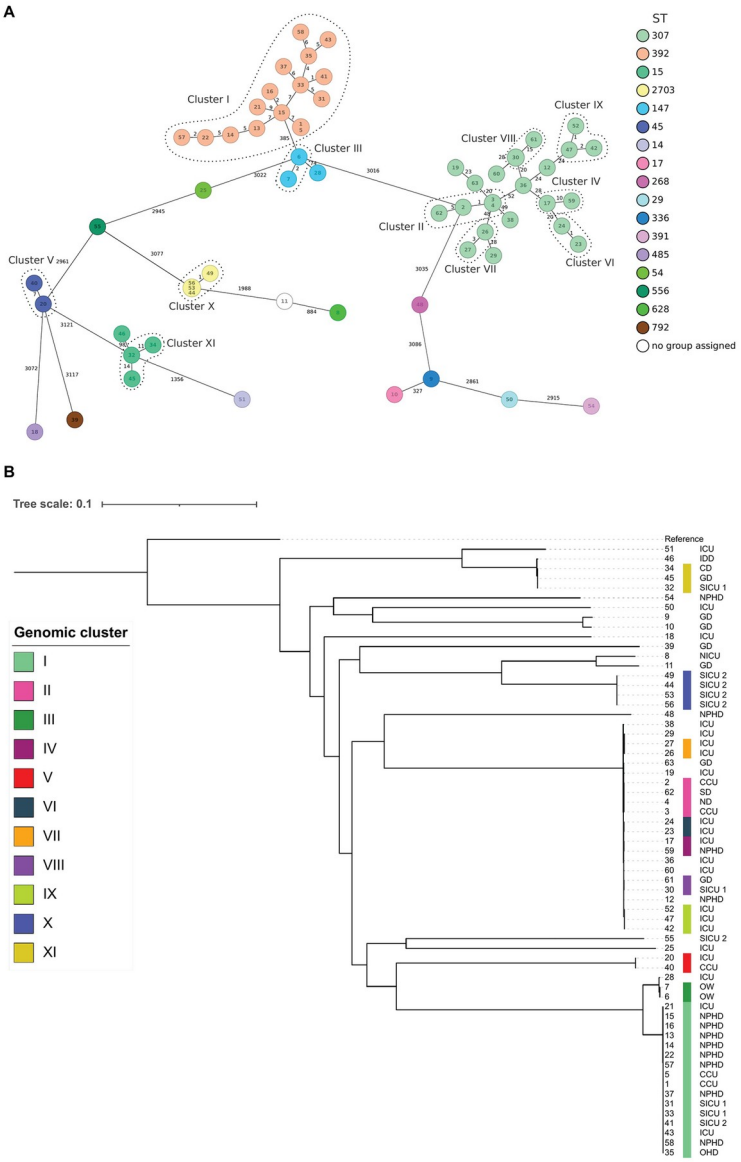


FIGURE 1 | (A) Minimum spanning tree of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-Kp) isolates ($N = 63$) showing identified clusters (roman numerals and encircled dotted lines) and allele distance between strains based on cgMLST analysis of 2,358 genes. Each sequence type (ST) assigned is indicated with a different color. Branch lengths are not to scale. **(B)** Maximum-likelihood phylogenetic tree obtained from cgSNP analysis of ESBL-Kp isolates showing identified clusters (roman numerals and color legend). Hospital locations are also indicated (CCU, cardiac care unit; CD, cardiology department; *(Continued)*

FIGURE 1 | GD, geriatric department; ICU, intensive care unit; IDD, infectious disease department; ND, neurology department; NICU, neonatal intensive care unit; NPHD, nephrology department; OHD, oncohematology department; OW, obstetric ward; SD, surgery department; SICU 1, SARS-CoV-2 intensive care unit 1; and SICU 2, SARS-CoV-2 intensive care unit 2). Reference: NTUH-K2044 (accession no. NC_012731.1). The tree scale represents the number of substitutions per variable site. All nodes corresponding to each individual genomic cluster were supported with bootstrap values ≥70%.

TABLE 1 | Contingency table comparing epidemiological clustering (A–H) vs. WGS clustering (I–XI) as the reference method.

		WGS clustering												
		I	**II**	**III**	**IV**	**V**	**VI**	**VII**	**VIII**	**IX**	**X**	**XI**	**S**	**Total**
Epidemiological clustering	A	2	2											4
	B			2										2
	C	3												3
	D	1			1		2	2					3	9
	E	1								3			4	8
	F	2							1			1		4
	G	1									4		1	6
	H	2			1								1	4
	S	4	2			2			1			2	12	23
	Total	16	4	2	2	2	2	2	2	3	4	3	21	63

S, Singleton.

42 (57.1%) cases. Moreover, 11 out of 23 (47.8%) isolates not identified as belonging to any outbreak according to CE formed or were part of five out of the six genomic clusters detected in more than one hospital location (I, II, V, VIII, and XI; **Figure 2B**). Finally, CE correctly identified 12 out of 21 (57.1%) genomic singletons (**Table 1**).

FTIR Is a Useful First-Line Tool for Detection of ESBL-Kp Outbreaks

For FTIR clustering, an optimal cutoff of 0.240 was obtained after an initial validation ($n = 17$) which coincided with the best cutoff value for the whole study dataset ($N = 63$; **Supplementary Figure 1**). Among all 63 ESBL-Kp isolates tested, FTIR detected 10 clusters (namely 1–10, including 47 isolates) and 16 singletons. The two largest clusters were cluster 4 ($n = 14$, 22.2%) and cluster 1 ($n = 13$, 20.6%; **Figure 3**; **Table 2**). Regarding the isolates initially classified into eight outbreaks by CE ($n = 40$), FTIR classified two outbreaks as monoclonal (B and C) and six as polyclonal (A, D, E, F, G, and H), similarly to WGS results (**Supplementary Table 1**). However, FTIR detected less ESBL-Kp clusters and singletons than WGS (8 vs. 10 and 7 vs. 9, respectively; **Figure 3**; **Supplementary Table 1**). Additionally, and in consonance with WGS, FTIR detected six clusters (1, 2, 4, 5, 6, and 10) affecting more than one hospital location. However, four (1, 4, 6, and 10) out of these six clusters were not fully concordant with WGS clustering (**Table 2**; **Supplementary Text 3**). In fact, when considering all studied isolates ($N = 63$), the concordance between FTIR and WGS was as follows: FTIR grouped in the same cluster singletons or isolates of different genomic clusters in three occasions (clusters 3, 4, and 10), a perfect agreement was observed between FTIR and genomic clusters in three cases (cluster 2/II, 5/V, and 7/IX), and finally, WGS grouped in the same genomic cluster isolates of different FTIR clusters in three instances (clusters I, X, and XI; **Figure 3**; **Table 2**). All this translates into an AR and AW values of 0.475 (95% CI, 0.262–0.691) and 0.521 (95% CI, 0.377–0.665), respectively, for FTIR clustering considering WGS as the reference method.

In order to assess the value of FTIR over CE investigations in the hospital setting, AR and AW values were also calculated for CE clustering considering WGS as the reference method: AR was 0.134 (95% CI, 0.000–0.278) and AW was 0.134 (95% CI, 0.000–0.281). Both AR and AW were significantly higher for FTIR clustering than for CE clustering (0.475 vs. 0.134, $p = 0.01$, and 0.521 vs. 0.134, $p = 0.009$, respectively). To further evaluate the benefit of enhancing CE investigations using FTIR, we analyzed which of those isolates that were part of a genomic cluster ($n = 42$) were grouped by either FTIR or CE. FTIR clusters included two or more isolates that WGS confirmed to belong to the same genomic cluster in 38 out of 42 (90.5%) cases. Besides, 14 of 23 (45.7%) isolates not identified as belonging to any outbreak according to CE investigations were grouped into FTIR clusters detected in more than one hospital location (1, 2, 4, 5, 6, and 10), whereas FTIR correctly identified 13 out of 21 (61.9%) genomic singletons (**Table 2**). Therefore, FTIR significantly inferred more true genomic relationships than CE (38/42 vs. 24/42, $p = 0.001$). However, a similar proportion of genomic singletons was detected by both FTIR and CE (13/21 vs. 12/21, $p = 1$). Importantly, FTIR was able to detect a genomic relationship for isolates belonging to genomic clusters IV, V, VIII, and XI, which could be classified as "hidden outbreaks" because CE research was unable to establish any epidemiological link between them.

DISCUSSION

This study demonstrates the utility of the FTIR method as a rapid first-line laboratory tool for ESBL-Kp outbreak detection,

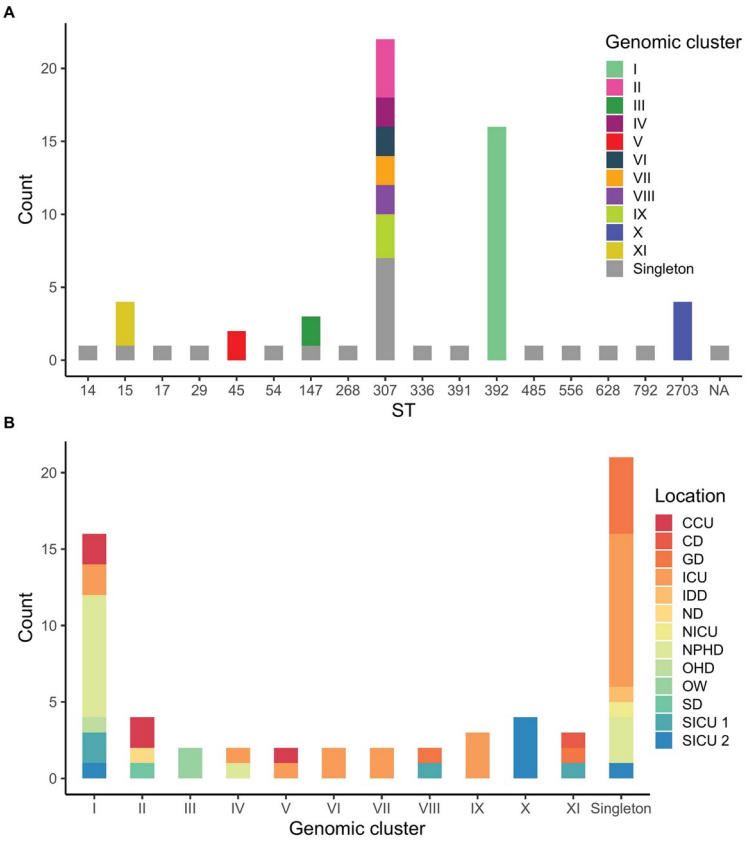


FIGURE 2 | (A) Distribution of isolates according to their sequence type (ST). Genomic clusters of isolates for each ST are indicated in colors. NA, not assigned. **(B)** Distribution of isolates according to WGS clustering results. Hospital locations affected by each genomic clustering category are indicated in colors.

while confirmatory results are being generated by WGS. FTIR inferred more true genomic relationships than CE. Moreover, FTIR detected four hidden outbreaks identified by WGS. Thus, FTIR adds valuable information that can be incorporated into CE investigations and does so in a timely manner.

A great performance of the FTIR method regarding the investigation of bacterial clusters has been suggested by a few studies performed so far. These evaluations have been carried out for *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, and *Acinetobacter baumannii* (Dinkelacker et al., 2018, Martak et al., 2019; Vogt et al., 2019; Rakovitsky et al., 2020; Hu et al., 2021, Lombardo et al., 2021). Some of the previous studies employ a workflow different from the commercial one using the attenuated total reflection mode accessory of the FTIR instrument (Silva et al., 2020; Novais et al., 2022). However, although some of those studies use WGS-based analyses, most of them rely on PFGE and MLST as the reference molecular method and their isolates are often closely related, belonging to just one or a reduced number of outbreaks. Additionally, none of the previous studies compares FTIR vs. CE, being CE the most frequently used outbreak investigation tool in the healthcare setting. In the present study, a lower concordance between FTIR and WGS clustering methods (AR = 0.475, AW = 0.521) was obtained for *K. pneumoniae* isolates than in the previously published studies where AR ranged from 0.743 to 1.0 and AW ranged from 0.708 to 1.0 (Dinkelacker et al., 2018; Martak et al., 2019; Rakovitsky et al., 2020; Hu et al., 2021). Two methodological strengths of the present compared to previous studies may explain the lower concordance results observed here. Firstly, we analyzed isolates collected

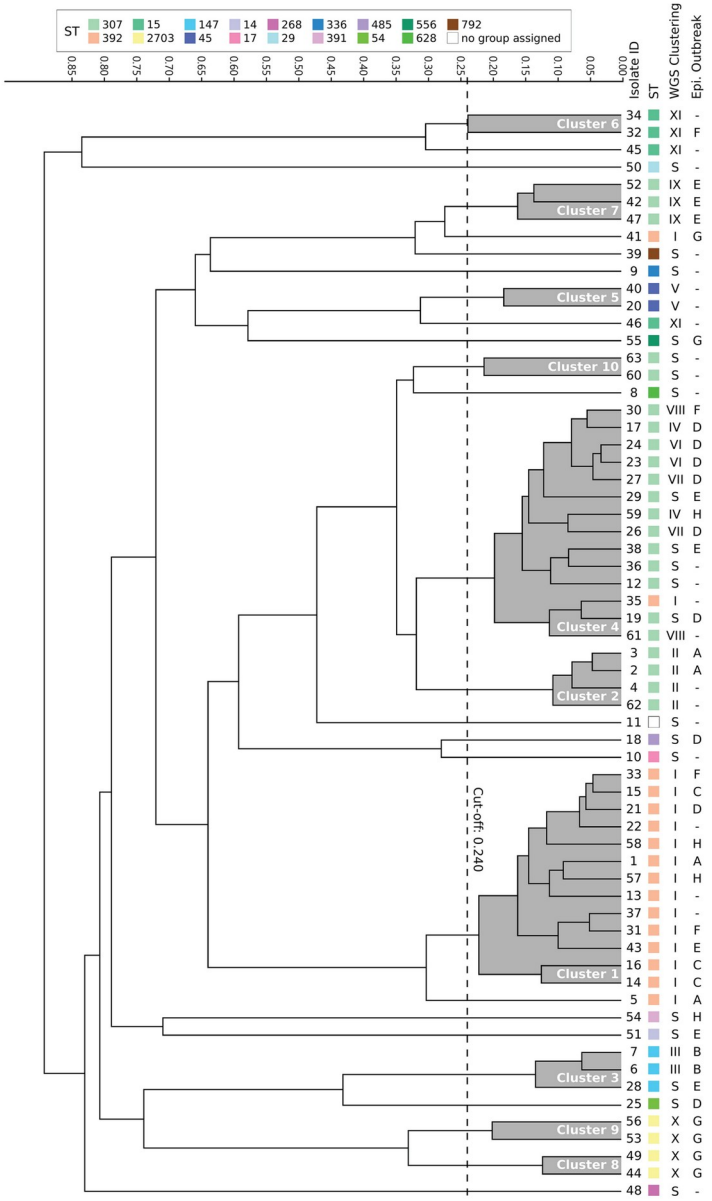


FIGURE 3 | Dendrogram obtained by clustering the Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectra of 63 extended-spectrum β-lactamase-producing *K. pneumoniae* isolates. The vertical dashed line indicates the used cutoff value (0.240). Resulting FTIR clusters (1–10) are shadowed in gray. Corresponding sequence type (ST), WGS cluster, and epidemiological outbreak are indicated for each isolate. S, singleton.

TABLE 2 | Contingency table comparing FTIR clustering (1–10) vs. WGS clustering (I–XI) as the reference method.

		WGS clustering											
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	S	Total
FTIR clustering	1	13												13
	2		4											4
	3			2									1	3
	4	1			2		2	2	2				5	14
	5					2								2
	6											2		2
	7									3				3
	8										2			2
	9										2			2
	10												2	2
	S	2										1	13	16
	Total	16	4	2	2	2	2	2	2	3	4	3	21	63

S, Singleton.

from more than one hospital location, from different patients and over a long period of time (3 years), while previous studies analyzed isolates belonging to a single hospital location and collected less than 1 year apart. Secondly, we combined cgMLST and cgSNP phylogenetic analysis in order to improve the resolution of the WGS-based reference method, as previously described (Raro et al., 2020). Such combination allowed the identification of the best allele and SNP cutoffs for cluster definition of our WGS data. It is important to note that a universal genomic cutoff value to determine whether different isolates belong to an outbreak does not currently exist (López et al., 2021). Less than 15 alleles of distance in pairwise comparisons between isolates has been suggested for outbreak delimitation by cgMLST (Lepuschitz et al., 2019; Miro et al., 2020). However, this cutoff may not always be reliable as genetic variability depends on the time elapsed among the collection dates of isolates. Similarly, if non-identical sequences share a monophyletic origin, the identification of the isolates that belong to an outbreak may be difficult, as a defined SNP cutoff has not yet been established. It should also be pointed out that each laboratory must internally validate its FTIR cutoff for clustering analysis with a reference method, given that the manufacturer has an unofficial range of cutoff values for *K. pneumoniae* (0.20–0.25) based on information gathered from internal validations of different laboratories (Rakovitsky et al., 2020). The cutoff applied in the present study after internal validation (0.240) was similar to those used by Hu et al. (0.221) and Martak et al. (0.220; Martak et al., 2019; Hu et al., 2021).

Genome composition of *K. pneumoniae* clones may slightly vary over time and from patient to patient, generating phenotypic differences that are not detected by FTIR. As recommended by the manufacturer, only the default wavelength region, which comprises the polysaccharide region, was analyzed by FTIR in the present study; thus, other existing differences/similarities at the level of proteins or fatty acids could not be detected. Nevertheless, and despite the expected lower discriminatory power of FTIR for clustering identification than WGS, when the clustering performances of CE and FTIR were compared, both AR and AW were significantly higher for FTIR clustering than CE clustering. Accordingly, FTIR inferred more true genomic relationships than epidemiological criteria, while a similar proportion of genomic singletons was detected by both FTIR and epidemiological criteria. In an epidemiologically suspected outbreak scenario, a rapid result is required to confirm whether isolates are closely related or not. The detection of related isolates involves the implementation of the most appropriate infection control measures as soon as possible. Therefore, although FTIR clustered 38.1% of genomic singletons, in the clinical practice, misdiagnosis of singletons as related isolates by FTIR clustering might be desirable over the opposite because it promotes the implementation of outbreak control measures to limit the potential spread of the outbreak, while confirmation by WGS is being performed. Contrarily to WGS, the IR Biotyper is a rapid (3–4 h), low-cost method with a simple sample preparation that can be easily implemented in the everyday routine of a microbiology laboratory after the overnight culture of the isolate of interest.

Importantly, FTIR was able to detect a relationship for isolates belonging to four clusters hidden to the CE investigations because the isolates were obtained from different hospital wards/units and/or differed in collection date by more than one month, evidencing the difficulty to establish an epidemiological link among them. Thus, we suggest that a prospective surveillance approach should be carried out in order to identify all potential hidden epidemiological clusters of isolates from patients or environmental reservoirs; this could be easily implemented using FTIR as a first-line surveillance tool, while WGS could be performed for clustering confirmation as well as for genomic characterization of circulating isolates at the level of ST, resistome, and virulome. As other studies describe, high-risk clones ST147, ST307, and ST392 are frequently associated with ESBL production and detected in healthcare settings in Spain (D'Apolito et al., 2020; Peirano et al., 2020). Particularly, in the present study these high-risk clones represented more than 60% of studied isolates, being ST307 the most prevalent one (34.9%). It is also important to remark that previous studies have demonstrated that outbreak delimitation based on ST determination might not be adequate (Zhou et al.,

2017; Gona et al., 2020). In this sense, the detection of different genomic clusters within ST307 in our geographical region (**Figure 2A**) probably indicates multiple introductions of ST307 into the hospital setting.

The use of the FTIR in the clinical microbiology practice has potential limitations. Firstly, FTIR spectra analysis does not provide species identification. In a hypothetical situation of an outbreak, an accidentally mixed culture for any of the isolates could potentially lead to its misclassification as a non-related strain. This limitation can be easily resolved by confirming species identification using MALDI-TOF MS (or other bacterial identification techniques). Secondly, the FTIR technique requires a standardization of the culture medium and incubation times of the samples (Dinkelacker et al., 2018; Quintelas et al., 2018; Hu et al., 2021); the use of different medium or incubation times may affect the growth and the cell-wall composition and, therefore, the spectra quality and subsequent analysis.

Our study also has several limitations. Firstly, not all ESBL-Kp isolates detected in the hospital over the study period could be included in this study, concealing the detection of any further potential outbreak relationships or the detection of environmental reservoirs. Secondly, only one biological replicate from each isolate was analyzed; thus, the inherent biological variability could not be taken into account. Finally, although the FTIR operated under standard laboratory conditions, temperature and hygrometry were not controlled. Since FTIR spectroscopy techniques are known to be very sensible to variations in these two physical properties, it is not known to what extent their fluctuations might have affected the results of this study.

CONCLUSION

FTIR is a rapid, low-cost, and easy-to-use phenotypic method that could be used in the clinical microbiology laboratory as first-line tool for the rapid identification of ESBL-Kp outbreaks, while the WGS analyses are being performed for confirmation and further characterization. Thus, integrating FTIR results into epidemiological investigations may add valuable information for infection control in the hospital setting.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under accession number PRJEB51676.

ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the study on human participants in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

P-JC conceived the study. EM, VS, MG, and P-JC designed the study. LC, NS, IC, and MG performed the epidemiological analyses. JW-W, MQ, AT, and MN performed the routine microbiological analyses. JW-W, AT, and MN performed the FTIR experiments. JW-W and VS performed the WGS experiments. JW-W, AB, MP-V, MG-M, and VS performed the bioinformatics analyses. JW-W, AB, and VS analyzed and interpreted the data and wrote the first draft of the manuscript. AB created the figures and performed the statistical analyses. JW-W, AB, EM, MP-V, VS, MG, and P-JC reviewed and edited the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP) Translational Genomics Core Facility and staff for their contribution to this publication. We also thank CERCA Programme/ Government of Catalonia for their support to the IGTP.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.897161/full#supplementary-material

REFERENCES

Antimicrobial Resistance Collaborators (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 399, 629–655. doi: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0

Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., et al. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477. doi: 10.1089/cmb.2012.0021

Bertelli, C., and Greub, G. (2013). Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 803–813. doi: 10.1111/1469-0691.12217

Brouqui, P., Boudjema, S., Aladro, A. S., Chabrière, E., Florea, O., Nguyen, H., et al. (2017). New approaches to prevent healthcare-associated infection. *Clin. Infect. Dis.* 65, S50–S54. doi: 10.1093/cid/cix433

Burckhardt, I., Sebastian, K., Mauder, N., Kostrzewa, M., Burckhardt, F., and Zimmermann, S. (2019). Analysis of *Streptococcus pneumoniae* using Fourier-transformed infrared spectroscopy allows prediction of capsular serotype. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 1883–1890. doi: 10.1007/s10096-019-03622-y

Center for Genomic Epidemiology (2021). KmerResistance 2.2. Available at: https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerResistance/ (Accessed March 11, 2022).

Centers for Disease Control and Prevention (2012). Section 11: Epidemic Disease Occurrence. Available at: https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section11.html (Accessed April 4, 2022).

Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., and Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinform.* 19:307. doi: 10.1186/s12859-018-2336-6

Clausen, P. T. L. C., Zankari, E., Aarestrup, F. M., and Lund, O. (2016). Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2484–2488. doi: 10.1093/jac/dkw184

Comparing Partitions (2011). Diversity and Partition Congruence Coefficients Calculation. Available at: http://www.comparingpartitions.info/index.php?link=Tool (Accessed December 2, 2021).

D'Apolito, D., Arena, F., Conte, V., de Angelis, L. H., di Mento, G., Carreca, A. P., et al. (2020). Phenotypical and molecular assessment of the virulence potential of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 clinical isolates. *Microbiol. Res.* 240:126551. doi: 10.1016/j.micres.2020.126551

Dinkelacker, A. G., Vogt, S., Oberhettinger, P., Mauder, N., Rau, J., Kostrzewa, M., et al. (2018). Typing and species identification of clinical *Klebsiella* isolates by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 56, e00843–e00918. doi: 10.1128/JCM.00843-18

European Centre for Disease Prevention and Control (2018). Monitoring the Use of Whole-Genome Sequencing in Infectious Disease Surveillance in Europe. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/monitoring-WGS-infectious-disease-surveillance-in-Europe-2015-2017-updated-Dec-2018.pdf (Accessed January 7, 2022).

European Centre for Disease Prevention and Control (2019). ECDC Strategic Framework for the Integration of Molecular and Genomic Typing Into European Surveillance and Multi-Country Outbreak Investigations – 2019–2021. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/framework-for-genomic-surveillance.pdf (Accessed January 27, 2022).

European Centre for Disease Prevention and Control (2020). Data From the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial Resistance. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc (Accessed February 14, 2022).

Gona, F., Comandatore, F., Battaglia, S., Piazza, A., Trovato, A., Lorenzin, G., et al. (2020). Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for *Klebsiella pneumoniae* cluster analysis. *Microb. Genom.* 6:e000347. doi: 10.1099/mgen.0.000347

Griffiths, P. R., and de Haseth, J. A. (2007). *Fourier Transform Infrared Spectrometry*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., and Bakar, M. A. (2018). Health care-associated infections: an overview. *Infect. Drug Resist.* 11, 2321–2333. doi: 10.2147/IDR.S177247

Helm, D., Labischinski, H., Schallehn, G., and Naumann, D. (1991). Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.* 137, 69–79. doi: 10.1099/00221287-137-1-69

Hoffman, M., Steinley, D., and Brusco, M. J. (2015). A note on using the adjusted rand index for link prediction in networks. *Soc. Networks* 42, 72–79. doi: 10.1016/j.socnet.2015.03.002

Horan, T. C., Andrus, M., and Dudeck, M. A. (2008). CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am. J. Infect. Control* 36, 309–332. doi: 10.1016/j.ajic.2008.03.002

Hu, Y., Zhou, H., Lu, J., Sun, Q., Liu, C., Zeng, Y., et al. (2021). Evaluation of the IR biotyper for *Klebsiella pneumoniae* typing and its potentials in hospital hygiene management. *Microb. Biotechnol.* 14, 1343–1352. doi: 10.1111/1751-7915.13709

Hunter, P. R., and Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466. doi: 10.1128/jcm.26.11.2465-2466.1988

Jünemann, S., Sedlazeck, F. J., Prior, K., Albersmeier, A., John, U., Kalinowski, J., et al. (2013). Updating benchtop sequencing performance comparison. *Nat. Biotechnol.* 31, 294–296. doi: 10.1038/nbt.2522

Lepuschitz, S., Schill, S., Stoeger, A., Pekard-Amenitsch, S., Huhulescu, S., Inreiter, N., et al. (2019). Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Sci. Total Environ.* 662, 227–235. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.01.179

Lombardo, D., Cordovana, M., Deidda, F., Pane, M., and Ambretti, S. (2021). Application of Fourier transform infrared spectroscopy for real-time typing of *Acinetobacter baumannii* outbreak in intensive care unit. *Future Microbiol.* 16, 1239–1250. doi: 10.2217/fmb-2020-0276

López, C., González, F., Tomás, M., and Oliver, A. (2021). "Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica," in *Procedimientos en Microbiología Clínica*. eds. E. C. Mansilla and R. C. Moreno (Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)).

Martak, D., Valot, B., Sauget, M., Cholley, P., Thouverez, M., Bertrand, X., et al. (2019). Fourier-transform infrared spectroscopy can quickly type gram-negative bacilli responsible for hospital outbreaks. *Front. Microbiol.* 10:1440. doi: 10.3389/fmicb.2019.01440

Miro, E., Rossen, J. W. A., Chlebowicz, M. A., Harmsen, D., Brisse, S., Passet, V., et al. (2020). Core/whole genome multilocus sequence typing and core genome SNP-based typing of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Spain. *Front. Microbiol.* 10:2961. doi: 10.3389/fmicb.2019.02961

Naumann, D., Helm, D., Labischinski, H., and Giesbrecht, P. (1991). "The characterization of microorganisms by Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR)," in *Modern Techniques for Rapid Microbiological Analysis*. ed. W. H. Nelson (New York, NY: VCH Publisher), 43–96.

Novais, Â., Ferraz, R. V., Viana, M., da Costa, P. M., and Peixe, L. (2022). NDM-1 introduction in portugal through a ST11 KL105 *Klebsiella pneumoniae* widespread in Europe. *Antibiotics* 11:92. doi: 10.3390/antibiotics11010092

Novais, Â., Freitas, A. R., Rodrigues, C., and Peixe, L. (2019). Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 427–448. doi: 10.1007/s10096-018-3431-3

Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., et al. (2015). Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* 31, 3691–3693. doi: 10.1093/bioinformatics/btv421

Peacock, S. J., de Silva, G. D. I., Justice, A., Cowland, A., Moore, C. E., Winearls, C. G., et al. (2002). Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3764–3770. doi: 10.1128/JCM.40.10.3764-3770.2002

Peacock, S. J., Parkhill, J., and Brown, N. M. (2018). Changing the paradigm for hospital outbreak detection by leading with genomic surveillance of nosocomial pathogens. *Microbiology* 164, 1213–1219. doi: 10.1099/mic.0.000700

Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N., and Pitout, J. D. D. (2020). Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64, e01148–e01220. doi: 10.1128/AAC.01148-20

Quintelas, C., Ferreira, E. C., Lopes, J. A., and Sousa, C. (2018). An overview of the evolution of infrared spectroscopy applied to bacterial typing. *Biotechnol. J.* 13:1700449. doi: 10.1002/biot.201700449

Rakovitsky, N., Frenk, S., Kon, H., Schwartz, D., Temkin, E., Solter, E., et al. (2020). Fourier transform infrared spectroscopy is a new option for outbreak investigation: a retrospective analysis of an extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 58, e00098–e00120. doi: 10.1128/JCM.00098-20

Raro, O. H. F., da Silva, R. M. C., Filho, E. M. R., Sukiennik, T. C. T., Stadnik, C., Dias, C. A. G., et al. (2020). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* from transplanted patients in Brazil: phylogeny, resistome, virulome and mobile genetic elements harboring blaKPC–2 or blaNDM–1. *Front. Microbiol.* 11:1563. doi: 10.3389/fmicb.2020.01563

Santajit, S., and Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed. Res. Int.* 2016, 2475067–2475068. doi: 10.1155/2016/2475067

Santos, J. M., and Embrechts, M. (2009). "On the use of the adjusted rand index as a metric for evaluating supervised classification," in *Artificial Neural Networks – ICANN 2009*. eds. C. Alippi, M. Polycarpou, C. Panayiotou and G. Ellinas (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag).

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153

Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M., and Carriço, J. A. (2011). Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3997–4000. doi: 10.1128/JCM.00624-11

Silva, L., Rodrigues, C., Lira, A., Leão, M., Mota, M., Lopes, P., et al. (2020). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy typing: a real-time analysis of an outbreak by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 2471–2475. doi: 10.1007/s10096-020-03956-y

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22, 2688–2690. doi: 10.1093/bioinformatics/btl446

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2021). EUCAST Guideline for the Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. Available at: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/ (Accessed December 4, 2021).

Vogt, S., Löffler, K., Dinkelacker, A. G., Bader, B., Autenrieth, I. B., Peter, S., et al. (2019). Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy for typing of clinical *Enterobacter cloacae* Complex isolates. *Front. Microbiol.* 10:2582. doi: 10.3389/fmicb.2019.02582

World Health Organization (2016). *Guidelines on core Components of Infection Prevention and Control Programmes at the national and acute Health care Facility level*. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (2021). Health Care-Associated Infections Fact Sheet. Available at: https://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf (Accessed December 2, 2021).

Zhou, H., Liu, W., Qin, T., Liu, C., and Ren, H. (2017). Defining and evaluating a Core genome multilocus sequence typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Klebsiella pneumoniae*. *Front. Microbiol.* 8:371. doi: 10.3389/fmicb.2017.00371

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Wang-Wang, Bordoy, Martró, Quesada, Pérez-Vázquez, Guerrero-Murillo, Tiburcio, Navarro, Castellà, Sopena, Casas, Saludes, Giménez and Cardona. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Material

Supplementary Text 1

Results: Distribution of isolates according to source and detection ward

Over the study period, sixty-three isolates of ESBL-Kp were included from 61 different hospitalized patients and two environmental sites. The isolates were detected in the intensive care unit (ICU, *n*=21), the nephrology department (NPHD, *n*=12), two different SARS-CoV-2 intensive care units (SICU 1 and SICU 2, *n*=10), the geriatric department (GD, *n*=7), the cardiac care unit (CCU, *n*=5), the obstetric ward (OW, *n*=2), the cardiology department (CD, *n*=1), the infectious disease department (IDD, *n*=1), the neurology department (ND, *n*=1), the neonatal intensive care unit (NICU, *n*=1), the oncohematology department (OHD, *n*=1), and the surgery department (SD, *n*=1).

Patient isolates sources were rectal swab (*n*=44), urine (*n*=12), sputum (*n*=3), wound exudate (*n*=1), and blood culture (*n*=1). Environmental isolates (*n*=2) were collected from a sink at the ICU and from a mattress at the SD **(Supplementary Table 1)**.

Supplementary Text 2

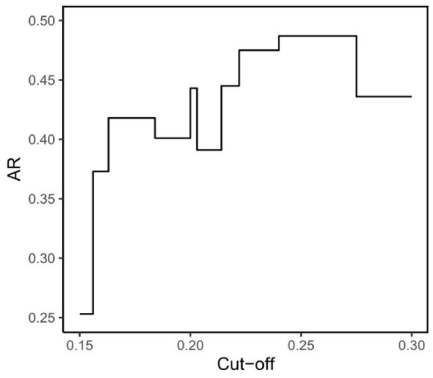
Results: Mean allele distances between isolates of a genomic cluster

According to whole-genome sequencing (WGS) results, 11 different clusters were detected. The mean allele distances between isolates from a genomic cluster ranged from 1 to 9.5. Specifically, six genomic clusters (III-VIII) included two isolates; the allele distances were 2, 10, 7, 1, 3, and 15 between isolates of clusters III, IV, V, VI, VII, and VIII, respectively. Additionally, five clusters (I, II, IX, X, and XI) comprised more than two isolates and presented an average allele distance of 9.5 (range, 0-18; *n*=16), 3.2 (range, 0-6; *n*=4), 2 (range, 1-3; *n*=3), 0.5 (range, 0-1; *n*=4), and 7 (range, 11-17; *n*=3), respectively.

Supplementary Text 3

Results: Description of FTIR clusters that affects more than one hospital location over the study period

As WGS, FTIR also detected clusters in more than one hospital location: (i) cluster 1 isolates were detected in the CCU, NPHD, ICU, and SICU 1; (ii) cluster 2 isolates were present in the CCU, ND and SD; (iii) cluster 4 isolates were present in the ICU, NPHD, OHD, and SICU 1; (iv) cluster 5 isolates were detected in the ICU and CCU; (v) cluster 6 isolates were detected in the SICU 1 and CD; (vi) cluster 10 isolates were detected in the GD and ICU (**Supplementary Table 1**). However, four (1, 4, 6, and 10) out of these six clusters were not fully concordant with WGS clustering (**Table 1**). Cluster 1 included only 13 out of the 16 isolates that formed genomic cluster I. Cluster 4 grouped together the two isolates of genomic cluster IV, however, FTIR also grouped within cluster 4 five genomic singletons and nine additional isolates of different genomic clusters. Cluster 6 included two out of the three isolates forming genomic cluster XI. Finally, cluster 10 grouped together two genomic singletons. Conversely, clusters 2 and 5 perfectly matched clusters II and V, respectively.



Supplementary Figure 1. Final internal validation of FTIR clustering cut-off value. The most restrictive cut-off value that maximized the Adjusted Rand index (AR) was 0.240 for the clustering of the study dataset (N=63) of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates considering WGS as the reference method. The tested cut-off range corresponds to the unofficial range suggested by the manufacturer (0.20-0.25) with an additional 0.05 range on each side (0.15-0.30).

Supplementary Table 1. Comparison of the three clustering methods for each ESBL-Kp isolate.

Isolate ID	Collection date	Isolate source	Hospital location	ST	Epidemiological cluster	FTIR cluster	WGS cluster
1	07/16/2018	RS	CCU	392	A	1	I
5	07/23/2018	RS	CCU	392	A	Singleton	I
13	08/02/2019	U	NPHD	392	Singleton	1	I
14	08/07/2019	U	NPHD	392	C	1	I
15	08/11/2019	RS	NPHD	392	C	1	I
16	08/21/2019	RS	NPHD	392	C	1	I
21	08/31/2020	RS	ICU	392	D	1	I
22	10/05/2020	U	NPHD	392	Singleton	1	I
31	02/15/2021	RS	SICU 1	392	F	1	I
33	02/22/2021	RS	SICU 1	392	F	1	I
35	03/03/2021	RS	OHD	392	Singleton	4	I
37	03/10/2021	U	NPHD	392	Singleton	1	I
41	03/29/2021	RS	SICU 2	392	G	Singleton	I
43	04/13/2021	RS	ICU	392	E	1	I
57	05/17/2021	RS	NPHD	392	H	1	I
58	05/17/2021	RS	NPHD	392	H	1	I
2	07/18/2018	RS	CCU	307	A	2	II
3	07/21/2018	U	CCU	307	A	2	II

4	07/23/2018	RS	ND	307	Singleton	2	II
62	10/11/2021	EI	SD	307	Singleton	2	II
6	08/16/2018	U	OW	147	B	3	III
7	08/17/2018	U	OW	147	B	3	III
17	07/20/2020	RS	ICU	307	D	4	IV
59	05/25/2021	RS	NPHD	307	H	4	IV
20	08/24/2020	RS	ICU	45	Singleton	5	V
40	03/25/2021	U	CCU	45	Singleton	5	V
23	10/08/2020	BC	ICU	307	D	4	VI
24	10/13/2020	RS	ICU	307	D	4	VI
26	10/28/2020	RS	ICU	307	D	4	VII
27	11/30/2020	RS	ICU	307	D	4	VII
30	02/15/2021	RS	SICU 1	307	F	4	VIII
61	10/07/2021	S	GD	307	Singleton	4	VIII
42	04/13/2021	RS	ICU	307	E	7	IX
47	04/26/2021	RS	ICU	307	E	7	IX
52	05/04/2021	RS	ICU	307	E	7	IX
44	04/19/2021	RS	SICU 2	2703	G	8	X
49	04/27/2021	RS	SICU 2	2703	G	8	X
53	05/10/2021	RS	SICU 2	2703	G	9	X

56	05/12/2021	U	SICU 2	2703	G	9	X
32	02/19/2021	RS	SICU 1	15	F	6	XI
34	02/26/2021	RS	CD	15	Singleton	6	XI
45	04/20/2021	U	GD	15	Singleton	Singleton	XI
8	05/16/2019	RS	NICU	628	Singleton	Singleton	Singleton
9	07/25/2019	S	GD	336	Singleton	Singleton	Singleton
10	07/29/2019	RS	GD	17	Singleton	Singleton	Singleton
11	07/29/2019	RS	GD	Unknown	Singleton	Singleton	Singleton
12	07/31/2019	U	NPHD	307	Singleton	4	Singleton
18	07/27/2020	RS	ICU	485	D	Singleton	Singleton
19	08/17/2020	RS	ICU	307	D	4	Singleton
25	10/13/2020	RS	ICU	54	D	Singleton	Singleton
28	12/07/2020	RS	ICU	147	E	3	Singleton
29	12/21/2020	RS	ICU	307	E	4	Singleton
36	03/10/2021	RS	ICU	307	Singleton	4	Singleton
38	03/16/2021	RS	ICU	307	E	4	Singleton
39	03/22/2021	RS	GD	792	Singleton	Singleton	Singleton
46	04/26/2021	S	IDD	15	Singleton	Singleton	Singleton
48	04/27/2021	WE	NPHD	268	Singleton	Singleton	Singleton
50	04/27/2021	RS	ICU	29	Singleton	Singleton	Singleton

51	05/04/2021	RS	ICU	14	E	Singleton	Singleton
54	05/10/2021	U	NPHD	391	H	Singleton	Singleton
55	05/10/2021	RS	SICU 2	556	G	Singleton	Singleton
60	07/02/2021	EI	ICU	307	Singleton	10	Singleton
63	10/11/2021	RS	GD	307	Singleton	10	Singleton

BC: Blood culture, CCU: Cardiac care unit, CD: Cardiology department, EI: Environmental isolate, GD: Geriatric department, ICU: Intensive care unit, IDD: Infectious disease department, ND: Neurology department, NICU: Neonatal intensive care unit, NPHD: Nephrology department, OHD: Oncohematology department, OW: obstetric ward, RS: Rectal swab, S: Sputum, SD: Surgery department, SICU 1: SARS-CoV-2 intensive care unit 1, SICU 2: SARS-CoV-2 intensive care unit 2, ST: Sequence type, U: Urine, WE: Wound exudate.

3.2. Artículo II: *Rapid Detection of VREfm Clusters: FTIR Spectroscopy as a Practical Alternative to Whole-Genome Sequencing*

En este segundo trabajo se evaluó la utilidad de la espectroscopia FTIR como herramienta de tipado rápido para la caracterización de brotes nosocomiales causados por *E. faecium* resistente a vancomicina (VREfm), comparando su rendimiento con diferentes análisis bioinformáticos de datos obtenidos por WGS (metodología de referencia). En contraste con el Artículo I, en este trabajo se evaluó la aplicabilidad del FTIR en un microorganismo grampositivo.

El estudio incluyó un total de 87 aislados de VREfm, recogidos entre abril de 2020 y octubre de 2023 y analizados retrospectivamente, de los cuales 56 se asociaron a tres brotes definidos mediante epidemiología convencional en los servicios de cirugía, nefrología y oncohematología (**Figura 1**, **Artículo II**). Al no haber consenso respecto cuál de los diferentes análisis bioinformáticos es considerado *gold standard* para delimitar los brotes producidos por VREfm (301,302), en este trabajo se emplearon tres análisis: *core genome Multi Locus Sequence Typing* (cgMLST), *core genome Single Nucleotide Polymorphisms* (cgSNP) y *Split Kmer Analysis* (SKA).

El análisis genómico reveló una cohorte con un claro predominio por dos linajes de alto riesgo, el ST80 (mayoritario) y el ST117, ambos

pertenecientes al complejo clonal CC17, asociado a ambientes nosocomiales (**Figura 2**, **Artículo II**). Empleando tanto la metodología cgMLST como cgSNP, se identificaron cuatro *clusters* genómicos y siete *singletons*, confirmándose la existencia de un brote monoclonal (nefrología) y dos brotes policlonales (cirugía y oncohematología) (**Figura 2**, **Artículo II**). Por otro lado, el análisis mediante SKA reveló cinco *clusters* genómicos y ocho *singletons* (**Figura 4**, **Artículo II**).

Estos resultados ponen de manifiesto la conocida dependencia del método bioinformático empleado y del punto de corte escogido en los análisis basados en WGS, tal y como se ha comentado en las limitaciones de los métodos de análisis bioinformáticos del apartado 1.5.3 de la tesis. Ante la ausencia de un análisis bioinformático *gold standard* para *E. faecium*, la elevada concordancia entre los resultados obtenidos mediante cgMLST y cgSNP (**Tabla Suplementaria 2**, **Artículo II**) y la literatura limitada en el uso de SKA, se decidió emplear cgMLST como metodología de referencia para el análisis bioinformático en este segundo artículo.

Por otro lado, el FTIR permitió identificar seis *clusters* y cinco *singletons* (**Figura 3**, **Artículo II**), agrupando correctamente la mayor parte de los aislados pertenecientes al *cluster* genómico predominante establecido por cgMLST (60/70 aislados del *cluster* mayoritario; 85,7%) (**Tabla Suplementaria 3**, **Artículo II**), incluyendo todos los aislados ambientales detectados durante el brote.

Al comparar la concordancia del FTIR frente al cgMLST, se obtuvieron valores de concordancia más elevados que los obtenidos para el Artículo I; el valor de AR fue de 0,644 (IC 95%: 0,457-0,838) y el valor de AW fue 0,944 (IC 95%: 0,928-0,960), indicando que la gran mayoría de los *clusters* genómicos establecidos mediante cgMLST fueron correctamente detectados por FTIR. Tal como sugieren algunos autores (377), el coeficiente de Wallace ajustado debería situarse en torno a 0,95 para garantizar que el FTIR tiene una concordancia equiparable a la WGS, y, por lo tanto, poder sustituir una metodología por otra. En el caso del Artículo I, el valor obtenido no llegaba a ese umbral y por eso se plantea como herramienta de cribado sin llegar a sustituir completamente la WGS para brotes producidos por *Kp*-BLEE. En el caso del Artículo II, los resultados obtenidos permiten plantear el FTIR como una alternativa válida para la determinación de clonalidad en brotes de VREfm, permitiendo reservar la WGS solamente para aquellos casos en los que el FTIR clasifique los aislados como *singletons* y persista un aumento de casos a pesar de la ausencia de relaciones clonales detectadas por FTIR.

En comparación con otros estudios publicados recientemente (378), el valor de AR obtenido en nuestro estudio fue ligeramente inferior (0,644 *vs*. 0,718). Esta diferencia podría explicarse por las características de la cohorte analizada. Mientras que el estudio de Park *et al*. se centró en un único brote que involucraba únicamente a cuatro pacientes, nuestra cohorte presentó mayor heterogeneidad ya que

incluyó tres brotes distintos y un total de 87 pacientes. Esta mayor heterogeneidad podría influir en el rendimiento de la técnica, ya que se ha sugerido que la precisión del FTIR puede disminuir a medida que aumenta el tamaño del conjunto de datos analizado (377).

Respecto a las discrepancias entre el FTIR y el cgMLST, y de forma similar al Artículo I, el FTIR mostró una tendencia a agrupar algunos aislados genómicamente no relacionados. Como se ha comentado anteriormente, al tratarse de una técnica fenotípica centrada en el análisis de una región concreta del espectro infrarrojo (carbohidratos), su correlación con las metodologías genotípicas puede no ser completa. Actualmente, los mecanismos responsables de estas discrepancias no se conocen con plena exactitud. Una posible explicación es que aislados genéticamente distintos puedan presentar perfiles fenotípicos similares en la composición o estructura de la pared celular, lo que generaría espectros infrarrojos comparables. Asimismo, aislados genéticamente similares pueden presentar perfiles espectrales distintos (358) debido a cambios en la regulación o expresión de genes implicados en la síntesis de estos componentes superficiales y podrían contribuir a estas discrepancias entre los perfiles espectrales y las relaciones genómicas.

Desde un punto de vista epidemiológico, el FTIR demostró una buena capacidad para identificar correctamente la mayoría de los aislados implicados en los brotes epidemiológicos: 33/41 aislados del brote de cirugía, 10/10 aislados del brote de nefrología y 3/5 aislados del brote

de oncohematología. De hecho, el rendimiento del FTIR fue ligeramente superior durante el periodo de los brotes epidemiológicos, de noviembre 2020 a mayo 2022 (AR=0,686; IC 95%: 0,462-0,919), que durante la posterior fase de casos esporádicos (AR=0,562; IC 95%: 0,215-0,938) (**Figura 1**, **Artículo II**), lo que sugiere que la utilidad del FTIR es mayor en escenarios de transmisión epidemiológica activa.

De forma análoga al Artículo I, los resultados de este estudio refuerzan la idea de que, si bien la WGS continúa siendo la herramienta *gold standard* para establecer relaciones clonales, su tiempo de respuesta y las dificultades asociadas a su integración en la rutina asistencial diaria pueden limitar su aplicación en el contexto de un brote epidemiológico (donde se requiere una respuesta rápida para un control precoz).

A fecha de redacción de esta tesis, en nuestro centro hospitalario no se han identificado brotes activos de VREfm. No obstante, con los resultados obtenidos en este trabajo, la metodología FTIR podría incorporarse como herramienta de primera línea para el estudio precoz de brotes de VREfm, permitiendo reservar la WGS para aquellos escenarios de transmisión persistente.

Como limitaciones de este estudio, al igual que en el primer trabajo, la tecnología FTIR requirió una validación interna previa para establecer el punto de corte óptimo. Para *E. faecium*, el fabricante recomienda el rango 0,15-0,20. En este segundo trabajo, se obtuvo un valor

ligeramente superior al rango, de 0,210-0,227 tras calcular el AR óptimo (**Figura Suplementaria 5**, **Artículo II**). Una segunda limitación del estudio fue que la cohorte analizada estuvo compuesta mayoritariamente por aislados pertenecientes a los ST80 y ST117 y procedían de un único centro, con lo cual podría limitar la extrapolación de los resultados obtenidos a otros contextos geográficos o a poblaciones con una mayor diversidad genómica.

En conjunto, este segundo trabajo demuestra que la espectroscopia FTIR ofrece una alternativa rápida, coste-efectiva y con resultados equiparables a la WGS para los brotes de VREfm. Su integración en la rutina del laboratorio de microbiología clínica como complemento a la epidemiología convencional puede contribuir de forma significativa a la gestión de brotes de VREfm.

Artículo II

Rapid Detection of VREfm Clusters: FTIR Spectroscopy as a Practical Alternative to Whole-Genome Sequencing

Jun Hao Wang-Wang, Laia Soler, Elisa Martró, Gemma Clarà, Jessica Hidalgo, Irma Casas, María-José García-Quesada, Montserrat Giménez, Verónica Saludes, Antoni E Bordoy y Pere-Joan Cardona

Open Forum Infectious Diseases, 2025 Nov 24;12(12):ofaf718

Open Forum Infectious Diseases

MAJOR ARTICLE

Rapid Detection of VREfm Clusters: FTIR Spectroscopy as a Practical Alternative to Whole-Genome Sequencing

Jun Hao Wang-Wang,[1,2] Laia Soler,[1] Elisa Martró,[1,2,3,4] Gemma Clarà,[1] Jessica Hidalgo,[1] Irma Casas,[5] María-José García-Quesada,[6,7] Montserrat Giménez,[1,8] Verónica Saludes,[1,2,3,4,a] Antoni E. Bordoy,[1,3,a] and Pere-Joan Cardona[1,2,3,8,a]

[1]Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Germans Trias I Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [2]Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, [3]Clinical and Experimental Microbiology, Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Spain, [4]Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, [5]Preventive Medicine Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [6]Infection Control Nursing, Infection Control Team, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [7]NURECARE-IGTP Nursing Research Group, Germans Trias i Pujol Research Institute, Badalona, Spain, and [8]Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) has become a significant nosocomial pathogen due to its potential to cause outbreaks. Whole-genome sequencing (WGS) is considered the reference method for determining genomic relatedness among outbreak strains, but its routine use in clinical microbiology laboratories remains challenging. Consequently, faster and simpler typing methods are needed. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) captures the unique infrared fingerprint of each isolate, enabling the comparison of spectral profiles to infer genomic relatedness. In this study, we evaluated the performance of FTIR for identifying genomic clusters of VREfm in a tertiary hospital, in comparison with three WGS-based methods: core-genome multilocus sequence typing (cgMLST), core-genome single nucleotide polymorphism analysis (cgSNP), and split *k*-mer analysis (SKA). A total of 87 VREfm isolates, collected between April 2020 and October 2023, were typed using both FTIR and WGS. Among these, 56 were associated with three outbreaks in the surgery, nephrology, and oncohematology units, according to conventional epidemiology. Concordance between typing methods was assessed using the Adjusted Rand index (AR) and Adjusted Wallace coefficient (AW). All three WGS-based methods yielded similar clustering results and revealed one monoclonal and two polyclonal outbreaks. Using cgMLST as the reference, an optimal FTIR cutoff range of 0.210–0.227 was determined. FTIR clustering results showed strong concordance with WGS-based methods; however, concordance with SKA was slightly lower. These findings suggest that FTIR provides clustering information comparable to WGS-based methods, providing a rapid and practical alternative to support timely infection control measures during VREfm outbreaks.

Keywords. cgSNP; FTIR; outbreak; SKA; vancomycin-resistant enterococcus faecium.

Infections caused by vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm) pose a considerable challenge due to multidrug resistance [1] and their capacity to spread in hospital environments, where they can cause outbreaks [2] and exacerbate the already significant burden of healthcare-associated infections [3]. In 1988, the first vancomycin-resistant *E. faecium* isolates were reported independently in France and the United Kingdom, marking the emergence of this resistance mechanism as a public health concern [4]. In Europe, the proportion of VREfm infections rose from 12.3% (2016) to 19.8% (2023), increasing mortality and costs [5]. The rise in VREfm cases has been particularly noteworthy in Germany [6], where the proportion of VREfm cases reached a peak of 26.3% in 2019 but subsequently declined to 12.7% in 2023 [7]. Conversely, the percentage of VREfm in Spain remained below 3% from 2016 to 2022 [8]. Particularly, in the hospitals of Catalonia, there were no reported cases of VREfm until 2020 when the first cases were detected shortly after the beginning of the COVID-19 pandemic. Currently, the VREfm resistance proportion remains around 3% in Catalonia. At Hospital Germans Trias i Pujol the proportions were 8.5% in 2020, 10.0% in 2021, and 1.0% in 2023.

The 2020–2021 increase in our hospital prompted the evaluation of faster typing tools for outbreak management. DNA-based methods such as pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and whole-genome sequencing (WGS) have been widely used [9, 10], being WGS the current gold standard due to its high discriminatory power [11]. However, routine implementation of WGS remains limited by high turnaround times primarily caused by bioinformatic analysis [12]. A lack

Received 08 September 2025; accepted 17 November 2025; published online 24 November 2025

[a]Verónica Saludes, Antoni E. Bordoy and Pere-Joan Cardona contributed equally to this work. Author order was determined on the basis of correspondence role and experience.

Correspondence: Pere-Joan Cardona, MD, PhD, Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias I Pujol, Crta. del Canyet s/n, Badalona, Catalonia 08916, Spain (pcardonai.germanstrias@gencat.cat; pj.cardona@gmail.com).

Open Forum Infectious Diseases®

© The Author(s) 2025. Published by Oxford University Press on behalf of Infectious Diseases Society of America. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

https://doi.org/10.1093/ofid/ofaf718

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

of a gold standard WGS analysis approach for VREfm outbreak delimitation also exists. Core genome multilocus sequence typing (cgMLST) has been widely used due to its standardized and stable nomenclature and the availability of commercial software tools [13]. Single nucleotide polymorphism (SNP) distances generated from core genome alignments are also usually used for outbreak delimitation. In this case, some studies have proposed that recombination masking may be inaccurate for highly recombinant species such as *E. faecium,* as it can underestimate the number of SNPs and artificially cluster isolates more closely than they really are [14]. Alternatively, split *k*-mer analysis (SKA) may offer greater discriminatory power than cgMLST for VREfm outbreak delimitation, though current evidence is limited [12, 15]. For these methods, determining the adequate clustering threshold to define close genomic relatedness can also be an important limitation. Therefore, selecting an appropriate WGS-based analysis method for VREfm outbreak analysis requires careful consideration.

Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy has emerged as a phenotypic alternative with resolution suitable for typing and outbreak delimitation [16]. FTIR quantifies absorption by carbohydrates, lipids, and proteins [17, 18]. Each isolate's infrared fingerprint is then compared with the rest so that relationships between bacterial lineages can be established based on spectrum analysis [19]. Previous work supports FTIR for Gram-positive [2] and Gram-negative pathogens with internal validation [20–23].

The aim of the present study was to evaluate the capacity of IR Biotyper (Bruker GmbH, Leipzig, Germany) to track emergent VREfm genomic clusters at a tertiary hospital in comparison with three different WGS analysis methods.

MATERIAL AND METHODS

Study Design and Setting

Retrospective cross-sectional study in a tertiary care hospital serving 200 000 inhabitants and reference for 1 200 000 in Barcelona's Northern Metropolitan Area (Spain). We analyzed 87 VREfm isolates from hospitalized patients ($n = 83$) and four environmental samples from the surgery department, collected April 2020–October 2023. Fifty-six isolates were associated with three epidemiologically defined outbreaks (surgery, nephrology, oncohematology). A nosocomial outbreak was declared by the infection control team upon the detection of ≥2 clinical or ≥3 rectal swab isolates within one month in a single ward. Only isolates from patients who were VREfm negative at the time of admission were considered. Thus, all included isolates were detected after the first 48 hours of hospitalization by routine screening. The date of outbreak closure was set when no VREfm isolates were identified in the same hospital ward for 3 months since the last identification. The remaining isolates were considered unrelated to these outbreaks (Supplementary Table 1).

Ethics Statement

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the University Hospital Germans Trias i Pujol in Barcelona, Spain (PI-24–118).

Routine Microbiological Diagnostics and Antimicrobial Susceptibility Testing

All isolates were firstly identified with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). The antibiotic susceptibility of vancomycin and teicoplanin was assessed using a gradient test (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France), while linezolid susceptibility was evaluated through disk diffusion (Bio-Rad Laboratories Inc., California, United States). For blood cultures, susceptibility to vancomycin, teicoplanin, and linezolid was determined using the VITEK-2 Compact system (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). Interpretation of minimum inhibitory concentration (MIC) values and disk diffusion zone diameters followed the criteria established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [24]. All isolates were subsequently preserved in Cryoinstant® Natural storage medium (Scharlab S.L., Barcelona, Spain) at −80°C until further analyses.

Sample Preparation for FTIR Analysis and Spectrum Analysis

All VREfm isolates were thawed at room temperature and cultured in Columbia Agar + 5% sheep blood (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France) for 24 hours at 37°C. Then, bacterial isolates were subcultured in Mueller-Hinton agar medium from a single colony (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) for another 24 hours at 37°C before testing. Preparation of bacterial suspensions was performed as previously described by Wang-Wang *et al.* [23] Briefly, a loopful of bacterial cells was resuspended in 50 µL of deionized water in a 1.5-mL suspension vial containing metal beads (Bruker GmbH, Leipzig, Germany) and homogenized by vortexing. Subsequently, 50 µL of 70% (v/v) ethanol was added to each vial, followed by a second homogenization step. Then, 15 µL of each bacterial suspension was spotted in quadruplicate onto a 96-spot silicon plate (Bruker GmbH, Leipzig, Germany). For quality control, 12 µL of two infrared test standards (IRTS 1 and IRTS 2, each containing an *Escherichia coli* strain with a defined reference spectrum) were placed in duplicate on the same silicon plate. The plate was then dried at 37°C for 30 minutes prior to insertion into the Biotyper system. For spectrum acquisition, all samples were analyzed in transmission mode using the default analysis settings (wavelength region 1300–800 cm^{-1}).

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

Samples that did not meet the manufacturer's quality criteria were excluded. The acceptance parameters were as follows: absorption between 0.4 and 2, noise ($\times 10^{-6}$) < 300, signal-to-noise ratio R2 > 200, signal-to-noise ratio R3 > 40, water vapor ($\times 10^{-6}$) < 300, signal-to-water ratio (R2) > 100, signal-to-water ratio (R3) > 20, and fringes ($\times 10^{-6}$) < 100. Based on these criteria, 19 samples required reanalysis until at least three valid spectra were obtained for each isolate. Of these, 13 yielded valid spectra, whereas no valid spectra could be recovered for the remaining six samples, which were therefore excluded from the study. An average spectrum for each individual strain was subsequently generated from the qualified spectra using the OPUS 8.2.28 software (Bruker GmbH, Leipzig, Germany).

The resulting average spectra were then used to construct a dendrogram based on hierarchical cluster analysis (HCA) using the Euclidian metric distance and the average linkage method (UPGMA) without dimensionality reduction techniques. The optimal clustering cutoff within a slightly extended range (0.15–0.25) of that recommended by the manufacturer (0.15–0.20) was calculated. Isolates showing an FTIR spectral distance equal to or below this cut-off value were classified within the same FTIR cluster, whereas those exceeding the threshold were considered FTIR singletons.

Sample Preparation for WGS Analysis and Bioinformatics Analyses

For WGS analysis, all VREfm samples were prepared and sequenced as previously described [23], except for solid sample culture that was performed in Columbia CNA agar (bioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, France). The WGS clustering analysis of VREfm isolates was performed based on pairwise genome comparisons using three different genomic approaches: cgMLST, cgSNP, and SKA. Additionally, antimicrobial resistance genes were detected using Abricate v1.0.1 against the NCBI database [25, 26].

Regarding clustering analysis, the observed distributions of pairwise allelic differences and SNPs were used to infer clustering cutoffs. More specifically, for each clustering methodology, the distribution of pairwise distances was modeled applying a Gaussian Mixture Model (GMM) using the Mclust function from the mclust R package (https://www.r-project.org/). The clustering cut-off was then set at the 99th percentile of the fit corresponding to the first component (cgMLST: ≤11 allelic differences; cgSNP: ≤22 SNPs for ST80 and ST80-like isolates, ≤9 SNPs for ST117 isolates; SKA: ≤30 SNPs; Supplementary Fig. 1). For cgMLST analysis, genomic clusters were defined as ≥2 isolates of the same sequence type (ST) and a genetic below the established threshold of allelic differences. cgMLST analysis was performed with Ridom SeqSphere + software 8.5 (Ridom GmbH, Münster, Germany) using SPAdes v3.15.4 for *de novo* assembly, using the typing scheme of 1423 genes published by Been *et al.*, [27] and the parameter "pairwise ignoring missing values". A quality criterion of ≥97% good cgMLST targets and a coverage of ≥30× was applied. From this analysis, ST, clonal complexes (CC) and complex types (CT) were also obtained. For cgSNP analysis, raw reads were trimmed using Trimmomatic v0.39 (LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:5:25 MINLEN:60) [28]. cgSNP analysis was performed separately for ST80 (and ST80-like) and ST117 isolates to provide a greater degree of pairwise SNP resolution, as recommended [16]. To establish the population structure of the isolates, for each predominant ST, trimmed reads were mapped to a close reference genome when possible, using snippy v4.6.0 (mincov 10, minfrac 0.9); genome alignments without masking for recombination were then used to infer a phylogenetic tree using IQtree v2.2.2.3 [29] with 1000 ultrafast bootstraps and a generalized time-reversible model (GTR). snp-dists was used to calculate pairwise SNP distances. Clusters were defined as ≥2 isolates of the same ST, with a genetic distance below the established SNP threshold according to ST and a monophyletic origin supported by a bootstrap value ≥90%. For SKA analysis, SNPs were defined as "number of split kmers found in both samples where the middle base is an A, C, G, or T but differs between files" [30].

Concordance Between Clustering Methodologies

Concordance between FTIR and each WGS method was assessed using Adjusted Rand (AR) and Adjusted Wallace (AW) [31–33], using an online tool (www.comparingpartitions.info) with 95% confidence intervals (95% CI). AR indicates the overall agreement of each cluster composition between two techniques. AW measures the directional probability that two isolates detected in a cluster by a reference technique are also detected in the same cluster using an alternative technique.

RESULTS

Emergence of VREfm

On April 2020, the first VREfm isolates were recovered from rectal swabs of two ICU patients. In November 2020, an outbreak was declared in surgery (three clinical and one surveillance sample). Secondary outbreaks occurred in January and April 2021 in oncohematology and nephrology, respectively. During late 2021, most isolates came from surgery, peaking in September. From February 2022 onward, sporadic cases appeared across wards, mostly not linked to outbreaks (Figure 1, Supplementary Table 1). All isolates showed phenotypic resistance to vancomycin and all but one (isolate 84) susceptibility to linezolid. Regarding teicoplanin, only isolate 87 was sensitive.

cgMLST and cgSNP Analysis

Initial cgMLST analysis using a cutoff of ≤11 allelic differences revealed that most isolates belonged to two differentiated

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

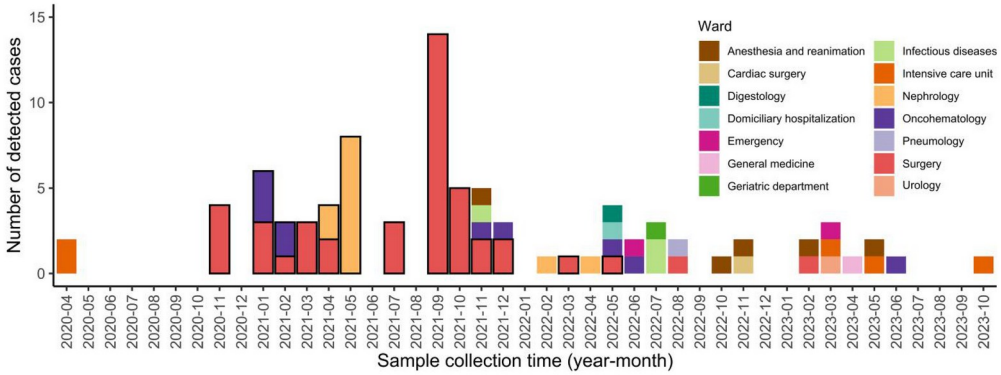


Figure 1. Distribution of VREfm isolates according to their hospital location. Isolates associated with each of the three epidemiological outbreaks (surgery, nephrology and oncohematology wards) are indicated with a black border.

populations: one consisting of ST80 ($n = 69$; of which 66 belonged to CT5967, two to CT6492 and one to CT847) and ST80-like isolates ($n = 4$; three with a novel *gyd* allele and one with a novel *purK* allele; all four belonging to CT5967), and the other comprising isolates of ST117 ($n = 12$). Additionally, one isolate belonged to ST761, and another belonged to novel ST2840 (*atpA* 9, *ddl* 1, *gdh* 1, *purK* 73, *gyd* 12, *pstS* 1, *adk* 1). All typed isolates belonged to clonal complex 17 (CC17). *vanA* was detected in all isolates except 87 (*vanB*); *cfr*(D) was present in isolate 84, matching phenotype. cgMLST grouped all but seven isolates into four clusters (cgMLST_1–cgMLST_4; Figure 2). cgMLST_1 contained 80.5% (70/87), including four environmental isolates, all of which belonged to CT5967. Other clusters had 2–4 isolates each. cgSNP with cut-offs ≤22 (ST80/ST80-like) and ≤9 (ST117) matched cgMLST clustering, identifying four clusters and seven singletons (Figure 2). Of note, the potential effect of not masking recombination sites on the identified clusters was assessed. Masking for recombination consistently resulted in lower pairwise SNP distances than their unmasked counterparts. However, cluster composition after readjusting clustering cut-offs (ie, ≤18 SNPs for ST80 and ST80-like isolates, ≤6 SNPs for ST117 isolates) was identical to that obtained without masking for recombination (Supplementary Figs. 2 and 3). Regarding outbreaks identified by conventional epidemiology, nephrology's outbreak was monoclonal (cgMLST_1), whereas surgery and oncohematology were polyclonal but dominated by cgMLST_1 (Supplementary Table 1).

SKA Clustering Reveals Little Subdivision Within cgMLST Clusters

SKA identified five clusters (SKA_1–SKA_5) and eight singletons using a cut-off of 30 SNPs. Among the cgMLST-defined clusters, only cgMLST_1 was further subdivided by SKA into two distinct clusters (SKA_1 and SKA_2) and one singleton. SKA_1 was the largest cluster, comprising 75.9% (66/87) of the study isolates, while SKA_2 included the remaining three isolates originally assigned to cgMLST_1 (Figure 2). For all other isolates, identical clustering results between cgMLST and SKA were obtained ($AR_{cgMLST\text{-}SKA} = 0.850$ [0.708–0.998]). No clear epidemiological link existed among SKA_2 isolates; as they were ≥2 months apart and from different wards. Additionally, as the SNP threshold used for SKA clustering considerably differed from those commonly used in the literature (7–12 SNPs) [12–15], a sensitivity analysis was performed on this parameter. Lowering the threshold from 30 to 12 SNPs subdivided cluster SKA_1 into three clusters and one singleton, while not affecting the clustering of the remaining isolates (Supplementary Fig. 4). This resulted in a lower concordance between SKA and cgMLST ($AR_{cgMLST\text{-}SKA12} = 0.418$ [0.260–0.581]). Further decreasing the threshold continued to reduce the concordance between SKA and cgMLST (Supplementary Table 2).

FTIR Largely Captures WGS Clusters and Reflects Epidemiological Outbreaks

Given the similar results obtained across the three WGS-based approaches, and to facilitate interpretation, FTIR clustering performance was first compared with cgMLST as the reference method, and subsequently evaluated against SKA (confusion matrices are provided in Supplementary Tables 3–5). For FTIR clustering, an optimal cutoff range of 0.210 to 0.227 was obtained after maximizing AR (Supplementary Fig. 5) using cgMLST as the reference. Using this cutoff, FTIR yielded six clusters (FTIR_1–FTIR_6) plus five singletons (Figure 3).

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

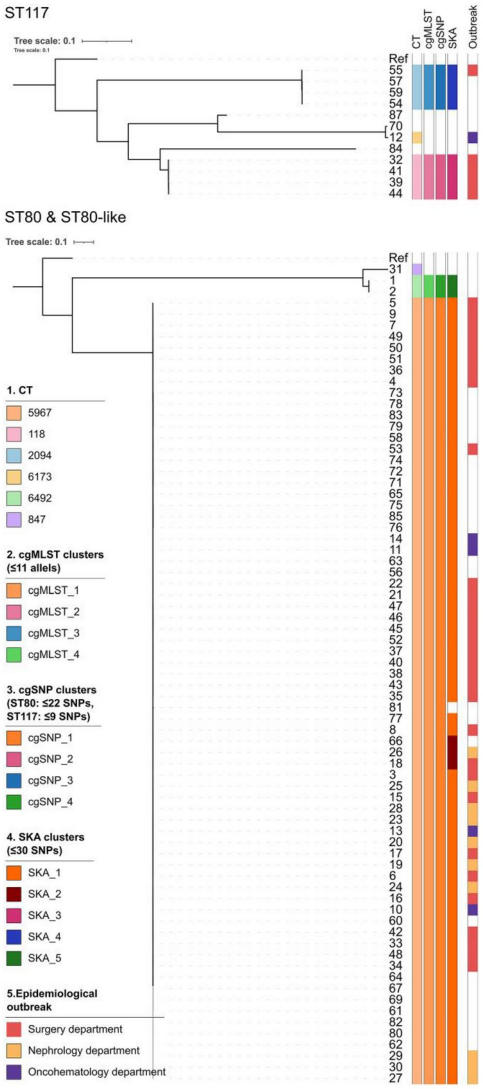


Figure 2. Maximum-likelihood phylogenetic tree (GTR) obtained from cgSNP analysis of VREfm isolates showing clusters identified by cgMLST, cgSNP and SKA approaches as well as epidemiological outbreak. ST80 reference: AUSMDU00004142 (accession no. CP027501.1); ST117 reference: VRE5755 (accession no. DAIGYV000000000.1).

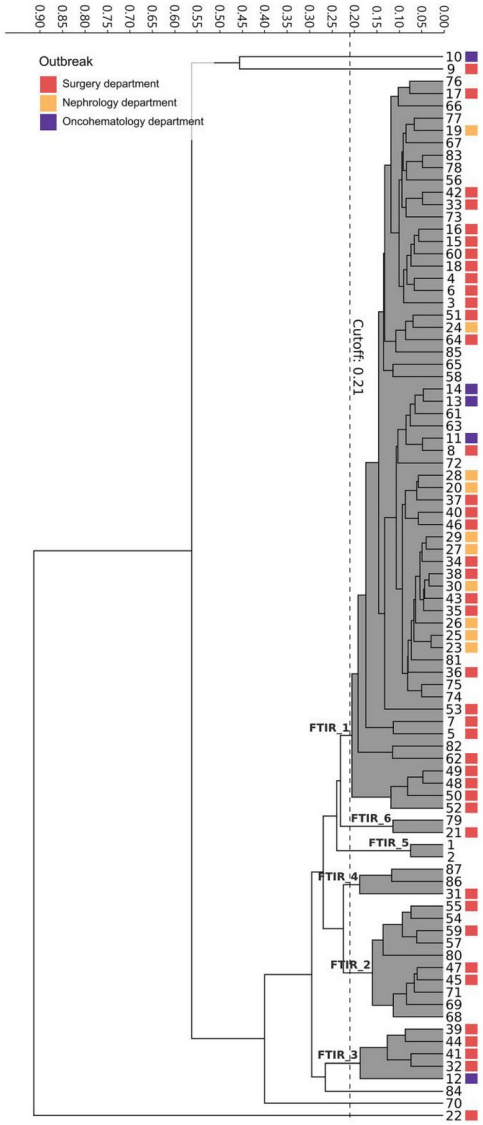


Figure 3. Dendrogram obtained by clustering the FTIR spectra of 87 VREfm. The vertical dashed line indicates the used cutoff value (0.21) for clustering analysis. The resulting FTIR clusters are shadowed in gray. Isolates belonging to epidemiological outbreaks are annotated in color.

Cluster cgMLST_1 was largely captured by cluster FTIR_1, which included 60 of the 70 cgMLST_1 isolates (85.7%), including all four environmental isolates. However, seven cgMLST_1 isolates were misclassified by FTIR into clusters FTIR_2 ($n = 5$) and FTIR_6 ($n = 2$), and three were identified as singletons

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

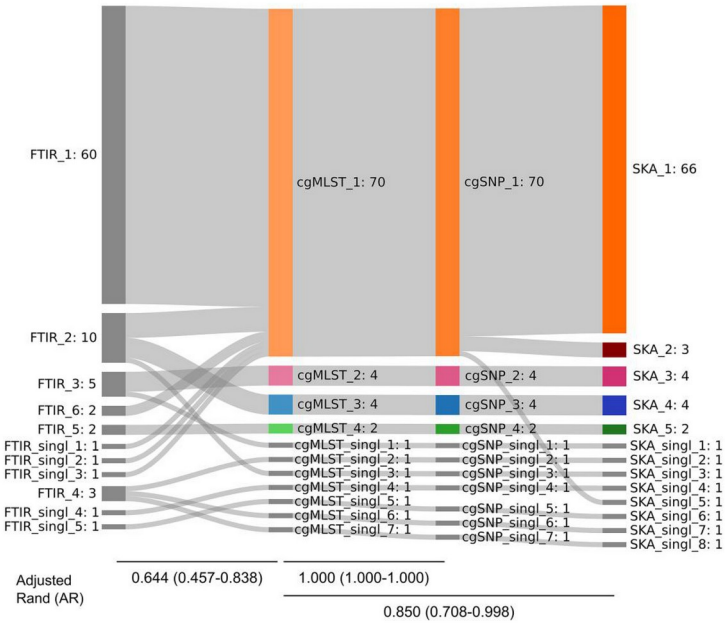


Figure 4. Relationship between Fourier-Transform Infrared spectroscopy (FTIR) and genomic methods (cgMLST, cgSNP, SKA) for genomic clustering of VREfm isolates. Clustering cutoffs (FTIR: ≤0.21, cgMLST: ≤11 allelic differences, cgSNP: ≤22 SNPs for ST80 and ≤9 SNPs for ST117, SKA: ≤30 SNPs). Clusters and singletons detected by each method are indicated with a correlative number along with the number of cases in partition.

(Figure 4). FTIR_2 also included all four isolates of cgMLST_3 ($n = 4$, ST117) and isolate 68, of ST2840, thus clustering together isolates of different STs. Conversely, full concordance between cluster cgMLST_4 and FTIR_5 ($n = 2$) was observed. Lastly, three out of five cgMLST singletons were grouped together into cluster FTIR_4. Overall, these results yielded a value of 0.644 (95% CI, 0.457–0.838), and 0.944 (95% CI, 0.928–0.960) for AR and AW respectively, when comparing FTIR versus cgMLST ($AW_{FTIR \rightarrow cgMLST}$) as the reference method. An AW value of 0.489 (95% CI, 0.224–0.754) for cgMLST versus FTIR ($AW_{cgMLST \rightarrow FTIR}$) as the reference method. The concordance of FTIR with the SKA was slightly lower as SKA further subdivided cluster cgMLST_1 into clusters SKA_1 and SKA_2, and a singleton. Therefore, the comparison of SKA versus FTIR yielded an AR value of 0.543 (95% CI, 0.352–0.745), an $AW_{FTIR \rightarrow SKA}$ of 0.660 (95% CI, 0.396–0.923) and an $AW_{SKA \rightarrow FTIR}$ of 0.462 (95% CI, 0.187–0.737). Regarding the three hospital outbreaks, FTIR correctly inferred a true genomic relationship for 33 out of 41 (80.5%) VREfm isolates of the surgery department outbreak: 29 were assigned to cluster FTIR_1 (cgMLST_1) and 4 to cluster FTIR_2 (cgMLST_3); all 10 isolates of the nephrology department outbreak were grouped into FTIR_1 (cgMLST_1); and, for the oncohematology department outbreak, FTIR clustered 3 of the 5 isolates of cluster cgMLST into cluster FTIR_1.

To further investigate the performance of FTIR in different epidemiological scenarios, we divided the cases in two periods: an "outbreak emergence and peak" period from April 2020 to December 2021 ($n = 60$), when most isolates were associated with outbreaks in the surgery, nephrology and oncohematology wards, and a "sporadic cases" period from February 2021 to October 2023 ($n = 27$). The corresponding $AR_{cgMLST\text{-}FTIR}$ for the emergence and peak period was 0.686 (95% CI, 0.462–0.919), slightly higher than that of the post-outbreak period, which was 0.562 (95% CI, 0.215–0.938). This suggests that the performance of FTIR might be slightly higher during active outbreak periods.

DISCUSSION

VREfm is a major cause of a range of infections in humans, including, urinary tract infections, wound infections, bloodstream infections, and endocarditis, and is frequently associated with nosocomial outbreaks. Although our 2020–

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

2021 outbreaks had limited clinical impact, since most cases represented colonization (rectal swabs) rather than infection and no associated fatalities occurred, they demanded substantial infection-control efforts. These included patient isolation, reinforcement of hygiene measures and enhanced environmental disinfection. Four environmental isolates were also recovered, confirming the persistence of VREfm in the hospital environment and supporting targeted cleaning interventions. These measures were guided by typing results, which enabled the rapid identification of transmission clusters and differentiation between unrelated cases, thereby underscoring the importance of rapid and reliable typing methods for outbreak management. Therefore, in the present study, we evaluated FTIR for identifying VREfm genomic clusters. We show that FTIR clusters VREfm isolates in close agreement with multiple WGS approaches, supporting its use as a practical first-line tool for initial screening and outbreak detection to enable faster infection-control responses. In addition to its value for early outbreak detection, FTIR can be particularly useful for ruling out sporadic cases that are not related to previous outbreak strains, thereby avoiding unnecessary investigations and infection control measures. Moreover, identifying sporadic VREfm cases with FTIR can support antimicrobial stewardship programs by indicating elevated antibiotic pressure and facilitating targeted interventions to reduce unnecessary antimicrobial use in those clinical units.

Previous studies have demonstrated the potential of FTIR as a typing tool for Gram-negative bacteria, including *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* [20–22]. In line with this, we previously evaluated FTIR for typing *Klebsiella pneumoniae* nosocomial outbreaks, with successful implementation in our hospital setting [23]. More recently, FTIR has also been applied to Gram-positive bacteria, including *Enterococcus faecium*, as demonstrated in recent studies [2, 34, 35]. Here, we provide additional evidence for the expansion of FTIR applicability to outbreak management beyond Gram-negative pathogens.

Most isolates were ST80 and ST117, high-risk clones associated with nosocomial spread [36, 37]. ST80 (83.9% of isolates) predominates in Spain [38], and a recent study in Barcelona reported perfect early-detection concordance between FTIR and genomic methods for an ST80 spread [35]. Although confirmation would be required to determine whether the strains responsible for the outbreaks in our hospital and in the Barcelona study are related, these findings collectively suggest the emergence of ST80 VREfm isolates causing nosocomial outbreaks in this geographic area. Given the rapid dissemination of this ST, continuous surveillance is crucial.

Given the absence of a single gold-standard WGS strategy, we compared cgMLST, cgSNP, and SKA [12, 15]. In the literature, cgMLST analysis has been widely used and is often considered as the standard for outbreak analysis of diverse bacterial species in many settings. cgMLST uses a defined scheme which comprises a large number of conserved genes, which allows for dataset comparison in a standardized manner. Compared with cgMLST, cgSNP analysis offers higher cluster resolution by relying on SNP differences rather than allele distances. However, its performance is highly dependent on the choice of the reference genome. Using a distantly related reference can artificially inflate the number of detected pairwise SNPs, thereby compromising the fine-scale resolution required for accurate outbreak delineation [14]. More recently, SKA has emerged as a robust method for VREfm outbreak investigation, offering higher discriminatory power than cgMLST [12, 15]. Studies by Higgs *et al.* and Maechler *et al.* have shown that SKA more accurately infers patient-to-patient transmission, outperforming cgMLST at commonly used thresholds of ≤25 and ≤20 allelic differences, respectively. At these levels, cgMLST often lacks sufficient resolution to differentiate closely related strains. Despite its strengths, a key challenge in SKA—and in WGS-based approaches in general—is defining appropriate clustering cutoffs. These must be interpreted alongside epidemiological data, which are often complex and context-dependent. In our study, clustering thresholds were selected at the 99th percentile first peak in the global distribution of pairwise allelic or SNP differences and were supported by strong spatiotemporal links among isolates. This approach resulted in a clustering cutoff for cgMLST of ≤11 allelic differences, improving cgMLST resolution compared with commonly used thresholds of ≤25 or ≤20. cgSNP cutoffs differed among STs: ≤22 SNPs for ST80 and ST80-like, and ≤9 SNPs for ST117. Finally, for SKA, a threshold of 30 SNPs was selected—considerably higher than the 7–12 SNP range commonly reported in the literature [12–15]. However, it is important to note that FTIR performance was still acceptable when compared with SKA clustering at a threshold of 12 SNPs. Besides, our tailored approach led to considerable harmonization across the three WGS analyses, in contrast with previous studies where results varied substantially depending on the method and parameters used [12, 15].

In the present study, an AR of 0.644 (95% CI, 0.457–0.838), an $AW_{FTIR \rightarrow cgMLST}$ of 0.944 (95% CI, 0.928–0.960) and an $AW_{cgMLST \rightarrow FTIR}$ of 0.489 (95% CI, 0.224–0.754) were obtained. Teng *et al* [16]. suggested that an AW of 0.95 or higher should be met when comparing FTIR versus WGS as the gold standard method. This ensures that FTIR clusters the large majority of isolates clustered by WGS without missing potential transmission events. Additionally, an AW of at least 0.5 should be met when using WGS compared with FTIR as a reference method to avoid detection of falsely clustered isolates, which would trigger unnecessary WGS confirmation. In this work, both AW values were marginally below those proposed by Teng *et al.* A slightly lower concordance was observed between FTIR and SKA clustering (AR 0.543 [95% CI, 0.352–0.745]). This value was similar to the results obtained by Park and

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

Ryoo, who assessed the performance of the FTIR for VREfm clustering in a neonatal intensive care unit outbreak involving four patients. The outbreak was predominantly caused by ST17 and an AR of 0.718 (95% CI, 0.466–0.996) between FTIR and SKA was obtained [39]. In contrast, our study includes three distinct epidemiological outbreaks—one monoclonal and two polyclonal—involving 87 patients, thereby representing a higher level of epidemiological complexity. Thus, our results taken together with those reported by Pitart *et al* [35]. Highlight a potentially broader applicability of FTIR beyond monoclonal outbreak scenarios. It is also important to note that it has been suggested that the performance of FTIR decreases as the dataset size increases [16], which could be partially the cause of the lower performance of FTIR observed in the present study in comparison to the previously published literature. Consequently, further investigation of the performance of FTIR using large datasets of different STs and geographical areas is still needed.

As with WGS, the lack of a standardized clustering cutoff across different laboratories represents a key limitation of FTIR. Before implementing FTIR for early detection of genomic clusters, each laboratory must validate its own clustering cutoff, which may vary based on local epidemiology and the culture media used. The manufacturer recommends a cutoff range of 0.15 to 0.20 for *E. faecium*. Our findings, consistent with previously published data, suggest that the optimal cutoff lies within or near this recommended range [2, 35, 39]. Another limitation of FTIR is its lower discriminatory power relative to WGS-based methods. FTIR provides a global spectral fingerprint that reflects multiple cellular components, including polysaccharides, fatty acids, and proteins. However, the wavelength range applied in our study (1300–800 cm^{-1}) primarily targets the polysaccharide region of the bacterial envelope. Consequently, isolates with identical genomic backgrounds may exhibit differences in their polysaccharide profiles, potentially leading to misclassification [22].

Our study also has several limitations. Firstly, isolates were predominantly ST80 and ST117 and originated from a single hospital. This limited genetic diversity and single-center design restrict the generalizability of our findings, as FTIR performance may differ when applied to other VREfm sequence types, geographic regions, or epidemiological contexts. As FTIR spectral signatures can be influenced by strain-specific phenotypic characteristics, further validation using a more genetically diverse set of isolates is warranted. Expanding FTIR analyses to multicenter collections could not only strengthen methodological validation but also facilitate the early detection of new emerging VREfm lineages, as recently proposed in large-scale FTIR surveillance studies [40]. Secondly, despite the acknowledged inherent differences between genotypic and phenotypic methods, the reasons behind the lack of concordance between FTIR and cgMLST for some isolates were beyond the scope of this study and remain unclear.

Collectively, our results showed that FTIR clustering provides results comparable to those obtained from WGS analyses. While FTIR delivers more limited information, its speed and simplicity make it a viable method for real-time outbreak management. FTIR represents a cost-effective approach (approximately 17€ per sample compared with 70€ for WGS considering only reagents) and does not require highly specialized technical personnel. In terms of turnaround time, WGS results from a positive culture may take up to approximately a week, whereas FTIR can deliver results in about 3 hours.

Based on these findings, we propose a practical workflow for outbreak management. In suspected outbreak situations, FTIR could be used as an initial screening tool to rapidly assess the relatedness of isolates. If FTIR results indicate clonal spread, infection control measures to tackle active transmission should be initiated. However, in the case of epidemiologically linked cases not clustered by FTIR, WGS analysis should be performed to assess genomic relatedness and guide further interventions. Thus, FTIR can serve as a frontline tool for outbreak confirmation in settings where WGS is not immediately accessible, enabling faster and more targeted outbreak responses.

Supplementary Data

Supplementary materials are available at *Open Forum Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

Notes

Acknowledgments. We thank the Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP) Translational Genomics Core Facility and staff for their contribution to this publication.

Data availability. The raw reads analyzed for this study have been deposited in the European Nucleotide Archive (ENA) at EMBL-EBI under BioProject PRJEB82335.

Financial support. This work was supported by the Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya [grant number PERIS SLT028/23/000129 to A. E. B.].

Potential conflicts of interest. The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Kjær Hansen S, Andersen L, Detlefsen M, et al. Using core genome multilocus sequence typing (cgMLST) for vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates to guide infection control interventions and end an outbreak. J Glob Antimicrob Resist **2021**; 24:418–23.
2. Scheier TC, Franz J, Boumasmoud M, et al. Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of vancomycin-resistant Enterococcus faecium: performance analysis and outbreak investigation. Microbiol Spectr **2023**; 11:e0098423.
3. Murray CJL, Ikuta KS, Sharara F, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet **2022**; 399:629–55.
4. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in Enterococcus Faecium. N Engl J Med **1988**; 319: 157–61.

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

5. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-net)—annual epidemiological report 2023. Stockholm: ECDC, **2024**.
6. Cimen C, Berends MS, Bathoorn E, et al. Vancomycin-resistant enterococci (VRE) in hospital settings across European borders: a scoping review comparing the epidemiology in the Netherlands and Germany. Antimicrob Resist Infect Control **2023**; 12:78.
7. Cimen C, Voss A, Hellkamp J, Hamprecht A, Berends MS. Temporal trends of enterococcal and vancomycin-resistant Enterococcus faecium bacteraemia in the northern Dutch-German cross-border region: a 10-y multicentre analysis (2013–2022). J Glob Antimicrob Resist **2025**; 42:187–94.
8. European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023–2021 data. Solna: ECDC, **2023**.
9. Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect **2013**; 19:803–13.
10. European Centre for Disease Prevention and Control. Monitoring the use of whole-genome sequencing in infectious disease surveillance in Europe. Solna: ECDC, **2018**. 31.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC Strategic framework for the integration of molecular and genomic typing into European surveillance and multi-country outbreak investigations—2019–2021. Stockhol: ECDC, **2019**.
12. Higgs C, Sherry NL, Seemann T, et al. Optimising genomic approaches for identifying vancomycin-resistant Enterococcus faecium transmission in healthcare settings. Nat Commun **2022**; 13:509.
13. Deurenberg RH, Bathoorn E, Chlebowicz MA, et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. J Biotechnol **2017**; 243:16–24.
14. Gorrie CL, Da Silva AG, Ingle DJ, et al. Key parameters for genomics-based real-time detection and tracking of multidrug-resistant bacteria: a systematic analysis. Lancet Microbe **2021**; 2:e575–83.
15. Maechler F, Weber A, Schwengers O, et al. Split k-mer analysis compared to cgMLST and SNP-based core genome analysis for detecting transmission of vancomycin-resistant enterococci: results from routine outbreak analyses across different hospitals and hospitals networks in Berlin, Germany. Microb Genomics **2023**; 9:1–14.
16. Teng ASJ, Habermehl PE, van Houdt R, et al. Comparison of fast Fourier transform infrared spectroscopy biotyping with whole genome sequencing-based genotyping in common nosocomial pathogens. Anal Bioanal Chem **2022**; 414: 7179–89.
17. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature **1991**; 351:81–2.
18. Griffiths PR, de Haseth JA. Fourier Transform infrared spectrometry. Hoboken, New Jersey: Science: Wiley, **2007**; 222:297–302.
19. Deidda F, Bozzi Cionci N, Cordovana M, et al. Bifidobacteria strain typing by Fourier transform infrared spectroscopy. Front Microbiol **2021**; 12:1–10.
20. Martak D, Valot B, Sauget M, et al. Fourier-Transform InfraRed spectroscopy can quickly type gram-negative Bacilli responsible for hospital outbreaks. Front Microbiol **2019**; 10:1440. doi:10.3389/fmicb.2019.01440
21. Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **2019**; 38:427–48.
22. Rakovitsky N, Frenk S, Kon H, et al. Fourier transform infrared spectroscopy is a new option for outbreak investigation: a retrospective analysis of an extended-Spectrum-Beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae outbreak in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol **2020**; 58:e00098-20.
23. Wang-Wang JH, Bordoy AE, Martró E, et al. Evaluation of Fourier transform infrared spectroscopy as a first-line typing tool for the identification of extended-Spectrum β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae outbreaks in the hospital setting. Front Microbiol **2022**; 13:897161.
24. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 13.1. Data access December 2023. Available at: http://www.eucast.org
25. Seemann T. Abricate. Github. Available at: https://github.com/tseemann/abricate
26. Feldgarden M, Brover V, Haft DH, et al. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. Antimicrob Agents Chemother **2019**; 63: e00483-19.
27. de Been M, Pinholt M, Top J, et al. Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of Enterococcus faecium. J Clin Microbiol **2015**; 53:3788–97.
28. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data. Bioinformatics **2014**; 30:2114–20.
29. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: new models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. Mol Biol Evol **2020**; 37:1530–4.
30. Harris SR. SKA: split kmer analysis toolkit for bacterial genomic epidemiology. bioRxiv [Preprint]. 2018. 453142. Available at: https://www.biorxiv.org/content/10.1101/453142v1.abstract
31. Santos JM, Embrechts M. On the use of the adjusted rand Index as a metric for evaluating supervised classification, eds. Lecture notes in computer science (including subseries lecture notes in artificial intelligence and lecture notes in bioinformatics). Berlin, Heidelberg: Springer, **2009**:175–84.
32. Severiano A, Pinto FR, Ramirez M, Carriço JA. Adjusted wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. J Clin Microbiol **2011**; 49: 3997–4000.
33. Hoffman M, Steinley D, Brusco MJ. A note on using the adjusted Rand index for link prediction in networks. Soc Networks **2015**; 42:72–9.
34. Wong RCW, Cheung IYY, Lai CKC, et al. Potential use of Fourier-transform infrared spectroscopy as a rapid screening tool for investigating nosocomial outbreaks of ST-80 vancomycin-resistant Enterococcus faecium. J Hosp Infect **2025**; 155:161–9.
35. Pitart C, Piquet M, Burgwinkel T, et al. Early identification of the nosocomial spread of vancomycin-resistant Enterococcus faecium by Fourier-transform infrared spectroscopy and performance comparison with PFGE and WGS. Emerg Microbes Infect **2024**; 13:1–11.
36. Freitas AR, Pereira AP, Novais C, Peixe L. Multidrug-resistant high-risk Enterococcus faecium clones: can we really define them? Int J Antimicrob Agents **2021**; 57:106227.
37. Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, et al. Near-ubiquitous presence of a vancomycin-resistant Enterococcus faecium ST117/CT71/vanB –clone in the rhine-main metropolitan area of Germany. Antimicrob Resist Infect Control **2019**; 8:128.
38. Tedim AP, Ruíz-Garbajosa P, Rodríguez MC, et al. Long-term clonal dynamics of Enterococcus faecium strains causing bloodstream infections (1995–2015) in Spain. J Antimicrob Chemother **2017**; 72:48–55.
39. Park S, Ryoo N. Comparative analysis of IR-biotyper, MLST, cgMLST, and WGS for clustering of vancomycin-resistant Enterococcus faecium in a neonatal intensive care unit. Microbiol Spectr **2024**; 12:31–.
40. Lurie-Weinberger MN, Temkin E, Kastel O, et al. Use of a national repository of Fourier-transform infrared spectroscopy spectra enables fast detection of silent outbreaks and prevention of spread of new antibiotic-resistant sequence types. Antimicrob Resist Infect Control **2025**; 14:34.

Downloaded from https://academic.oup.com/ofid/advance-article/doi/10.1093/ofid/ofaf718/8341675 by guest on 09 December 2025

Table S1. Characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates and comparison of clustering methodologies.

ID	Collection date	Isolate source	Epi. outbreak	Hospital location	ST	CT	cgMLST cluster	cgSNP	SKA cluster	FT-IR cluster
1	14/04/2020	RS	No	ICU	80	6492	cgMLST_4	cgSNP_4	SKA_5	FTIR_5
2	15/04/2020	RS	No	ICU	80	6492	cgMLST_4	cgSNP_4	SKA_5	FTIR_5
3	06/11/2020	BC	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
4	08/11/2020	WE	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
5	09/11/2020	WE	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
6	10/11/2020	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
7	11/01/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
8	14/01/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
9	14/01/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_singl_1
10	28/01/2021	RS	OHD	OHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_singl_2
11	28/01/2021	RS	OHD	OHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
12	29/01/2021	U	OHD	OHD	117	6173	cgMLST_singl_1	cgSNP_singl_1	SKA_singl_1	FTIR_3
13	11/02/2021	RS	OHD	OHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
14	11/02/2021	RS	OHD	OHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
15	26/02/2021	U	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
16	08/03/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
17	09/03/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
18	16/03/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_2	FTIR_1
19	06/04/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
20	11/04/2021	RS	NPHD	NPHD	unknown	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
21	22/04/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_6
22	27/04/2021	BC	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_singl_3
23	02/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
24	13/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
25	17/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1

ID	Collection date	Isolate source	Epi. outbreak	Hospital location	ST	CT	cgMLST cluster	cgSNP	SKA cluster	FT-IR cluster
26	17/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_2	FTIR_1
27	17/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
28	17/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
29	25/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
30	25/05/2021	RS	NPHD	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
31	14/07/2021	RS	SD	SD	80	847	cgMLST_singl_2	cgSNP_singl_2	SKA_singl_2	FTIR_4
32	18/07/2021	BC	SD	SD	117	118	cgMLST_2	cgSNP_2	SKA_3	FTIR_3
33	27/07/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
34	03/09/2021	BC	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
35	05/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
36	07/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
37	07/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
38	07/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
39	07/09/2021	RS	SD	SD	117	118	cgMLST_2	cgSNP_2	SKA_3	FTIR_3
40	13/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
41	13/09/2021	RS	SD	SD	117	118	cgMLST_2	cgSNP_2	SKA_3	FTIR_3
42	13/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
43	13/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
44	14/09/2021	RS	SD	SD	117	118	cgMLST_2	cgSNP_2	SKA_3	FTIR_3
45	29/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_2
46	30/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
47	30/09/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_2
48	05/10/2021	EI	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
49	05/10/2021	EI	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
50	05/10/2021	EI	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
51	05/10/2021	EI	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1

ID	Collection date	Isolate source	Epi. outbreak	Hospital location	ST	CT	cgMLST cluster	cgSNP	SKA cluster	FT-IR cluster
52	25/10/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
53	02/11/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
54	08/11/2021	RS	No	ARD	117	2094	cgMLST_3	cgSNP_3	SKA_4	FTIR_2
55	15/11/2021	RS	SD	SD	117	2094	cgMLST_3	cgSNP_3	SKA_4	FTIR_2
56	16/11/2021	RS	No	IDD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
57	22/11/2021	RS	No	OHD	117	2094	cgMLST_3	cgSNP_3	SKA_4	FTIR_2
58	07/12/2021	RS	No	OHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
59	15/12/2021	RS	SD	SD	117	2094	cgMLST_3	cgSNP_3	SKA_4	FTIR_2
60	16/12/2021	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
61	03/02/2022	RS	No	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
62	09/03/2022	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
63	20/04/2022	RS	No	NPHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
64	02/05/2022	RS	SD	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
65	04/05/2022	RS	No	OHD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
66	26/05/2022	RS	No	DCD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_2	FTIR_1
67	27/05/2022	WE	No	DD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
68	13/06/2022	RS	No	OHD	2840	unknown	cgMLST_singl_3	cgSNP_singl_3	SKA_singl_3	FTIR_2
69	20/06/2022	RS	No	ED	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_2
70	01/07/2022	RS	No	IDD	117	unknown	cgMLST_singl_4	cgSNP_singl_4	SKA_singl_4	FTIR_singl_4
71	08/07/2022	RS	No	IDD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_2
72	12/07/2022	RS	No	GMD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
73	23/08/2022	RS	No	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
74	23/08/2022	RS	No	PD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
75	10/10/2022	RS	No	ARD	unknown	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
76	15/11/2022	RS	No	CCU	unknown	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
77	24/11/2022	RS	No	ARD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1

ID	Collection date	Isolate source	Epi. outbreak	Hospital location	ST	CT	cgMLST cluster	cgSNP	SKA cluster	FT-IR cluster
78	03/02/2023	WE	No	SD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
79	21/02/2023	RS	No	ARD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_6
80	20/03/2023	RS	No	UD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_2
81	20/03/2023	RS	No	ED	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_singl_5	FTIR_1
82	23/03/2023	RS	No	ICU	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
83	04/04/2023	RS	No	GMD	80	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
84	12/05/2023	RS	No	ICU	117	unknown	cgMLST_singl_5	cgSNP_singl_5	SKA_singl_6	FTIR_singl_5
85	19/05/2023	RS	No	ARD	unknown	5967	cgMLST_1	cgSNP_1	SKA_1	FTIR_1
86	16/06/2023	RS	No	OHD	761	unknown	cgMLST_singl_6	cgSNP_singl_6	SKA_singl_7	FTIR_4
87	03/10/2023	RS	No	ICU	117	unknown	cgMLST_singl_7	cgSNP_singl_7	SKA_singl_8	FTIR_4

ARD: Anesthesia and reanimation department, BC: Blood culture, CCU: Cardiac care unit, DCD: Domiciliary care department, DD: Digestology department, ED: Emergency department, EI: Environmental isolate, GMD: General medicine department, ICU: Intensive care unit, IDD: Infectious disease department, NPHD: Nephrology department, OHD: Oncohematology department, PD: Pneumology department, RS: Rectal swab, SD: Surgery department, ST: Sequence type, U: Urine, UD: Urology department, WE: Wound exudate.

Table S2. Adjusted Rand and jackknife pseudo-values 95% CI for all clustering methods used. Clustering cut-off are indicated in parenthesis.

	cgMLST cluster (≤11 allelic diff.)	**cgSNP (≤22/9 SNPs)**	**SKA cluster (≤30 SNPs)**	**SKA cluster (≤12 SNPs)**	**SKA cluster (≤10 SNPs)**	**SKA cluster (≤7 SNPs)**
cgSNP (≤22/9 SNPs)*	1.000 (1.000-1.000)					
SKA cluster (≤30 SNPs)	0.850 (0.708-0.998)	0.850 (0.708-0.998)				
SKA cluster (≤12 SNPs)	0.418 (0.260-0.581)	0.418 (0.260-0.581)	0.526 (0.371-0.687)			
SKA cluster (≤10 SNPs)	0.347 (0.202-0.496)	0.347 (0.202-0.496)	0.443 (0.293-0.596)	0.886 (0.783-0.992)		
SKA cluster (≤7 SNPs)	0.244 (0.125-0.365)	0.244 (0.125-0.365)	0.316 (0.185-0.450)	0.689 (0.527-0.856)	0.796 (0.655-0.941)	
FT-IR cluster (0.210–0.227)	0.644 (0.457-0.838)	0.644 (0.457-0.838)	0.543 (0.352-0.745)	0.283 (0.125-0.447)	0.218 (0.074-0.367)	0.180 (0.054-0.309)

* ≤22 SNPs for ST80 and ST80-like isolates, ≤9 SNPs for ST117 isolates

Table S3. Confusion matrix comparing FTIR vs. cgMLST clusters.

	FTIR_1	FTIR_2	FTIR_3	FTIR_4	FTIR_5	FTIR_6	FTIR_singl_1	FTIR_singl_2	FTIR_singl_3	FTIR_singl_4	FTIR_singl_5	Total
cgMLST_1	60	5				2	1	1	1			70
cgMLST_2			4									4
cgMLST_3		4										4
cgMLST_4					2							2
cgMLST_singl_1			1									1
cgMLST_singl_2				1								1
cgMLST_singl_3		1										1
cgMLST_singl_4										1		1
cgMLST_singl_5											1	1
cgMLST_singl_6				1								1
cgMLST_singl_7				1								1
Total	60	10	5	3	2	2	1	1	1	1	1	87

Table S4. Confusion matrix comparing FTIR vs. cgSNP clusters.

	FTIR_1	FTIR_2	FTIR_3	FTIR_4	FTIR_5	FTIR_6	FTIR_singl_1	FTIR_singl_2	FTIR_singl_3	FTIR_singl_4	FTIR_singl_5	Total
cgSNP_1	60	5				2	1	1	1			70
cgSNP_2			4									4
cgSNP_3		4										4
cgSNP_4					2							2
cgSNP_singl_1			1									1
cgSNP_singl_2				1								1
cgSNP_singl_3		1										1
cgSNP_singl_4										1		1
cgSNP_singl_5											1	1
cgSNP_singl_6				1								1
cgSNP_singl_7				1								1
Total	60	10	5	3	2	2	1	1	1	1	1	87

Table S5. Confusion matrix comparing FTIR vs. SKA clusters.

	FTIR_1	FTIR_2	FTIR_3	FTIR_4	FTIR_5	FTIR_6	FTIR_singl_1	FTIR_singl_2	FTIR_singl_3	FTIR_singl_4	FTIR_singl_5	Total
SKA_1	56	5				2	1	1	1			66
SKA_2	3											3
SKA_3			4									4
SKA_4		4										4
SKA_5					2							2
SKA_singl_1			1									1
SKA_singl_2				1								1
SKA_singl_3		1										1
SKA_singl_4										1		1
SKA_singl_5	1											1
SKA_singl_6											1	1
SKA_singl_7				1								1
SKA_singl_8				1								1
Total	60	10	5	3	2	2	1	1	1	1	1	87

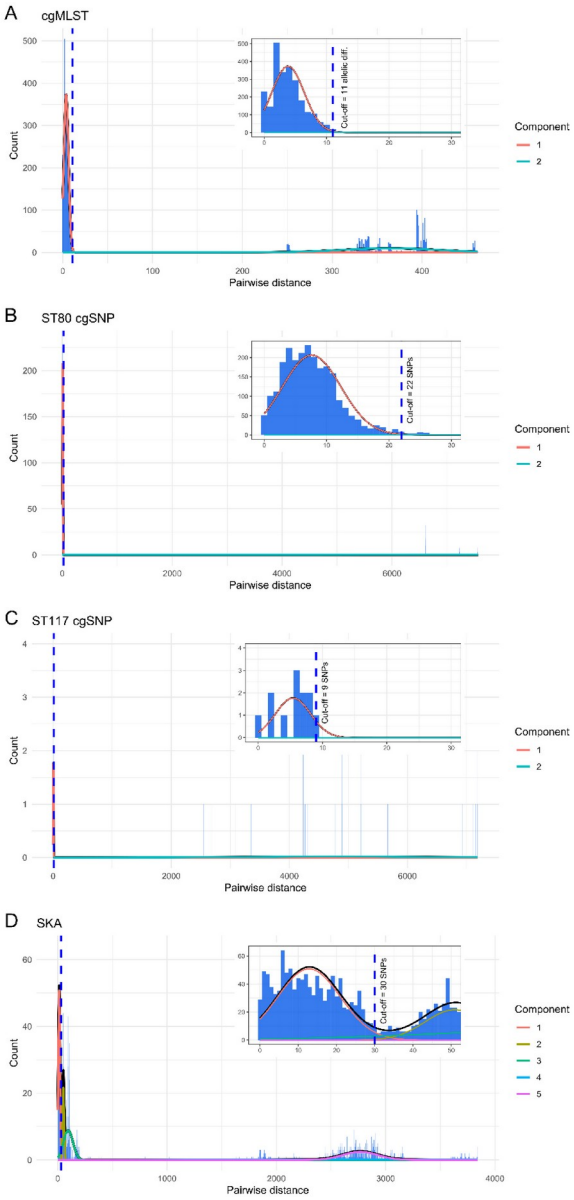


Figure S1. Detail of the global distribution of pairwise distances for each WGS analysis used. Dashed blue lines indicate the thresholds applied, which corresponded to the 99th percentile of the first mode in the distribution.

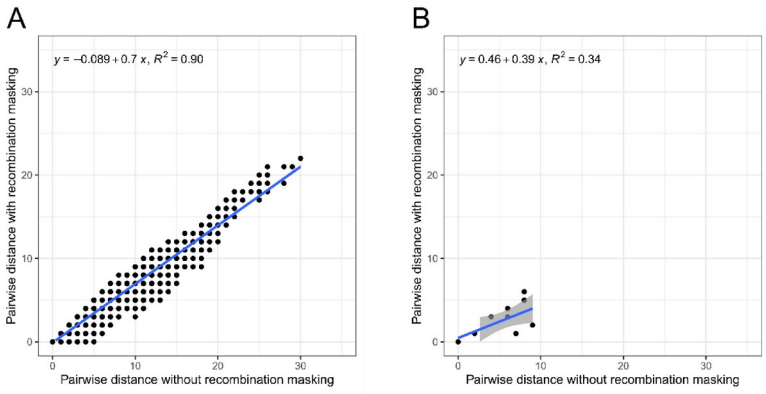


Figure S2. Relationship between pairwise SNP distances before and after masking for recombination. The blue line represents the line of best fit using a linear regression model (y ~ x) with the 95% confidence interval around the smoothing function shown in grey. (A) ST80 isolates, (B) ST117 isolates. In both panels x and y axis limits have been restricted to a maximum pairwise distance of ≤35 SNPs.

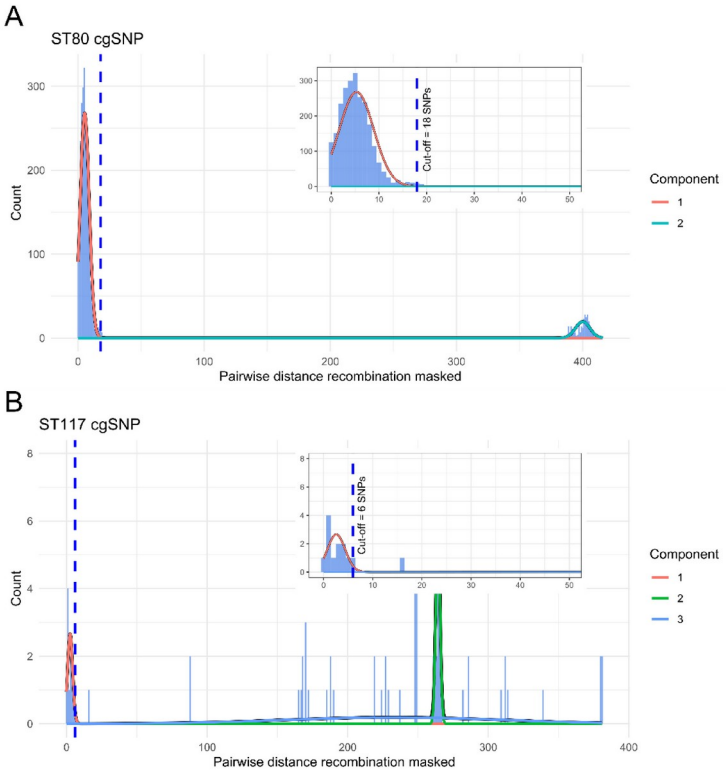


Figure S3. Detail of the global distribution of pairwise distances for cgSNP analysis masking for recombination. Dashed blue lines indicate the thresholds applied, which corresponded to the 99th percentile of the first mode in the distribution.

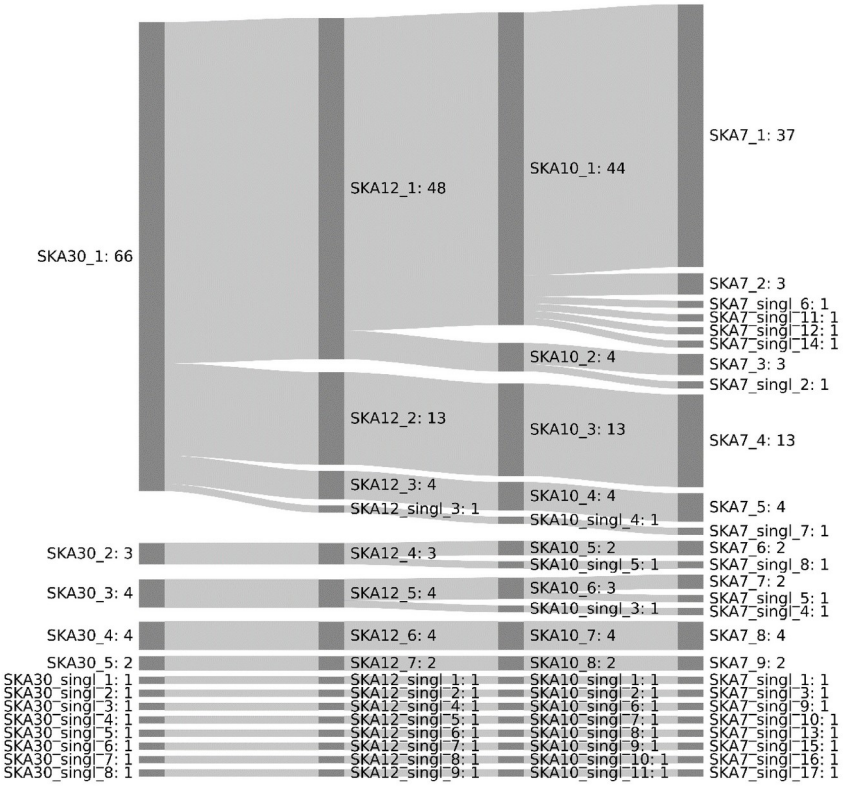


Figure S4. Clustering at different SKA thresholds (30, 12, 10, and 7 SNPs). Clusters and singletons detected by at each threshold are indicated with a correlative number along with the number of cases in partition.

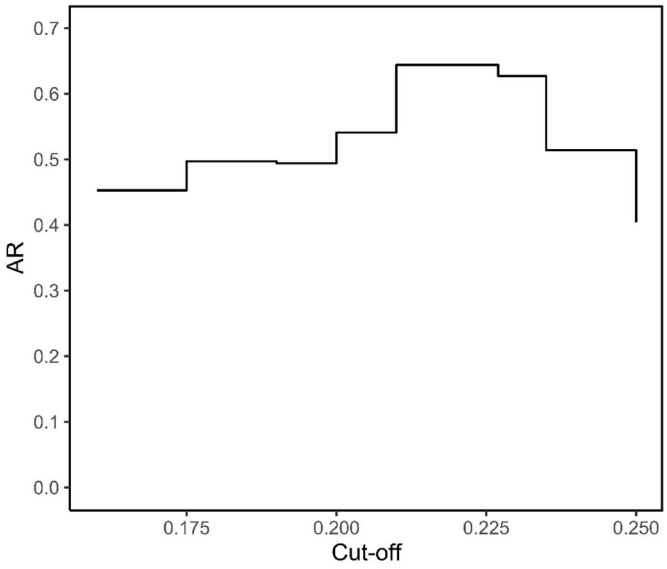


Figure S5. FTIR clustering cut-off value. The 0.210 to 0.227 cut-off range maximized the Adjusted Rand index (AR) for the clustering of the study dataset (N=87) considering cgMLST as the reference method. A slightly extended range (0.15-0.25) of that recommended by the manufacturer (0.15-0.20) was evaluated.

3.3. Artículo III: *Fourier-transform infrared spectroscopy for rapid Streptococcus pneumoniae serotyping in a tertiary care general hospital*

En este tercer trabajo se evaluó la utilidad de la espectroscopia FTIR como herramienta rápida para determinar el serotipo capsular de *Streptococcus pneumoniae* (neumococo), comparando su rendimiento con la reacción de *Quellung* (ver apartado 1.2.2 de la tesis), considerada el método *gold standard*. A diferencia de los artículos anteriores I y II, centrados en el estudio de la clonalidad y la caracterización de brotes nosocomiales, en este trabajo se evaluó la aplicabilidad del FTIR en el ámbito comunitario, orientado más a la identificación rápida de serotipos capsulares y la contribución a la optimización vacunal.

El estudio incluyó un total de 150 aislados de muestras invasivas de *S. pneumoniae*, recogidos entre 2016 y 2023, representando 32 serotipos distintos asociados a la enfermedad neumocócica invasiva (ENI) (**Tabla 1**, **Artículo III**). Aproximadamente un tercio de los aislados (49/150) correspondieron a serotipos incluidos en la vacuna PCV13 (vacuna empleada de 2016 a 2023 en el calendario vacunal de Cataluña), mientras que el resto (101/150) pertenecían a serotipos no vacunales.

Para el análisis mediante FTIR se emplearon cuatro metodologías: 1) análisis jerárquico de conglomerados (HCA), al igual que en los

Artículos I y II; 2) análisis de componentes principales (PCA); 3) análisis discriminante lineal (LDA); y 4) algoritmo de inteligencia artificial *PneumoClassifier*, basado en un modelo supervisado entrenado con cepas previamente caracterizadas por el fabricante para la asignación automática de serotipos. Los resultados obtenidos mediante las cuatro estrategias se compararon con los datos obtenidos por *Quellung*.

El análisis basado en el HCA mostró una capacidad limitada para discriminar los serotipos incluidos en el estudio, obteniéndose valores de concordancia de AR y AW de 0,397 (IC 95%: 0,368-0,566) y 0,378 (IC 95%: 0,217-0,523), respectivamente. Es cierto que, aunque algunos serotipos tendieron a agruparse correctamente (**Figura 2**, **Artículo III**), el rendimiento global (43/150 aislados; 28,7%) resultó insuficiente para considerar el HCA como método para determinar el serotipo de manera rutinaria.

Mediante la aplicación de la técnica de reducción de dimensionalidad PCA, se obtuvieron valores de concordancia de AR y AW de 0,469 (IC 95%: 0,368-0,566) y 0,347 (IC 95%: 0,297-0,398), respectivamente, sin demostrar superioridad significativa respecto al HCA (p=0,202). Por otro lado, la reducción de dimensionalidad LDA sí permitió mejorar de forma sustancial la concordancia, alcanzando un valor de AR de 0,950 (IC 95%: 0,908-0,994) y de AW de 0,905 (IC 95%: 0,877-0,933). Sin embargo, a pesar de esta elevada concordancia, el enfoque basado en LDA presenta limitaciones para su aplicación prospectiva en la rutina asistencial para identificar serotipos de *S. pneumoniae,* ya que

se trata de una técnica supervisada que requiere la actualización continua del modelo mediante la incorporación del serotipo (determinado por la técnica de referencia) de forma retrospectiva de los aislados analizados (limitación inherente a los métodos supervisados). Además, el LDA requiere incluir un número suficiente de cepas representativas que abarquen la totalidad de los serotipos circulantes. Por estos motivos, el uso del LDA no puede reemplazar la metodología de *Quellung* para su aplicación como técnica rutinaria prospectiva sino como una herramienta complementaria con utilidad retrospectiva.

En contraste, el enfoque basado en el *PneumoClassifier* mostró un rendimiento superior; mediante este algoritmo, el FTIR asignó correctamente el serotipo en 122/150 aislados (81,3%) (**Figura 3**, **Artículo III**), alcanzando una concordancia mayor con la reacción de *Quellung* que la obtenida mediante los métodos HCA y PCA (AR de 0,717 [IC 95%: 0,580-0,855] y AW de 0,636 [IC 95%: 0,464-0,803]). Además, el *PneumoClassifier* identificó correctamente la totalidad de los serotipos incluidos en la vacuna PCV13 (49/49), así como varios serotipos asociados a mayor virulencia (como el 3, 4, 9N, 11A, 15A, 19A-F, 22F y 23ABF) y a resistencia antibiótica (como el 9V y el 11A), lo que refuerza su potencial utilidad clínica y epidemiológica. Con los resultados obtenidos en nuestro trabajo, el enfoque basado en el algoritmo inteligente mostró un mejor rendimiento frente al resto de

las metodologías para determinar el serotipo del neumococo a tiempo real en la rutina asistencial.

En comparación con otros estudios previamente publicados (341,372), en los que se analizaron cepas de referencia y se realizaron en condiciones de investigación, el presente trabajo se realizó utilizando aislados clínicos invasivos, lo que refuerza la aplicabilidad del FTIR en un entorno asistencial real. Asimismo, este es el primer estudio realizado en nuestro país en un contexto clínico asistencial. El único trabajo similar publicado analizó los serotipos circulantes en Brasil y contó con un menor número de muestras (76 *vs*. 150) y menor diversidad de serotipos (18 *vs*. 32) (354).

Respecto a los resultados discordantes, se observaron 28 discrepancias relevantes en determinados serotipos no vacunales, algunos de los cuales fueron sistemáticamente mal clasificados. En concreto, quince aislados presentaron discordancias, de los cuales nueve fueron erróneamente asignados al serotipo 14. Aunque el motivo de este error por parte del algoritmo no se conoce con exactitud, algunos estudios lo atribuyen a las diferencias inherentes que existen entre la reacción de *Quellung* (interacción inmunológica) y la espectroscopia de infrarrojo (vibraciones moleculares en el espectro infrarrojo) (341,372). Por otra parte, las trece discrepancias restantes se debieron a que los serotipos 7BC y 38 no se encuentran incluidos en el conjunto de serotipos reconocidos por el algoritmo PneumoClassifier a fecha de redacción de esta tesis. De hecho, al

excluir los aislados pertenecientes a estos serotipos del estudio, los índices de concordancia aumentan ligeramente (AR de 0,806 y de AW de 0,770).

Desde una perspectiva asistencial, la implementación de la espectroscopia FTIR para la determinación del serotipo de *S. pneumoniae* aporta una clara ventaja frente al método de referencia: permitir la realización de la técnica en el propio laboratorio de microbiología clínica. La reacción de *Quellung* presenta como principal limitación su restricción a determinados laboratorios de referencia, lo que obliga a la externalización de la prueba y dificulta la obtención de resultados en tiempo real. En este contexto, el uso del FTIR en este trabajo permitió obtener resultados en horas, facilitando una respuesta más ágil y abriendo la posibilidad de contribuir a la optimización de las estrategias de vigilancia epidemiológica.

En la actualidad, en nuestro laboratorio de microbiología clínica, la metodología FTIR se ha implementado de forma satisfactoria para la determinación del serotipo de *S. pneumoniae* en casos de enfermedad neumocócica invasiva en población pediátrica.

Como limitaciones de este estudio, cabe destacar que se trata de un estudio realizado con cepas de un solo centro y con una representación desigual de determinados serotipos, lo que podría limitar la extrapolación de los resultados obtenidos a otros contextos geográficos con estrategias vacunales diferentes ya que, en

consecuencia, pueden existir distintos serotipos de neumococo circulantes. Asimismo, la dependencia del *PneumoClassifier* de un conjunto de entrenamiento predefinido manifiesta la necesidad de realizar una validación previa con los serotipos de cada región.

En conjunto, este tercer trabajo demuestra que la espectroscopia FTIR combinada con algoritmos de aprendizaje automático constituye una herramienta rápida, coste-efectiva e integrable en la rutina del laboratorio de microbiología clínica para determinar el serotipo de *S. pneumoniae*. Su uso como herramienta diagnóstica aporta un valor añadido al laboratorio de microbiología al contribuir de forma ágil a la vigilancia epidemiológica de la enfermedad neumocócica invasiva y, potencialmente, a optimizar estrategias de salud pública. Como perspectiva de futuro, una posibilidad podría ser desarrollar modelos más adaptados a los serotipos circulantes de cada región para mejorar la precisión diagnóstica.

Artículo III

Fourier-transform infrared spectroscopy for rapid *Streptococcus pneumoniae* serotyping in a tertiary care general hospital

Miriam Campos-Ruiz†, **Jun Hao Wang-Wang†**, Antoni E. Bordoy, Beatriz Rodríguez-Ponga, Natalia Pagan, Jessica Hidalgo, María Dolores Quesada, Montserrat Giménez y Pere-Joan Cardona

Frontiers in microbiology, 2025 Apr 23;16:1565888

frontiers | Frontiers in Microbiology

TYPE Original Research
PUBLISHED 23 April 2025
DOI 10.3389/fmicb.2025.1565888

Check for updates

OPEN ACCESS

EDITED BY
Leonard Peruski,
Wadsworth Center, United States

REVIEWED BY
Francis Muchaamba,
University of Zurich, Switzerland
Luiza Souza Rodrigues,
Pelé Pequeno Príncipe Research Institute, Brazil

*CORRESPONDENCE
Miriam Campos-Ruiz
mmiriam1997@gmail.com

†These authors share first authorship

RECEIVED 23 January 2025
ACCEPTED 31 March 2025
PUBLISHED 23 April 2025

CITATION
Campos-Ruiz M, Wang-Wang JH, Bordoy AE, Rodríguez-Ponga B, Pagan N, Hidalgo J, Quesada MD, Giménez M and Cardona P-J (2025) Fourier-transform infrared spectroscopy for rapid *Streptococcus pneumoniae* serotyping in a tertiary care general hospital.
Front. Microbiol. 16:1565888.
doi: 10.3389/fmicb.2025.1565888

COPYRIGHT
© 2025 Campos-Ruiz, Wang-Wang, Bordoy, Rodríguez-Ponga, Pagan, Hidalgo, Quesada, Giménez and Cardona. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Fourier-transform infrared spectroscopy for rapid *Streptococcus pneumoniae* serotyping in a tertiary care general hospital

Miriam Campos-Ruiz[1,2*†], Jun Hao Wang-Wang[1,2†], Antoni E. Bordoy[1,3], Beatriz Rodríguez-Ponga[1,2], Natalia Pagan[1], Jessica Hidalgo[1], María Dolores Quesada[1,2,4], Montserrat Giménez[1,5] and Pere-Joan Cardona[1,2,3,5]

[1]Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain, [2]Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain, [3]Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Spain, [4]Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, [5]Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Streptococcus pneumoniae is the leading cause of community-acquired pneumonia and remains a significant contributor to bacteremia and meningitis, collectively known as invasive pneumococcal disease (IPD). Certain serotypes are more strongly associated with severe illness and antimicrobial resistance. Accurate serotyping is essential for effective IPD surveillance and vaccine development. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy has emerged as a valuable tool for differentiating among serotypes across various isolates. We analyzed 150 pneumococcal strains isolated from a tertiary hospital in Barcelona, Catalonia, Spain, between 2016 and 2023, representing 32 serotypes associated with IPD. Forty-nine samples (33%) exhibited serotypes included in PCV13 vaccine. Each strain was classified using (A) FTIR-based clustering and (B) FTIR machine-learning-based PneumoClassifier algorithm. The results were compared to the Quellung reaction, the gold standard methodology. Clustering method grouped correctly PCV13-serotypes 1, 3, and 19F and non-PCV13 serotypes 6C, 7BC, 17F, 24F, 31, and 35B (48/150). PneumoClasifier algorithm successfully grouped all PCV13-serotypes (49/49) including some of the most virulent described serotypes, such as 1, 6B, 7F, and 14. Among non-PCV13 serotypes, it correctly classified 73 out of 101 isolates (72.3%). However, 12F, 15AB, 16F, 17F, 23A, and 24F were misclassified. Overall, PneumoClassifier achieved an accuracy of 122/150 (79.80%) in serotyping pneumococcal strains, demonstrating higher concordance with Quellung (adjusted Rand index: 0.717, adjusted Wallace coefficient: 0.636) compared to the clustering approach (0.397 and 0.378, respectively) ($p < 0.001$). FTIR has proven to be a rapid, user-friendly, cost-effective, and practical technique, making it a promising first-line tool for *S. pneumoniae* serotyping.

KEYWORDS

Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR, *Streptococcus pneumoniae*, Quellung, artificial intelligence, serotyping

1 Introduction

Streptococcus pneumoniae is an opportunistic pathogen responsible for at least half of all community-acquired pneumonia and otitis media and remains a significant cause of invasive pneumococcal disease (IPD) resulting in around one million deaths annually that affect mainly children and older people (Janoff and Musher, 2015; Liu et al., 2016; Weiser et al., 2018).

The capsule of *S. pneumoniae* is composed of high-molecular-weight polysaccharide polymers that are unique and distinctly antigenic for each of more than 100 serotypes of *S. pneumoniae* strains (Geno et al., 2020). Nevertheless, only a limited number of pneumococcal serotypes cause the majority of IPD around the world. In Europe, the 10 most common serotypes involved in IPD were 3, 6C, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 15A, 19A, 22F, and 23B, accounting for 70% of all cases of IPD with a known serotype in 2018 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2020). Furthermore, some studies have shown that specific serotypes, such as 1, 6B, 7F, 14, and 19 are more virulent and more strongly associated with invasiveness and complications such as meningitis (Brueggemann et al., 2003; Pérez et al., 2004; Sandgren et al., 2004). Some circulating pneumococcal serotypes are also more related to resistance to antibiotics (Yahiaoui et al., 2018).

Knowing the circulating serotypes is important for understanding the local epidemiology and developing vaccines that target dominant *S. pneumoniae* strains in IPD. In Catalonia since 1999 the PSV23 vaccine has been recommended for people at risk of acquiring IPD and people above the age of 65. The PCV13 vaccine was incorporated into the Catalan systematic vaccination program in 2016 for children under 2 years old, leading to a vaccination coverage of 81.8% in 2017 and 91% in 2020 (Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, 2022). Interestingly, serotype 3, which is included in PCV13 and isolated from IPD cases in both adults and children, remained stable in Catalonia for over three decades despite the introduction of PCV13 in the pediatric population (Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, 2022; Calvo-Silveria et al., 2024). Since 2023, PCV15 has replaced PCV13 in the vaccination program for the pediatric population, while PCV20 has been approved for individuals over 65 years old and those with risk factors for IPD.

The gold standard method for *S. pneumoniae* serotyping is the Quellung reaction (SS Diagnostica, Denmark) (Habib et al., 2014). This phenotypic technique involves the use of polyclonal antisera and the visualization of the reaction using light microscopy to classify the pneumococcal strains into specific serotypes. This method is expensive, requires well-trained technicians, labor intensive and they can involve subjective interpretation. That's why it is unsuitable for high throughput serotyping and their use is restricted to reference centers. To solve all these inconveniences, new techniques based on molecular biology have been developed.

Capsulation locus (cps) determines the serotypes of *S. pneumoniae* by amplifying and sequencing specific regions of the bacterial DNA, followed by comparing these sequences with a reference database to assign a serotype. Serotype assignment accuracy relies on a precise reference database and can be challenging for serotypes with highly conserved *cpsB* regions, potentially reducing resolution in some cases (Leung et al., 2012). Multiplex real-time PCR are more sensitive than *cpsB* typing being able to identify up to 34 serotypes (Velusamy et al., 2020). Finally, whole-genome sequencing achieves a sensitivity of 86–100% but is an expensive and it can have long turnaround times in the daily routine of a clinical microbiology laboratory (Knight et al., 2021).

Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy has been used to distinguish encapsulated from unencapsulated strains of *S. pneumoniae* (Sahu et al., 2006) and recently some efforts have been done to evaluate *S. pneumoniae* serotyping (Vaz et al., 2013; Burckhardt et al., 2019; Vasconcelos et al., 2024). FTIR spectroscopy is a phenotypic technique that uses infrared light to target the sample and generate an infrared spectrum based on the absorption of infrared light. Each spectrum acts as a bacterial fingerprint and varies depending on the composition of the functional groups in the sample, such as carbohydrates, lipids, and proteins (Naumann et al., 1991; Griffiths and de Haseth, 2006). The region between wave numbers 800 and 1,300 cm^{-1}, where the carbohydrates of the whole cell predominantly absorb, enables capsular typing (Burckhardt et al., 2019; Passaris et al., 2022). FTIR spectroscopy is used by the IR Biotyper system (Bruker GmbH, Leipzig, Germany), which offers a rapid and low-cost typing technique (both sample processing and number of reagents are minimal) with a short turn-around time (3–4 h).

The aim of the present study was to evaluate the performance of the IR Biotyper as a rapid serotyping tool compared with the Quellung technique as the gold standard method.

2 Materials and methods

2.1 Study design

A retrospective study was performed in a tertiary care hospital. This center is the reference hospital for 1,200,000 inhabitants of the Northern Metropolitan Area of Barcelona (Catalonia, Spain).

A representative sample of 150 pneumococcal strains covering 32 serotypes were included in the present study. A minimum of three isolates for each serotype, or if not possible, at least three isolates per serogroup were included in the study set (Table 1). All *S. pneumoniae* strains were obtained from invasive samples (blood culture, cerebrospinal fluid and pleural liquid) of patients with IPD admitted to the hospital from 2016 to 2023.

During the study period (2016–2023) 389 *S. pneumoniae* strains were isolated from IPD, mainly with a respiratory focus. The total number of cases of IPD at our hospital increased from 2016 to 2017, reaching the highest IPD case number during the entire study period. Subsequently, the number of cases decreased, with a slight uptick observed in 2022 and 2023 (Figure 1). During the study period the pneumococcal serotypes included in the PCV13 vaccine were less frequently isolated in IPD than those not included in this vaccine (Figure 1). The most frequently isolated serotypes were the 8 (14.91%), which is not included in PCV13, and the 3 (11.57%), which is included.

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the University Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona, Spain (PI-24-287).

In the present study, informed consent was waived since no additional samples were required for the evaluation, no clinical report was modified, and no patient data was used.

TABLE 1 Serotypes represented in the tested cohort and the respective numbers of strains used.

Serotype (*N* = 150)	No. of strains in evaluated set
1	4
3	17
4	3
6A	1
6B	2
6C	3
7B	4
7C	2
7F	3
8	18
9N	5
9V	2
10A	4
11A	5
12F	3
14	4
15A	4
15B	3
16F	5
17F	3
19A	5
19F	5
22F	8
23A	5
23B	4
23F	3
24F	3
31	5
33F	5
35B	2
35F	3
38	7

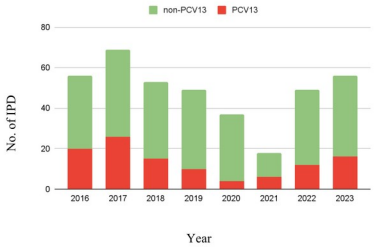


FIGURE 1
Isolated serotypes in IPD during the study period (2016–2023). The height of each column represents the total number of IPD isolates for the corresponding year. Non-PCV13 serotypes are shown in green, while PCV13-included serotypes are shown in red.

2.2 Routine microbiological diagnostic

All isolates were initially identified at the species level by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany). Identification of *S. pneumoniae* was confirmed in parallel using the Optochin Susceptibility Test (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, United States).

All *S. pneumoniae* strains are routinely sent to the National Centre of Microbiology (CNM) [Institute of Health Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain] for the Quellung reaction (gold standard method).

All *S. pneumoniae* strains are routinely preserved in a homemade storage media based on commercial milk at −80°C until further analysis. The homemade medium is prepared using commercial Infasource® milk (Ref. 505023; Nestlé S.A., Vevey, Switzerland). Specifically, 1 mL of milk is distributed into autoclavable glass tubes and sterilized in an autoclave at 121°C for 20 min. Subsequently, the tubes are stored in a refrigerator at 6°C ± 2°C.

2.3 Sample preparation for FTIR analysis

All *S. pneumoniae* isolates were defrosted and cultured in Columbia CNA agar medium (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) for 24 h at 37°C in 5% CO_2. The next day, isolates were subcultured on fresh sheep blood agar culture (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) in the same conditions.

Pneumococcal strains were prepared for FTIR spectroscopy using the direct smear technique according to Passaris et al. (2022) methodology. Briefly, 1-µL plastic loop was used to carefully remove the biomass from the plate and apply it to in triplicate on a 96-spot silicon plate (BrukerDaltonics GmbH, Bremen, Germany). As quality control, 12 µL of two *Escherichia coli* strains (IRTS1 and IRTS2; IR Biotyper® kit, Bruker) were placed in duplicate on the same silicon plate to validate the run. The plate was dried for 15 min at 37°C and placed under a UV lamp for 10 min to inactivate the bacterial cells. Finally, the plate was inserted into the IR Biotyper (Bruker, Germany).

2.4 Spectrum analysis of FTIR data

All samples were tested in triplicate using the default analysis setting. Spectra were acquired in transmission mode (wavelength region 500–4.000 cm^{-1}) using OPUS 8.2.28 software (Bruker GmbH, Leipzig, Germany). For spectra analysis, the default splicing method using the polysaccharide region (wavelength region 1,300–1,800 cm^{-1}) was applied.

The spectrum analysis was performed following two different approaches:

I) FTIR clustering method: Firstly, the average of all spectra of each individual strain was performed using the OPUS software. The mean spectra were used to create a dendrogram based on

hierarchical cluster analysis using the Euclidean distance metric and the average linkage method (UPGMA) without dimensionality reduction techniques. For *S. pneumoniae*, the manufacturer suggests a cut-off value ranging from 0.20 to 0.25 for clustering. A validation to determine the best cut-off was performed using Quellung technique. A subset of the first isolates analyzed by the FTIR ($n = 65$) was used to determine the best cut-off value that maximized the overall congruence between FTIR and Quellung results. To calculate the best cut-off that grouped strains with the same serotype and separated those with different serotypes, the adjusted Rand index (AR) was calculated for the comparison between the Quellung technique and the clustering system for each selected cut-off between 0.15 and 0.225 (Supplementary Figure 1). When two or more isolates had a FTIR spectrum distance less or equal to the designated cut-off value, they were considered to belong to the same FTIR cluster. Conversely, they were designated FTIR singletons.

Subsequently, the analysis was performed using dimensionality reduction methods. Specifically, the following analyses were conducted: (A) principal component analysis (PCA) with 40 components explaining 99% of the variability. (B) Linear discriminant analysis (LDA) with 40 components explaining 99% of the variability. Each isolate was assigned its serotype result obtained through the Quellung reaction as a class label. For each type of analysis, an optimal cut-off study was performed in the same manner as previously explained (Supplementary Figures 2, 3). A dendrogram was then constructed based on hierarchical cluster analysis using the Euclidean distance metric and the average linkage method (UPGMA), incorporating the corresponding dimensionality reduction technique.

II) Artificial intelligence model (PneumoClassifier, version 4.0): The FTIR offers the machine-learning based algorithms to classify the spectra of each isolate in the different serotypes. Furthermore, the algorithm generates a score (ranging from 0 to 100) that assesses the reliability of the serotype being displayed. The version used was trained with 95 strains from 34 different serotypes: 1, 3, 4, 5, 6ABCD, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15ABC, 16F, 17F, 19AF, 20, 22F, 23ABF, 24F, 31, 33F, and 35BF. The PneumoClassifier incorporates an additional AI algorithm for subtyping the serotypes within serogroup 6 into 6A, 6B, and 6CD. However, it cannot subtype serotypes within serogroups 15, 19, 23, and 35.

The pneumococcal strains were considered correctly classified if the AI algorithm identified them with the same serogroup and/or serotype as determined by the Quellung reaction.

2.5 Concordance between FTIR and gold standard results

To assess the concordance of the clustering and PneumoClassifier results obtained with FTIR and the Quellung serotyping, the adjusted Rand index (AR) and the adjusted Wallace coefficients (AW) were calculated with 95% CI using an online tool (Comparing Partitions, 2009; available at: http://www.comparingpartitions.info/?link=Tool). AR compares the overall congruence between two compared methods (Santos and Embrechts, 2009), while AW compares the agreement of the two approaches considering one of them as the reference method (Severiano et al., 2011). AR and AW values may range from 0 to 1, where 0 means agreement expected by chance and 1 means perfect correlation between both methods (Severiano et al., 2011). Additionally, *p*-values comparing the AW and AR values for (I) FTIR clustering approach vs. Quellung and (II) PneumoClassifier vs. Quellung were obtained according to the jack-knife pseudo-values resampling method (Comparing Partitions, 2009).

3 Results

3.1 Spectrum analysis using FTIR clustering method

For FTIR clustering, an optimal cut-off of 0.201 was obtained after an initial validation ($n = 65$) (Supplementary Figure 1). The 150 pneumococcal strains were classified in 23 clusters and 5 singletons (Figure 2). Three of the largest cluster were cluster 5 ($n = 22$), 8 ($n = 17$), and 10 ($n = 11$); each of them include pneumococcal strains with serotypes 4, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15 (A, B), 16F, 17F, 19A, 22F 23 (A, F), 35F, and 38, suggesting low discrimination between these pneumococcal serotypes. Conversely, cluster 3 included 12 out of 17 pneumococcal strains with PCV13-serotype 3 and were closely related with cluster 4 which included 5 out of 17 strains of serotype 3 (Figure 2). Other serotypes grouped properly were the PCV13-included serotype 1 (cluster 19) and non-PCV13 serotypes 6C (cluster 18), 7BC (cluster 6), 17F (cluster 7), 24F (cluster 12), 31 (cluster 13) and 35B (cluster 15) (Figure 2). All of this translates to 43 out of 150 pneumococcal strains being correctly classified, with AR and AW values of 0.397 (95% CI, 0.280–0.511) and 0.378 (95% CI, 0.217–0.523), respectively.

When dimensionality reduction techniques were applied, the following results were obtained: (A) For PCA, AR and AW values of 0.469 (95% CI, 0.368–0.566) and 0.347 (95% CI, 0.297–0.398), respectively, were obtained, without achieving statistical significance compared to clustering performed without dimensionality reduction techniques ($p = 0.202$) (Supplementary Figure 4). (B) For LDA, AR, and AW values of 0.950 (95% CI, 0.908–0.994) and 0.905 (95% CI, 0.877–0.933), respectively, were obtained, significantly improving clustering performance ($p < 0.001$) (Supplementary Figure 5).

3.2 Pneumococcal serotyping using PneumoClassifier approach

For the FTIR PneumoClasifier, it correctly predicted the serotype of 122 out of 150 (79.80%) pneumococcal strains. All isolates belonging to serotypes 1, 3, 4, 6ABC, 7F, 9V, 11A, 14, 19AF, 23BF, 31, and 35BF were correctly classified (Figure 3). Our study set includes six strains belonging to serogroup 6: 6A ($n = 1$), 6B ($n = 2$), and 6C ($n = 3$). The additional PneumoClassifier algorithm successfully subtyped 5 out of 6 strains, with one 6B strain remaining misclassified. However, this strain was correctly classified within the 6AD group.

Serotypes 8 and 22F were correctly classified in 94.44 and 87.50% of cases, respectively, and only one pneumococcal strain of each

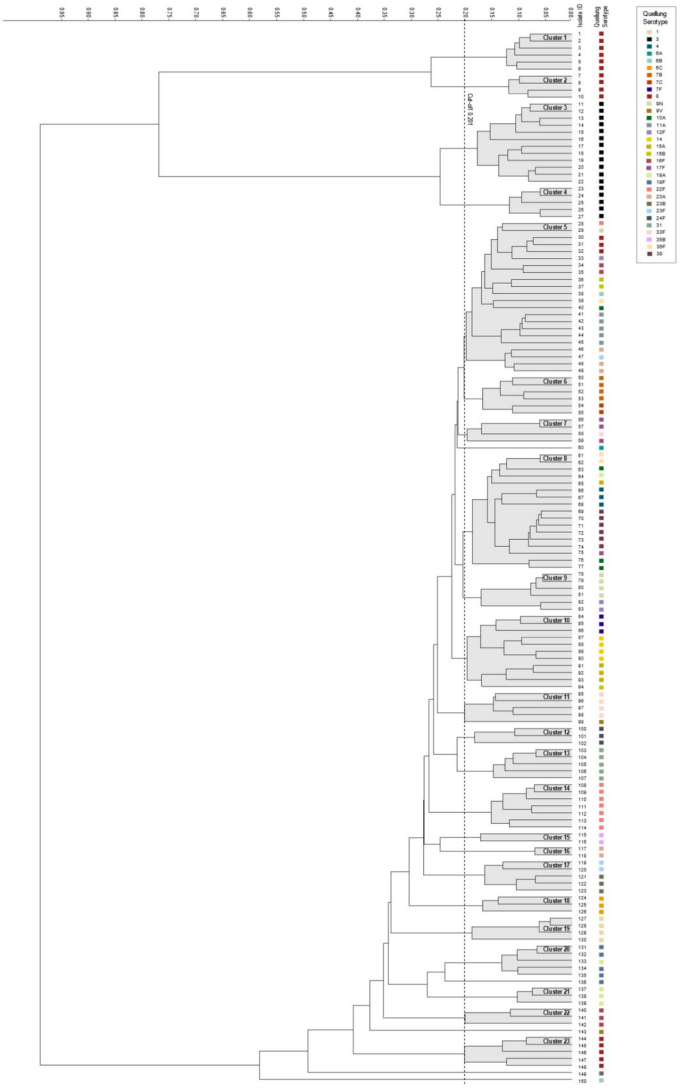
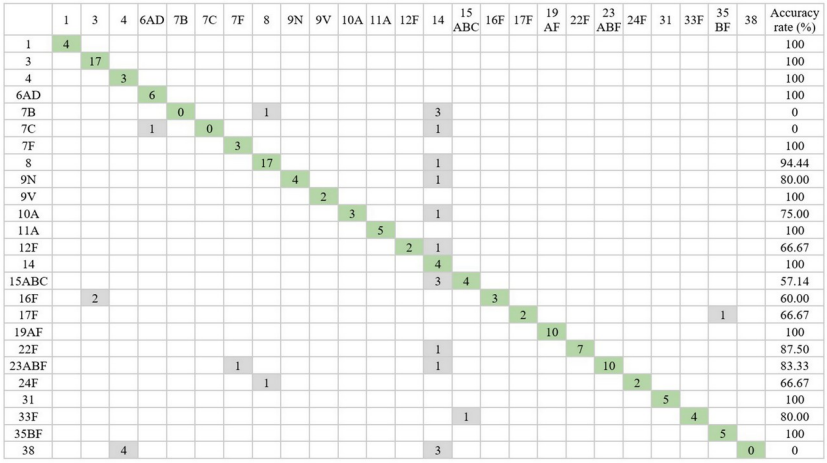


FIGURE 2
Dendrogram visualizing the 150 pneumococcal tested strains representing 32 serotypes. The vertical dashed line depicts the cutoff value (0.201). The linkage type used for the dendrogram was Euclidean distance. Resulting FTIR clusters (1–23) are shadowed in gray. Corresponding serotype are indicated in each isolate.



	1	3	4	6AD	7B	7C	7F	8	9N	9V	10A	11A	12F	14	15 ABC	16F	17F	19 AF	22F	23 ABF	24F	31	33F	35 BF	38	Accuracy rate (%)
1	4																									100
3		17																								100
4			3																							100
6AD				6																						100
7B					0			1						3												0
7C				1		0								1												0
7F							3																			100
8								17						1												94.44
9N									4					1												80.00
9V										2																100
10A											3			1												75.00
11A												5														100
12F													2	1												66.67
14														4												100
15ABC														3	4											57.14
16F		2														3										60.00
17F																	2							1		66.67
19AF																		10								100
22F														1					7							87.50
23ABF							1							1						10						83.33
24F								1													2					66.67
31																						5				100
33F															1								4			80.00
35BF																								5		100
38			4											3											0	0

FIGURE 3
Confusion matrix with the serotyping results obtained from PneumoClassifier version 4.0 compared with those obtained with Quellung reaction. The cells highlighted in green represent the strains correctly identified by the PneumoClassifier. The isolates incorrectly typed are shown in gray.

TABLE 2 Summary of the 15 *S. pneumoniae* isolates that were mistyped by the PneumoClassifier.

Serotype from Quellung reaction	No. of strains	No. of mistyped strains (n = 15)	Serotype from FTIR (No. of strains)
8	18	1	14 (1)
9N	5	1	14 (1)
10A	4	1	14 (1)
12F	3	1	14 (1)
15A	4	2	14 (2)
15B	3	1	14 (1)
16F	5	2	3 (2)
17F	3	1	35BF (1)
22F	8	1	14 (1)
23A	5	2	14 (1), 7F (1)
24F	3	1	8 (1)
33F	5	1	15 ABC (1)

serotype was classified as serotype 14 (Figure 3 and Table 2). Serotypes 9N, 10A, 12F, 15AB, 16F, 17F, 23A, 24F, and 33F were correctly classified in 50–80% of the cases (Figure 3).

Regarding the 28 discordant results, 13 samples belonged to serotype 7 (B, C) and 38 could not be classified by the AI system because these serotypes had not been included in the PneumoClasifier training set (Figure 3). Conversely, the 15 remaining discordant results belonged to serotypes that are included in the PneumoClassifier training set. Among them, they were frequently mistyped as serotype 14 (9/15). The other confounded serotypes were serotype 3 (2/15), 7F (1/15), 8 (1/15), 15 (1/15) and 35 (1/15). The detailed information of each mistyped sample is listed in Table 2.

Overall, the PneumoClassifier accurately classified all pneumococcal strains with serotypes included in the PCV13 (49/49; 100%) and 73 out of 101 strains (72.3%) with serotypes not included in the PCV13 vaccine.

The AR and AW values comparing the PneumoClassifier results with the Quellung technique were 0.717 (95% CI, 0.580–0.855) and 0.636 (95% CI, 0.464–0.803), respectively. When strains with serotype 7BC and 38 were excluded from the analysis, these values slightly increased to 0.806 (95% CI, 0.693–0.923) for AR and 0.770 (95% CI, 0.624–0.915) for AW. Overall, the PneumoClassifier demonstrated significantly greater concordance with the Quellung technique compared to the clustering system ($p < 0.001$), whether or not the 7BC and 38 serotypes were excluded.

4 Discussion

This study demonstrates the potential of FTIR spectroscopy as a tool for serotyping *S. pneumoniae*, particularly while awaiting results from the Quellung reaction. Among the 150 pneumococcal strains analysed, the PneumoClassifier correctly identified 122 strains to the serotype level, achieving and accuracy of 79.80%, consistent with previous studies (Burckhardt et al., 2019; Passaris et al., 2022; Vasconcelos et al., 2024). When comparing the performance of FTIR in our study with previous studies, we obtained a similar level of concordance to Burckhardt et al. (2019) study (79.80% vs. 77.40–89.20%) and slightly lower concordance compared to Passaris et al.

(2022) and Vasconcelos et al. (2024) studies (79.80% vs. 71.20–98.00%). In these studies, the authors trained their own AI model using a dedicated dataset. It is likely that the variability between the strains used for training and validation was lower in their studies than in ours, as we used the default AI model provided by Bruker. We believe that this model may include strains that differ from those circulating in our healthcare setting, which could explain some of the observed discrepancies and a slightly lower concordance in our study compared with previous studies.

FTIR has been employed to discriminate between various bacterial serotypes or serogroups including *S. pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* and three *Legionella pneumophila* serogroups (Quintelas et al., 2018). In this study, substantial agreement between the PneumoClassifier and the Quellung method was obtained with an AR of 0.806 and an AW of 0.770 (excluding serotypes 7BC and 38). These results align with prior research on gram-positive bacteria, particularly with *E. faecium* (Teng et al., 2022; Scheier et al., 2023; Park and Ryoo, 2024) where AR values exceeded 0.54 and AW values approximated 0.95 when comparing FTIR to standard methods. Teng et al. (2022) recommend an AR of at least 0.7 for FTIR assay reproducibility. Studies on gram-negative bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae*, have reported AR values ranging from 0.743 to 1.0 and AW values from 0.708 to 1.0 (Dinkelacker et al., 2018; Martak et al., 2019; Rakovitsky et al., 2020; Hu et al., 2021).

Collectively, these findings suggest that the PneumoClassifier demonstrates substantial agreement with the reference method and could serve as a reliable serotyping tool. However, the FTIR clustering system displayed poor agreement with Quellung-derived results, indicating a weaker performance compared to the PneumoClassifier for discriminating against pneumococcal strains. Clustering is more exploratory, detecting underlying patterns without considering labels, and it can identify subtle phenotypic variations within a specific serotype, potentially dividing it into multiple subgroups based on spectral similarity. In contrast, the AI model focuses on supervised classifications based on the data provided during training. Consequently, adding more strains from less frequently isolated serotypes could potentially improve the performance of the clustering method and enhance the discrimination between different clusters. Another way to improve the performance of the clustering system could be by applying dimensionality reduction techniques such as principal component analysis (PCA) and linear discriminant analysis (LDA). When applying PCA to our cohort, we observed no statistically significant improvement compared to HCA without dimensionality reduction techniques ($p = 0.202$). In contrast, applying LDA significantly improved the AR and AW values ($p < 0.001$). However, it is inherent to a supervised technique like LDA to increase concordance values since LDA maximizes class separation with the help of class labels (Quellung results). This clustering system using LDA can be useful when there is a large number of strains with known serotypes, allowing an unknown serotype strain to be grouped with high probability alongside other strains of the same serotype, potentially even better than HCA in our cohort. However, for real prospective use, an LDA model must first be trained using a gold-standard technique such as Quellung to retrospectively assign class labels and build a robust model with the most comprehensive representation of pneumococcal serotypes. Additionally, as with any clustering system, whether or not dimensionality reduction techniques are applied, strains with previously unanalyzed serotypes will remain unclustered (singletons) since they do not group with any other strain. In such cases, PneumoClassifier would be the only system capable of providing a result. It is important to consider that pneumococcal serotypes vary each year, as they depend on vaccine coverage. As a result, new serotypes may emerge annually that the clustering system has not yet identified.

Some discrepancies between FTIR results and the Quellung method have been previously documented by Passaris et al. (2022). Both techniques assess the capsule structure, but their underlying mechanisms differ significantly. The Quellung reaction relies on the 3-D specificity of polyclonal antibodies binding to the pneumococcal capsule, whereas FTIR spectroscopy analyses the vibrations and rotations of covalent bonds, particularly C-O stretching and O-H bending. Then, as hypothesized in previous studies, certain serotypic differences may be more easily identified by Quellung and other differences may be better detected with FTIR (Burckhardt et al., 2019; Passaris et al., 2022).

Moreover, FTIR spectroscopy measures chemical bonds not only on the pneumococcal outer surface but also within the cell, potentially making it more sensitive to detect subtle differences in glycoproteins and/or glycolipids between related strains. This added sensitivity could explain some of the variations observed. Additionally, significant genetic variation has been reported for specific serotypes (Jefferies et al., 2004; Silva et al., 2006; Lo et al., 2019). These genetic differences might manifest as minor variations among strains of the same serotype, thereby complicating clustering and reducing agreement between methods.

In this study, FTIR spectroscopy was validated for rapid serotyping in a clinical microbiology laboratory using 150 representative pneumococcal strains, marking a novel approach within our country. In Burckhardt et al. (2019) and Passaris et al. (2022) studies, they have validated the FTIR as a rapid, cost-effective, and medium-throughput alternative to the classical phenotypic techniques at research level using in house strains collection or pneumococcal strains from reference centers. The strains used in our study were obtained from invasive samples from hospitalized patients with invasive pneumococcal disease. Vasconcelos et al. (2024) use clinical strains as in our study. However, we used a higher number of strains (150 vs. 76 samples) and included a greater variety of different serotypes (34 vs. 18).

Notably, pneumococcal serotype distribution varies geographically due to factors such as antibiotic pressure and vaccination policies. Accurate and rapid serotyping of the pneumococcal isolates is crucial for several reasons. First, it enables the identification of the most frequent circulating strains in a specific region of interest, facilitating reporting to public health authorities and guiding vaccination strategies to optimize coverage. Second, it aids in the rapid identification of strains with known higher probability of resistance to beta-lactams, offering additional advantage over the gold standard method. IPD follows a seasonal pattern (with higher incidence typically in the winter months). FTIR enables fast serotyping and the optimization of empirical treatments within the same epidemic period, whereas with Quellung, logistical factors such as the need for sample transport to reference centers increase the overall response time to 2–3 months, often meaning that the epidemic period has already passed. Overall, in contrast to the Quellung method, FTIR-based

serotyping enables real-time epidemiological surveillance with rapid turnaround times, optimizing local treatment guidelines for IPD.

In our cohort, the predominant pneumococcal serotypes isolated during the study period in IPD cases were non-PCV13 serotype 8 and PCV13-included serotype 3. Both were accurately classified using the PneumoClassifier and/or the dendrogram method, highlighting the reliability of FTIR-based serotyping.

In Catalonia the serotypes 14, 19F, and 6B were the main cause of IPD with beta lactam resistance until the appearance of PCV7 vaccine. Then, these serotypes were replaced by 19A associated with resistance to beta lactams and macrolides. After the introduction of PCV13 vaccine the 11A and 24F are related to amoxicillin and cefotaxime resistance (Programas de Vigilancia Microbiológica Centro Nacional de Microbiología, 2023). FTIR was able to properly classify all these more resistant serotypes. Additionally, those serogroups/serotypes associated with the highest invasiveness and virulence such as 1, 6, 7F, 14, and 19 were correctly classified using FTIR.

The Quellung technique is a laborious approach that requires experienced personnel for the interpretation of the results, which can sometimes be subjective. Conversely, FTIR is a cost-effective strategy (approximately 17€ for FTIR vs. 60€ for Quellung per sample) that does not require highly experienced technical personnel, although an initial financial investment is required; the results obtained from the pneumococcal colonies are objective and can be obtained in less than an hour. Regarding the processing time, Quellung and FTIR are similar, but Quellung's main limitation is its long turnaround time, which may be due to logistical factors such as the need for sample transport to reference centers, thus increasing both time and cost. While this issue may not be universal, in our facility, Quellung results from a positive culture can take months, whereas FTIR provides results within hours. This makes the FTIR-Biotyper a rapid serotyping method with significant potential for application in hospitals and public health strategies.

Some limitations of the present study include its single-center design, and the use of strains obtained from retrospectively frozen isolates, which rendered some pneumococci nonviable in culture. The PneumoClassifier requires strain growth on agar plates, in contrast to sequencing methods. Nevertheless, the majority of IPD diagnoses are still performed using cultures (Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública, 2022). Furthermore, the serotypes used were the most common in our region and obtaining other serotypes from other geographical regions was not possible in this work; so, a limited number of strains for certain serotypes were included, which may have contributed to the low concordance between the clustering method and the Quellung technique, as well as to some discrepancies between PneumoClassifier and Quellung results. Variations in genetic factors, as well as the local epidemiology of pneumococcal infections, might contribute to differences in the FTIR spectral profiles of these isolates even with the same serotype. Then, these results cannot be extrapolated to other geographical regions that may have other serotypes due to different epidemiological features and vaccination policies related to *S. pneumoniae*. Therefore, each area should perform a previous validation of the PneumoClassifier with more prevalent *S. pneumoniae* strains because the training set included in the AI algorithm can be insufficient. Finally, there is a possibility that the reported discrepancies in our study may be due to erroneous Quellung results that could not be verified using another technique, like whole-genome sequencing.

Considering all these limitations, the next step to improve FTIR performance could be to develop our own AI model, for example, using LDA methodologies, incorporating a larger number of circulating strains from our region. Also, future studies involving isolates from multiple regions would be interesting to explore whether FTIR performance varies across geographical areas within the same pneumococcal serotypes.

5 Conclusion

FTIR spectroscopy presents a potentially user-friendly and cost-effective tool for serotyping *S. pneumoniae* in clinical microbiology laboratories, making it a viable first-line approach for the rapid identification of isolates while awaiting confirmation via the Quellung reaction. Its added value over the Quellung method lies in its ability to rapidly identify the most prevalent circulating strains, those with greater beta-lactam resistance and strains associated with higher invasiveness.

Before implementing FTIR for *S. pneumoniae* serotyping, however, it is crucial to validate the technique using the most frequent local serotypes. These serotypes may vary due to local epidemiology factors, including vaccination policies, antibiotic usage patterns, and population-specific risk factors.

Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Ethics statement

The studies involving humans were approved by Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the University Hospital Germans Trias i Pujol in Badalona, Spain (PI-24-287). The studies were conducted in accordance with the local legislation and institutional requirements. Written informed consent for participation was not required from the participants or the participants' legal guardians/next of kin in accordance with the national legislation and institutional requirements.

Author contributions

MC-R: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. JW-W: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Writing – original draft, Writing – review & editing. AB: Conceptualization, Formal analysis, Software, Writing – review & editing. BR-P: Formal analysis, Methodology, Writing – review & editing. NP: Methodology, Writing – review & editing. JH: Methodology, Writing – review & editing. MQ: Conceptualization, Writing – review & editing. MG: Conceptualization, Writing – review & editing. P-JC: Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Project

administration, Resources, Validation, Writing – review & editing, Supervision.

Funding

The author(s) declare that financial support was received for the research and/or publication of this article. This research was funded by the Catalan Government via AGAUR 2021 SGR 0931.

Acknowledgments

The authors thank Carlos Rodrigo for careful reading and suggestions.

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Generative AI statement

The authors declare that no Gen AI was used in the creation of this manuscript.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2025.1565888/full#supplementary-material

References

Brueggemann, A. B., Griffiths, D. T., Meats, E., Peto, T., Crook, D. W., and Spratt, B. G. (2003). Clonal relationships between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype- and clone-specific differences in invasive disease potential. *J. Infect. Dis.* 187, 1424–1432. doi: 10.1086/374624

Burckhardt, I., Sebastian, K., Mauder, N., Kostrzewa, M., Burckhardt, F., and Zimmermann, S. (2019). Analysis of *Streptococcus pneumoniae* using Fourier-transformed infrared spectroscopy allows prediction of capsular serotype. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 38, 1883–1890. doi: 10.1007/s10096-019-03622-y

Calvo-Silveria, S., González-Díaz, A., Grau, I., Marimón, J. M., Cercenado, E., Quesada, M. D., et al. (2024). Evolution of invasive pneumococcal disease by serotype 3 in adults: a Spanish three-decade retrospective study. *Lancet Reg. Health Eur.* 41:100913. doi: 10.1016/j.lanepe.2024.100913

Comparing Partitions (2009). Tool for comparing partitions. Comparing Partitions. Available online at: http://www.comparingpartitions.info/?link=Tool. (Accessed July 24, 2024).

Dinkelacker, A. G., Vogt, S., Oberhettinger, P., Mauder, N., Rau, J., Kostrzewa, M., et al. (2018). Typing and species identification of clinical *Klebsiella* isolates by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 56:e00843. doi: 10.1128/JCM.00843-18

European Centre for Disease Prevention and Control (2020). "Invasive pneumococcal disease" in ECDC: Annual epidemiological report for 2018 (Stockholm: ECDC).

Geno, K. A., Gilbert, G. L., Song, J. Y., Skovsted, I. C., Klugman, K. P., Jones, C., et al. (2020). Pneumococcal capsules and their types: past, present, and future. *Clin. Microbiol. Rev.* 34:e00320. doi: 10.1128/CMR.00320-20

Griffiths, P. R., and de Haseth, J. A. (2006). Fourier transform infrared spectrometry. *2nd* Edn. Hoboken, NJ: Wiley.

Habib, M., Porter, B. D., and Satzke, C. (2014). Capsular serotyping of *Streptococcus pneumoniae* using the Quellung reaction. *J. Vis. Exp.* 84:e51208. doi: 10.3791/51208

Hu, Y., Zhou, H., Lu, J., Sun, Q., Liu, C., Zeng, Y., et al. (2021). Evaluation of the IR Biotyper for *Klebsiella pneumoniae* typing and its potentials in hospital hygiene management. *Microb. Biotechnol.* 14, 1343–1352. doi: 10.1111/1751-7915.13709

Janoff, E. N., and Musher, D. M. (2015). "Streptococcus pneumoniae" in Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. eds. J. E. Bennett, R. Dolin and M. J. Blaser. *8th* ed (Philadelphia, PA: Saunders), 2310–2327.

Jefferies, J. M. C., Smith, A., Clarke, S. C., Dowson, C., and Mitchell, T. J. (2004). Genetic analysis of diverse disease-causing pneumococci indicates high levels of diversity within serotypes and capsule switching. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5681–5688. doi: 10.1128/JCM.42.12.5681-5688.2004

Knight, J. R., Dunne, E. M., Mulholland, E. K., Saha, S., Satzke, C., Tothpal, A., et al. (2021). Determining the serotype composition of mixed samples of pneumococcus using whole-genome sequencing. *Microb. Genom.* 7:mgen000494. doi: 10.1099/mgen.0.000494

Leung, M. H., Bryson, K., Freystatter, K., Pichon, B., Edwards, G., Charalambous, B. M., et al. (2012). Sequetyping: serotyping *Streptococcus pneumoniae* by a single PCR sequencing strategy. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2419–2427. doi: 10.1128/JCM.06384-11

Liu, L., Oza, S., Hogan, D., Chu, Y., Perin, J., Zhu, J., et al. (2016). Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–15: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *Lancet* 388, 3027–3035. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31593-8

Lo, S. W., Gladstone, R. A., van Tonder, A. J., Lees, J. A., du Plessis, M., Benisty, R., et al. (2019). Pneumococcal lineages associated with serotype replacement and antibiotic resistance in childhood invasive pneumococcal disease in the post-PCV13 era: an international whole-genome sequencing study. *Lancet Infect. Dis.* 19, 759–769. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30297-X

Martak, D., Valot, B., Sauget, M., Cholley, P., Thouverez, M., Bertrand, X., et al. (2019). Fourier-transform infra red spectroscopy can quickly type Gram-negative bacilli responsible for hospital outbreaks. *Front. Microbiol.* 10:1440. doi: 10.3389/fmicb.2019.01440

Naumann, D., Helm, D., and Labischinski, H. (1991). "Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy" in Modern techniques for rapid microbiological analysis. ed. W. Nelson (New York, NY: VHC Publisher), 81–82.

Park, S., and Ryoo, N. (2024). Comparative analysis of IR-Biotyper, MLST, cgMLST, and WGS for clustering of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a neonatal intensive care unit. *Microbiol. Spectr.* 12:e0411923. doi: 10.1128/spectrum.04119-23

Passaris, I., Mauder, N., Kostrzewa, M., Burckhardt, I., Zimmermann, S., van Sorge, N. M., et al. (2022). Validation of Fourier transform infrared spectroscopy for serotyping of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 60:e0032522. doi: 10.1128/jcm.00325-22

Pérez, A., Sala, P., Giménez, M., Sierra, M., Esteve, A., Alonso, A., et al. (2004). Pneumococcal bacteremia in children: an 8-year review in two hospitals in Barcelona. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 23, 677–681. doi: 10.1007/s10096-004-1197-2

Programas de Vigilancia Microbiológica Centro Nacional de Microbiología. (2023). Publication: Programas de Vigilancia Microbiológica Centro Nacional de Microbiología. Volumen 2. 2021–2022; Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología: Madrid. Available online at: http://hdl.handle.net/20.500.12105/16683

Quintelas, C., Ferreira, E. C., Lopes, J. A., and Sousa, C. (2018). An overview of the evolution of infrared spectroscopy applied to bacterial typing. *Biotechnol. J.* 13:10.1002/biot.201700449:1700449. doi: 10.1002/biot.201700449

Rakovitsky, N., Frenk, S., Kon, H., Schwartz, D., Temkin, E., Solter, E., et al. (2020). Fourier transform infrared spectroscopy is a new option for outbreak investigation: a retrospective analysis of an extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.* 58:e00098. doi: 10.1128/JCM.00098-20

Sahu, R. K., Mordechai, S., Pesakhov, S., Dagan, R., and Porat, N. (2006). Use of FTIR spectroscopy to distinguish between capsular types and capsular quantities in *Streptococcus pneumoniae*. *Biopolymers* 83, 434–442. doi: 10.1002/bip.20576

Sandgren, A., Sjostrom, K., Olsson-Liljequist, B., Christensson, B., Samuelsson, A., Kronvall, G., et al. (2004). Effect of clonal and serotype-specific properties on the invasive capacity of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* 189, 785–796. doi: 10.1086/381686

Santos, J. M., and Embrechts, M. (2009). "On the use of the adjusted Rand index as a metric for evaluating supervised classification" in Artificial neural networks—ICANN 2009. eds. C. Alippi, M. Polycarpou, C. Panayiotou and G. Ellinas (Berlin: Springer).

Scheier, T. C., Franz, J., Boumasmoud, M., Andreoni, F., Chakrakodi, B., Duvnjak, B., et al. (2023). Fourier-transform infrared spectroscopy for typing of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: performance analysis and outbreak investigation. *Microbiol. Spectr.* 11:e0098423. doi: 10.1128/spectrum.00984-23

Severiano, A., Pinto, F. R., Ramirez, M., and Carriço, J. A. (2011). Adjusted Wallace coefficient as a measure of congruence between typing methods. *J. Clin. Microbiol.* 49, 3997–4000. doi: 10.1128/JCM.00624-11

Silva, N. A., McCluskey, J., Jefferies, J. M. C., Hinds, J., Smith, A., Clarke, S. C., et al. (2006). Genomic diversity between strains of the same serotype and multilocus sequence type among pneumococcal clinical isolates. *Infect. Immun.* 74, 3513–3518. doi: 10.1128/IAI.00079-06

Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública (2022). Epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva a Catalunya: informe 2019–2020. Sistema de notificació microbiològica de Catalunya. Barcelona: Agència de Salut Pública de Catalunya. Available online at: https://hdl.handle.net/11351/8709

Teng, A. S. J., Habermehl, P. E., van Houdt, R., de Jong, M. D., van Mansfeld, R., SPF, M., et al. (2022). Comparison of fast Fourier transform infrared spectroscopy biotyping with whole genome sequencing-based genotyping in common nosocomial pathogens. *Anal. Bioanal. Chem.* 414, 7179–7189. doi: 10.1007/s00216-022-04270-6

Vasconcelos, T. M., Rodrigues, L. S., Krul, D., Barbosa, S. C., Siqueira, A. C., Almeida, S. C. G., et al. (2024). Fourier transform infrared spectroscopy for *Streptococcus pneumoniae* capsular serotype classification in pediatric patients with invasive infections. *Front. Microbiol.* 15:1497377. doi: 10.3389/fmicb.2024.1497377

Vaz, M., Meirinhos-Soares, L., Sousa, C. C., Ramirez, M., Melo-Cristino, J., and Lopes, J. A. (2013). Serotype discrimination of encapsulated *Streptococcus pneumoniae* strains by Fourier-transform infrared spectroscopy and chemometrics. *J. Microbiol. Methods* 93, 102–107. doi: 10.1016/j.mimet.2013.02.008

Velusamy, S., Tran, T., Mongkolrattanothai, T., Walker, H., McGee, L., and Beall, B. (2020). Expanded sequential quadriplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for identifying pneumococcal serotypes, penicillin susceptibility, and resistance markers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 97:115037. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2020.115037

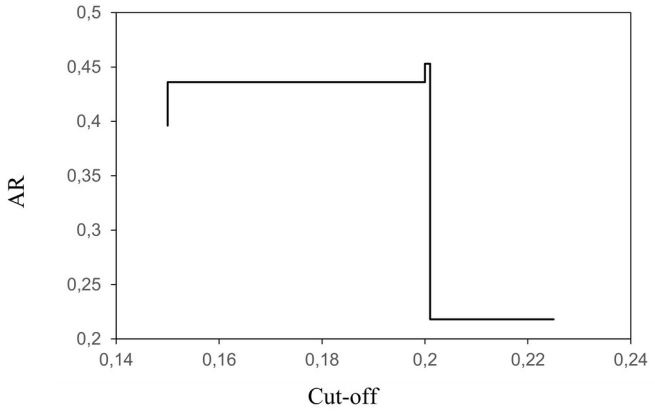
Weiser, J. N., Ferreira, D. M., and Paton, J. C. (2018). *Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 355–367. doi: 10.1038/s41579-018-0001-8

Yahiaoui, R. Y., Bootsma, H. J., den Heijer, C. D. J., Pluister, G. N., John Paget, W., Spreeuwenberg, P., et al. (2018). Distribution of serotypes and patterns of antimicrobial resistance among commensal *Streptococcus pneumoniae* in nine European countries. *BMC Infect. Dis.* 18:440. doi: 10.1186/s12879-018-3341-0

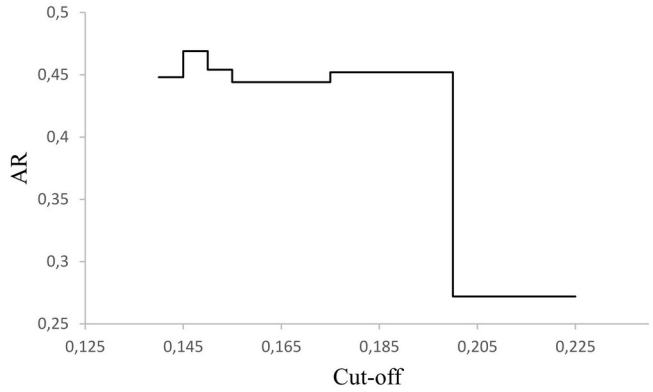
frontiers

Supplementary Material

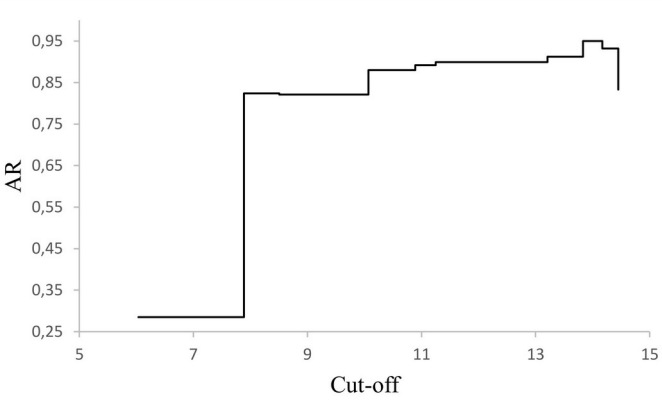
1 Supplementary Figures



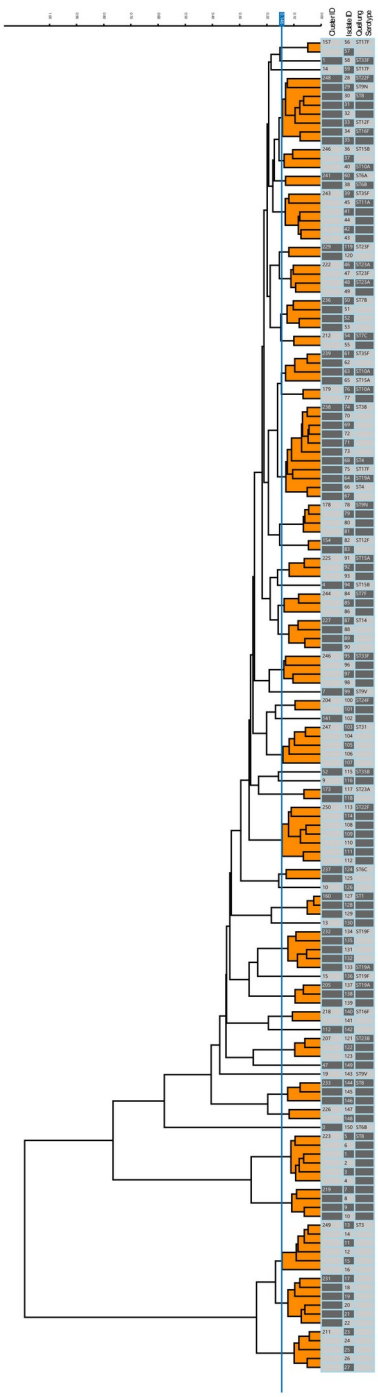
Supplementary Figure 1. Final internal validation of FTIR clustering cut-off value. The most restrictive cut-off value that maximized the adjusted Rand index (AR) was 0.201 for the clustering of the study dataset (n=65) of *S. pneumoniae* isolates considering Quellung reaction as the reference method. The tested cut-off range corresponds to the unofficial range suggested by the manufacturer (0.20-0.25) with an additional range on each side (0.15-0.225).



Supplementary Figure 2. Validation of FTIR principal component analysis (PCA) clustering cut-off value. The most restrictive cut-off value that maximized the adjusted Rand index (AR) was 0.146 for the clustering of the study dataset (*N*=150) of *S. pneumoniae* isolates considering Quellung reaction as the reference method.

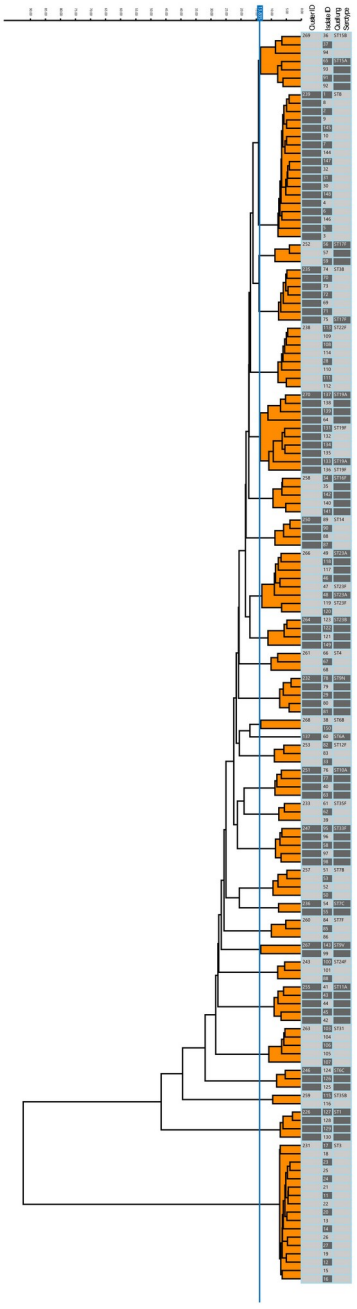


Supplementary Figure 3. Validation of FTIR linear discriminant analysis (LDA) clustering cut-off value. The most restrictive cut-off value that maximized the adjusted Rand index (AR) was 13.835 for the clustering of the study dataset (*N*=150) of *S. pneumoniae* isolates considering Quellung reaction as the reference method.



3

Supplementary Figure 4. Dendrogram visualizing the 150 tested pneumococcal strains representing 32 serotypes. The vertical dashed line indicates the cutoff value (0.146). The dendrogram was constructed using the Euclidean distance metric with principal component analysis (PCA) as the dimensionality reduction method. The resulting PCA clusters, isolate IDs, and corresponding Quellung serotypes are indicated in each column.



5

Supplementary Figure 5. Dendrogram visualizing the 150 tested pneumococcal strains representing 32 serotypes. The vertical dashed line indicates the cutoff value (13.835). The dendrogram was constructed using the Euclidean distance metric with linear discriminant analysis (LDA) as the dimensionality reduction method. The resulting LDA clusters, isolate IDs, and corresponding Quellung serotypes are indicated in each column.

4. Conclusiones

La presente tesis doctoral ha evaluado la utilidad de la espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) como herramienta aplicable en el laboratorio de microbiología clínica, analizando su rendimiento en distintos escenarios y frente a diferentes microorganismos de relevancia asistencial: (i) investigación de brotes nosocomiales por *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE y *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina, y (ii) determinación del serotipo capsular de *Streptococcus pneumoniae*.

A partir de los resultados obtenidos en los tres trabajos que componen esta tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. **La espectroscopia FTIR constituye una herramienta rápida, coste-efectiva e integrable en la rutina asistencial del laboratorio de microbiología clínica en los tres escenarios evaluados**. El FTIR permitió obtener resultados en pocas horas a partir del cultivo bacteriano, con una preparación sencilla de las muestras y sin requerir personal altamente especializado.
2. **El rendimiento del FTIR depende del objetivo epidemiológico y del microorganismo analizado**. En los estudios centrados en la caracterización de brotes nosocomiales (Artículos I y II), el FTIR demostró una elevada capacidad para agrupar aislados clonales con un rendimiento variable según la especie bacteriana.

En *Klebsiella pneumoniae* productora de BLEE el FTIR tuvo una resolución inferior a la WGS y podría emplearse como una herramienta de cribado. Por otra parte, en *Enterococcus faecium* resistente a vancomicina el rendimiento fue equiparable al de las metodologías genómicas, permitiendo plantear su uso como alternativa válida en escenarios de transmisión epidemiológica activa.

3. **El FTIR aporta un valor añadido respecto a la epidemiología convencional en la investigación de brotes nosocomiales**. En comparación con los criterios epidemiológicos clásicos basados en la coincidencia temporal y espacial de los casos, el FTIR permitió identificar relaciones clonales no detectadas previamente, incluyendo la detección de brotes denominados "ocultos" que afectaban a diferentes unidades hospitalarias. Esto refuerza su utilidad como herramienta complementaria para mejorar la sensibilidad de las investigaciones epidemiológicas.

4. **La tendencia del FTIR a la sobreestimación clonal es justificable en contextos de brote**. La tendencia del FTIR a agrupar algunos aislados no relacionados desde el punto de vista genómico resulta "aceptable" en escenarios de brote nosocomial, donde una sobreestimación inicial de las relaciones clonales activa de forma temprana las medidas de control, frente al riesgo de no detectar un brote en curso.

5. **La aplicabilidad del FTIR no se limita al estudio de la clonalidad en brotes nosocomiales, sino que también puede extenderse al ámbito de la vigilancia epidemiológica comunitaria**. En el Artículo III, el FTIR combinado con algoritmos de aprendizaje automático demostró una elevada concordancia con la reacción de *Quellung* para la determinación del serotipo capsular de *Streptococcus pneumoniae*, especialmente para los serotipos incluidos en las vacunas conjugadas.
6. **La validación local y la estandarización metodológica son requisitos indispensables para la implementación del FTIR**. Los resultados obtenidos muestran la necesidad de establecer puntos de corte específicos y validar previamente la técnica para cada especie bacteriana y contexto epidemiológico.

5. Bibliografía

1. Chang D, Sharma L, Cruz CSD, Zhang D. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of Klebsiella pneumoniae Infection. Front Microbiol. 2021 Dec;12:750662. doi:10.3389/fmicb.2021.750662
2. Asokan S, Jacob T, Jacob J, AlSosowaa AA, Cherian T, Peijnenburg WJGM, et al. Klebsiella pneumoniae: A growing threat in the era of antimicrobial resistance. The Microbe. 2025 Jun;7:100333. doi:10.1016/j.microb.2025.100333
3. Etymologia: *Klebsiella*. Emerg Infect Dis. 2010 Sep;16(9):1418–1418. doi:10.3201/eid1609.ET1609
4. Carl Friedländer (1847–87). Nature. 1947 Nov;160(4072):668–668. doi:10.1038/160668b0
5. Ashurst JV, Dawson A. Klebsiella Pneumonia [Internet]. StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Jun 27]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/ PubMed PMID: 30085546.
6. Jin SS, Wang WQ, Jiang YH, Yu YT, Wang RL. A Comprehensive Overview of Klebsiella Pneumoniae: Resistance Dynamics, Clinical Manifestations, and Therapeutic Options. Infect Drug Resist. 2025 Mar;Volume 18:1611–28. doi:10.2147/IDR.S502175
7. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of Klebsiella pneumoniae. Nat Rev Microbiol. 2020 Jun;18(6):344–59. doi:10.1038/s41579-019-0315-1 PubMed PMID: 32055025.
8. Morgado S, Fonseca E, Vicente AC. Genomics of Klebsiella pneumoniae Species Complex Reveals the Circulation of High-Risk Multidrug-Resistant Pandemic Clones in Human, Animal, and Environmental Sources. Microorganisms. 2022 Nov;10(11). doi:10.3390/microorganisms10112281
9. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Jul;112(27):E3574–81. doi:10.1073/pnas.1501049112 PubMed PMID: 26100894.
10. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):4178–82. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005 PubMed PMID: 16081970.
11. Pasteur I. Klebsiella PasteurMLST sequence definition database [Internet]. [cited 2025 Jun 27]. Available from: https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef

12. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk Klebsiella pneumoniae Clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother. 2020 Sep;64(10). doi:10.1128/AAC.01148-20
13. D'Apolito D, Arena F, Conte V, Angelis LHD, Mento GD, Carreca AP, et al. Phenotypical and molecular assessment of the virulence potential of KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae ST392 clinical isolates. Microbiol Res. 2020 Nov;240. doi:10.1016/j.micres.2020.126551 PubMed PMID: 32652494.
14. Abbas R, Chakkour M, Zein El Dine H, Obaseki EF, Obeid ST, Jezzini A, et al. General Overview of Klebsiella pneumonia: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. Biology. 2024 Jan 27;13(2):78. doi:10.3390/biology13020078
15. Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, et al. NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. Database. 2020;2020. doi:10.1093/database/baaa062 PubMed PMID: 32761142.
16. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of Klebsiella pneumoniae. Front Cell Infect Microbiol. 2018 Jan;8:4. doi:10.3389/fcimb.2018.00004 PubMed PMID: 29404282.
17. Gorrie CL, Eta MM, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of Klebsiella pneumoniae Infection in Intensive Care Patients. Clin Infect Dis. 2017 Jul;65(2):208–15. doi:10.1093/cid/cix270 PubMed PMID: 28369261.
18. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, et al. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of Klebsiella pneumoniae. mSphere. 2016 Oct;1(5). doi:10.1128/msphere.00261-16
19. Paczosa MK, Mecsas J. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016 Sep;80(3):629–61. doi:10.1128/mmbr.00078-15 PubMed PMID: 27307579.
20. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of Klebsiella spp. Sci Rep. 2015 Oct;5. doi:10.1038/srep15573 PubMed PMID: 26493302.
21. Julianelle LA. A Biological Classification of Encapsulatus Pneumoniae (Friedlander's Bacillus). J Exp Med. 1926 Jul;44(1):113–28. doi:10.1084/jem.44.1.113
22. Xu L, Li J, Wu W, Wu X, Ren J. Klebsiella pneumoniae capsular polysaccharide: Mechanism in regulation of synthesis, virulence, and pathogenicity. Virulence. 2024;15(1). doi:10.1080/21505594.2024.2439509
23. Lin YT, Siu LK, Lin JC, Chen TL, Tseng CP, Yeh KM, et al. Seroepidemiology of Klebsiella pneumoniae colonizing the intestinal tract of healthy chinese and overseas chinese adults in Asian countries. BMC Microbiol. 2012;12. doi:10.1186/1471-2180-12-13 PubMed PMID: 22260182.

24. Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP, et al. Klebsiella pneumoniae Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2022 May;12. doi:10.3389/fcimb.2022.877995 PubMed PMID: 35646720.
25. Stahlhut SG, Tchesnokova V, Struve C, Weissman SJ, Chattopadhyay S, Yakovenko O, et al. Comparative structure-function analysis of mannose-specific FimH adhesins from Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. J Bacteriol. 2009 Nov;191(21):6592–601. doi:10.1128/JB.00786-09 PubMed PMID: 19734306.
26. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding Klebsiella pneumoniae type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. Infect Immun. 2009 Nov;77(11):5016–24. doi:10.1128/IAI.00585-09 PubMed PMID: 19703972.
27. Jagnow J, Clegg S. Klebsiella pneumoniae MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. Microbiology. 2003 Sep;149(9):2397–405. doi:10.1099/mic.0.26434-0
28. Schalk IJ. Bacterial siderophores: diversity, uptake pathways and applications. Nat Rev Microbiol. 2025 Jan;23(1):24–40. doi:10.1038/s41579-024-01090-6 PubMed PMID: 39251840.
29. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in Klebsiella pneumoniae populations. Microb Genomics. 2018 Sep 1;4(9). doi:10.1099/mgen.0.000196
30. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for Klebsiella pneumoniae and its related species complex. Nat Commun. 2021 Jul 7;12(1):4188. doi:10.1038/s41467-021-24448-3
31. Bengoechea JA, Pessoa JS. Klebsiella pneumoniae infection biology: Living to counteract host defences. FEMS Microbiol Rev. 2019 Mar;43(2):123–44. doi:10.1093/femsre/fuy043 PubMed PMID: 30452654.
32. Lim C, Zhang CY, Cheam G, Chu WHW, Chen Y, Yong M, et al. Essentiality of the virulence plasmid-encoded factors in disease pathogenesis of the major lineage of hypervirulent Klebsiella pneumoniae varies in different infection niches. eBioMedicine. 2025 May;115. doi:10.1016/j.ebiom.2025.105683 PubMed PMID: 40184910.
33. Singh RP, Kapoor A, Sinha A, Ma Y, Shankar M. Virulence factors of Klebsiella pneumoniae: Insights into canonical and emerging mechanisms driving pathogenicity and drug resistance. Microbe Neth. 2025 Jun;7. doi:10.1016/j.microb.2025.100289

34. Wei S, Xu T, Chen Y, Zhou K. Autophagy, cell death, and cytokines in K. pneumoniae infection: therapeutic perspectives. Emerg Microbes Infect. 2023;12(1). doi:10.1080/22221751.2022.2140607 PubMed PMID: 36287114.
35. Sargianou M, Stathopoulos P, Vrysis C, Tzvetanova ID, Falagas ME. New β-Lactam/β-Lactamase Inhibitor Combination Antibiotics. Pathogens. 2025 Apr;14(4). doi:10.3390/pathogens14040307
36. Mondemé M, Carnoy C, Sirard JC, Faveeuw C. Treatment of Bacterial Infections with b-Lactams: Cooperation with Innate Immunity. Infect Immun. 2023 Feb;91(2). doi:10.1128/iai.00503-22 PubMed PMID: 36695576.
37. Darby EM, Trampari E, Siasat P, Gaya MS, Alav I, Webber MA, et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. Nat Rev Microbiol. 2023 May;21(5):280–95. doi:10.1038/s41579-022-00820-y PubMed PMID: 36411397.
38. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β-Lactamase-Producing Pathogens. Clin Microbiol Rev. 2020 Mar 18;33(2):e00047-19. doi:10.1128/CMR.00047-19
39. Pan X, He Y, Chen T, Chan KF, Zhao Y. Modified penicillin molecule with carbapenem-like stereochemistry specifically inhibits class C β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Dec;61(12). doi:10.1128/AAC.01288-17 PubMed PMID: 28971874.
40. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function [Internet]. [cited 2025 Jul 8]. Available from: http://www.bldb.eu/
41. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar;54(3):969–76. doi:10.1128/AAC.01009-09 PubMed PMID: 19995920.
42. Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales—From ESBLs to Carbapenemases. Antibiotics. 2021 Sep 21;10(9):1140. doi:10.3390/antibiotics10091140
43. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A review of SHV extended-spectrum β-lactamases: Neglected yet ubiquitous. Front Microbiol. 2016 Sep;7. doi:10.3389/fmicb.2016.01374
44. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. JAC-Antimicrob Resist. 2021 Sep;3(3). doi:10.1093/jacamr/dlab092 PubMed PMID: 34286272.
45. World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024. Report No.
46. Khasapane NG, Nkhebenyane SJ, Lekota K, Thekisoe O, Ramatla T. “One Health” Perspective on Prevalence of ESKAPE Pathogens in Africa: A

Systematic Review and Meta-Analysis. Pathogens. 2024 Sep 12;13(9):787. doi:10.3390/pathogens13090787
47. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. BioMed Res Int. 2016;2016:2475067. doi:10.1155/2016/2475067 PubMed PMID: 27274985.
48. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2023. Stockholm: ECDC; 2024 Nov. Report No.
49. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. [cited 2025 Aug 3]. Available from: https://atlas.ecdc.europa.eu/public/
50. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2011;17(10):1791–8. doi:10.3201/eid1710.110655 PubMed PMID: 22000347.
51. Ma J, Song X, Li M, Yu Z, Cheng W, Yu Z, et al. Global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. Microbiol Res. 2023 Jan;266. doi:10.1016/j.micres.2022.127249 PubMed PMID: 36356348.
52. Ding L, Shen S, Chen J, Tian Z, Shi Q, Han R, et al. Klebsiella pneumoniae carbapenemase variants: the new threat to global public health. Clin Microbiol Rev. 2023;36(4). doi:10.1128/cmr.00008-23 PubMed PMID: 37937997.
53. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Oct;59(10):5873–84. doi:10.1128/AAC.01019-15
54. Kraftova L, Finianos M, Studentova V, Chudejova K, Jakubu V, Zemlickova H, et al. Evidence of an epidemic spread of KPC-producing Enterobacterales in Czech hospitals. Sci Rep. 2021 Dec;11(1). doi:10.1038/s41598-021-95285-z PubMed PMID: 34344951.
55. Pongchaikul P, Mongkolsuk P. Comprehensive Analysis of Imipenemase (IMP)-Type Metallo-β-Lactamase: A Global Distribution Threatening Asia. Antibiotics. 2022 Feb;11(2). doi:10.3390/antibiotics11020236
56. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM Metallo-β-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. Clin Microbiol Rev. 2019 Mar;32(2). doi:10.1128/CMR.00115-18
57. Fortunato G, Vaz-Moreira I, Gajic I, Manaia CM. Insight into phylogenomic bias of blaVIM-2 or blaNDM-1 dissemination amongst carbapenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents. 2023 May;61(5). doi:10.1016/j.ijantimicag.2023.106788 PubMed PMID: 36924802.

58. Cabanel N, Rosinski-Chupin I, Chiarelli A, Botin T, Tato M, Canton R, et al. Evolution of VIM-1-Producing Klebsiella pneumoniae Isolates from a Hospital Outbreak Reveals the Genetic Bases of the Loss of the Urease-Positive Identification Character. Beiko RG, editor. mSystems. 2021 Jun;6(3). doi:10.1128/mSystems.00244-21
59. Boyd SE, Holmes A, Peck R, Livermore DM, Hope W. OXA-48-Like β-Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. Antimicrob Agents Chemother. 2022 Aug;66(8). doi:10.1128/aac.00216-22 PubMed PMID: 35856662.
60. Gracia-Ahufinger I, López-González L, Vasallo FJ, Galar A, Siller M, Pitart C, et al. The CARBA-MAP study: national mapping of carbapenemases in Spain (2014–2018). Front Microbiol. 2023 Sep 8;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1247804
61. Ullah SR, Jamal M, Rahman A, Andleeb S. Comprehensive insights into Klebsiella pneumoniae: unravelling clinical impact, epidemiological trends and antibiotic-resistance challenges. J Antimicrob Chemother. 2024 Jul;79(7):1484–92. doi:10.1093/jac/dkae184 PubMed PMID: 38832539.
62. GBD 2019 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. The Lancet. 2022 Dec;400(10369):2221–48. doi:10.1016/S0140-6736(22)02185-7
63. Klein RD, Hultgren SJ. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host–pathogen interactions and new treatment strategies. Nat Rev Microbiol. 2020 Apr;18(4):211–26. doi:10.1038/s41579-020-0324-0
64. Khadka S, Ring BE, Walker RS, Krzeminski LR, Pariseau DA, Hathaway M, et al. Urine-mediated suppression of *Klebsiella pneumoniae* mucoidy is counteracted by spontaneous Wzc variants altering capsule chain length. mSphere. 2023 Oct 24;8(5). doi:10.1128/msphere.00288-23
65. Krawczyk B, Wysocka M, Michalik M, Gołębiewska J. Urinary Tract Infections Caused by K. pneumoniae in Kidney Transplant Recipients – Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Apr 21;12. doi:10.3389/fcimb.2022.861374
66. Grosjean V, Gressens SB, Pham T, Gaudry S, Ait-Oufella H, De Prost N, et al. Community-acquired Klebsiella pneumoniae pneumonia in ICU: a multicenter retrospective study. Ann Intensive Care. 2024 Apr 30;14(1). doi:10.1186/s13613-024-01269-3
67. Juan CH, Fang SY, Chou CH, Tsai TY, Lin YT. Clinical characteristics of patients with pneumonia caused by Klebsiella pneumoniae in Taiwan and prevalence of antimicrobial-resistant and hypervirulent strains: a retrospective study. Antimicrob Resist Infect Control. 2020 Dec;9(1). doi:10.1186/s13756-019-0660-x

68. American Thoracic Society. Guidelines for the Management of Adults with Hospital-acquired, Ventilator-associated, and Healthcare-associated Pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Feb 15;171(4):388–416. doi:10.1164/rccm.200405-644st
69. Molton JS, Chan M, Kalimuddin S, Oon J, Young BE, Low JG, et al. Oral vs Intravenous Antibiotics for Patients With Klebsiella pneumoniae Liver Abscess: A Randomized, Controlled Noninferiority Study. Clin Infect Dis. 2020 Aug 14;71(4):952–9. doi:10.1093/cid/ciz881
70. Cardenas-Alvarez J, Balayla G, Triana A, Diaz Lankenau R, Franco-Paredes C, Henao-Martínez AF, et al. Clinical Spectrum and Outcomes of Cryptogenic Klebsiella pneumoniae Liver Abscess in the Americas: A Scoping Review. Pathogens. 2023 Apr 29;12(5):661. doi:10.3390/pathogens12050661
71. Li D, Huang X, Rao H, Yu H, Long S, Li Y, et al. Klebsiella pneumoniae bacteremia mortality: a systematic review and meta-analysis. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Apr 20;13. doi:10.3389/fcimb.2023.1157010
72. Man MY, Shum HP, Chan YH, Chan KC, Yan WW, Lee RA, et al. Clinical predictors and outcomes of Klebsiella pneumoniae bacteraemia in a regional hospital in Hong Kong. J Hosp Infect. 2017 Sep;97(1):35–41. doi:10.1016/j.jhin.2017.06.007
73. You T, Zhang H, Guo L, Ling KR, Hu XY, Li LQ. Differences in clinical characteristics of early- and late-onset neonatal sepsis caused by *Klebsiella* pneumoniae. Int J Immunopathol Pharmacol. 2020 Jan;34. doi:10.1177/2058738420950586
74. Mukherjee S, Mitra S, Dutta S, Basu S. Neonatal Sepsis: The Impact of Carbapenem-Resistant and Hypervirulent Klebsiella pneumoniae. Front Med. 2021 Jun 11;8. doi:10.3389/fmed.2021.634349
75. Nonne F, Molfetta M, Belciug GF, Carducci M, Cianchi V, Zakroff C, et al. The characterization of Klebsiella pneumoniae associated with neonatal sepsis in low- and middle-income countries to inform vaccine design. Commun Biol. 2025 Jun 9;8(1). doi:10.1038/s42003-025-08258-7
76. Tidona F, Francolino S, Ghiglietti R, Locci F, Carminati D, Laforce P, et al. Characterization and pre-industrial validation of Streptococcus thermophilus strains to be used as starter cultures for Crescenza, an Italian soft cheese. Food Microbiol. 2020 Dec;92:103599. doi:10.1016/j.fm.2020.103599
77. Baron S, editor. Medical Microbiology [Internet]. 4th edn. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [cited 2025 Jul 14]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7627/ PubMed PMID: 21413252.
78. Kuryłek A, Stasiak M, Kern-Zdanowicz I. Virulence factors of Streptococcus anginosus – a molecular perspective. Front Microbiol. 2022 Oct 26;13. doi:10.3389/fmicb.2022.1025136

79. van Sorge NM, Cole JN, Kuipers K, Henningham A, Aziz RK, Kasirer-Friede A, et al. The Classical Lancefield Antigen of Group A Streptococcus Is a Virulence Determinant with Implications for Vaccine Design. Cell Host Microbe. 2014 Jun;15(6):729–40. doi:10.1016/j.chom.2014.05.009
80. Hiller NL, Orihuela CJ. Biological puzzles solved by using *Streptococcus pneumoniae* : a historical review of the pneumococcal studies that have impacted medicine and shaped molecular bacteriology. J Bacteriol. 2024 Jun 20;206(6). doi:10.1128/jb.00059-24
81. Winslow CEA, Broadhurst J, Buchanan RE, Krumwiede C, Rogers LA, Smith GH. The Families and Genera of the Bacteria: Final Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists on Characterization and Classification of Bacterial Types. J Bacteriol. 1920 May;5(3):191–229. doi:10.1128/jb.5.3.191-229.1920
82. Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA, editors. Approved Lists of Bacterial Names (Amended). Washington (DC); 1989. PubMed PMID: 20806452.
83. Yesilkaya H, Oggioni MR, Andrew PW. Streptococcus pneumoniae: 'captain of the men of death' and financial burden. Microbiology. 2022 Dec 31;168(12). doi:10.1099/mic.0.001275
84. Narciso AR, Dookie R, Nannapaneni P, Normark S, Henriques-Normark B. Streptococcus pneumoniae epidemiology, pathogenesis and control. Nat Rev Microbiol. 2025 Apr;23(4):256–71. doi:10.1038/s41579-024-01116-z
85. Loughran AJ, Orihuela CJ, Tuomanen EI. *Streptococcus pneumoniae*: Invasion and Inflammation. Microbiol Spectr. 2019 Apr 12;7(2). doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0004-2018
86. Paton JC, Trappetti C. *Streptococcus pneumoniae* Capsular Polysaccharide. Microbiol Spectr. 2019 Apr 12;7(2). doi:10.1128/microbiolspec.gpp3-0019-2018
87. Ntim OK, Donkor ES. Molecular Epidemiology of Streptococcus pneumoniae Serotype 1: A Systematic Review of Circulating Clones and Clonal Clusters. Int J Mol Sci. 2025 Mar 4;26(5):2266. doi:10.3390/ijms26052266
88. European Centre for Disease Prevention and Control. Invasive pneumococcal disease - Annual Epidemiological Report for 2022. ECDC; 2025 Jan. Report No.
89. De Sevilla MF, Alcaraz C, Soldevila N, Izquierdo C, Esteva C, Moraga-Llop F, et al. Clinical manifestations, serotype distribution and incidence of pediatric invasive pneumococcal disease in Catalonia (Spain), 2018-2022. Eur J Pediatr. 2025 May 2;184(5):323. doi:10.1007/s00431-025-06137-1
90. Sanz JC, De Miguel S, Ordobás M, García Comas L. Streptococcus pneumoniae serotypes with meningeal tropism in cases of invasive pneumococcal disease. Community of Madrid, 2007–2018. Enfermedades

Infecc Microbiol Clínica Engl Ed. 2020 Oct;38(8):371–4. doi:10.1016/j.eimce.2019.11.004
91. Càmara J, Cubero M, Martín-Galiano AJ, García E, Grau I, Nielsen JB, et al. Evolution of the β-lactam-resistant Streptococcus pneumoniae PMEN3 clone over a 30 year period in Barcelona, Spain. J Antimicrob Chemother. 2018 Nov 1;73(11):2941–51. doi:10.1093/jac/dky305
92. Zhou ML, Wang ZR, Li YB, Kudinha T, Wang J, Wang Y, et al. Rapid identification of Streptococcus pneumoniae serotypes by cpsB gene-based sequetyping combined with multiplex PCR. J Microbiol Immunol Infect. 2022 Oct;55(5):870–9. doi:10.1016/j.jmii.2021.11.004
93. Velusamy S, Tran T, Mongkolrattanothai T, Walker H, McGee L, Beall B. Expanded sequential quadriplex real-time polymerase chain reaction (PCR) for identifying pneumococcal serotypes, penicillin susceptibility, and resistance markers. Diagn Microbiol Infect Dis. 2020 Jun;97(2):115037. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115037
94. De Souza MB, De Carvalho E, Cergole-Novella MC, Molinari DA, Colpas DR, Dos Santos Carmo AM, et al. Multiplex PCR to Streptococcus pneumoniae serotype identification directly in cerebrospinal fluid samples. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2023 Mar;42(3):255–66. doi:10.1007/s10096-023-04547-3
95. Centers for Disease Control and Prevention. Streptococcus pneumoniae Detection and Serotyping Using PCR [Internet]. [cited 2025 Jul 21]. Available from: https://www.cdc.gov/strep-lab/php/pneumococcus/serotyping-using-pcr.html
96. Leung MH, Bryson K, Freystatter K, Pichon B, Edwards G, Charalambous BM, et al. Sequetyping: Serotyping Streptococcus pneumoniae by a Single PCR Sequencing Strategy. J Clin Microbiol. 2012 Jul;50(7):2419–27. doi:10.1128/jcm.06384-11
97. Henares D, Lo SW, Perez-Argüello A, Redin A, Ciruela P, Garcia-Garcia JJ, et al. Comparison of next generation technologies and bioinformatics pipelines for capsular typing of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol. 2023 Dec 19;61(12). doi:10.1128/jcm.00741-23
98. Knight JR, Dunne EM, Mulholland EK, Saha S, Satzke C, Tothpal A, et al. Determining the serotype composition of mixed samples of pneumococcus using whole-genome sequencing. Microb Genomics. 2021 Jan 1;7(1). doi:10.1099/mgen.0.000494
99. D'Aeth JC, Bertran M, Abdullahi F, Eletu S, Hani E, Fry NK, et al. Whole-genome sequencing, strain composition, and predicted antimicrobial resistance of Streptococcus pneumoniae causing invasive disease in England in 2017–20: a prospective national surveillance study. Lancet Microbe. 2025 Jul;6(7):101102. doi:10.1016/j.lanmic.2025.101102

100. Nishimoto AT, Rosch JW, Tuomanen EI. Pneumolysin: Pathogenesis and Therapeutic Target. Front Microbiol. 2020 Jul 2;11. doi:10.3389/fmicb.2020.01543
101. Pereira JM, Xu S, Leong JM, Sousa S. The Yin and Yang of Pneumolysin During Pneumococcal Infection. Front Immunol. 2022 Apr 22;13. doi:10.3389/fimmu.2022.878244
102. Periselneris J, Turner CT, Ercoli G, Szylar G, Weight CM, Thurston T, et al. Pneumolysin suppresses the initial macrophage pro-inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae*. Immunology. 2022 Nov;167(3):413–27. doi:10.1111/imm.13546
103. Li Y, Wu H, Hu Y, Meng H, Xu Y. Glycyrol targets Pneumolysin (PLY) oligomerization to reduce Streptococcus pneumoniae toxicity. Front Pharmacol. 2024 Dec 3;15. doi:10.3389/fphar.2024.1478135
104. Nguyen M, Bauda E, Boyat C, Laguri C, Freton C, Chouquet A, et al. Teichoic acids in the periplasm and cell envelope of Streptococcus pneumoniae. eLife. 2025 Apr 23;14. doi:10.7554/elife.105132
105. Pathak A, Bergstrand J, Sender V, Spelmink L, Aschtgen MS, Muschiol S, et al. Factor H binding proteins protect division septa on encapsulated Streptococcus pneumoniae against complement C3b deposition and amplification. Nat Commun. 2018 Aug 23;9(1). doi:10.1038/s41467-018-05494-w
106. Waz NT, Milani B, Assoni L, Coelho GR, Sciani JM, Parisotto T, et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) prevents killing of Streptococcus pneumoniae by indolicidin. Sci Rep. 2024 Oct 9;14(1). doi:10.1038/s41598-024-73564-9
107. Garcia E. Structure, Function, and Regulation of LytA: The N-Acetylmuramoyl-L-alanine Amidase Driving the 'Suicidal Tendencies' of Streptococcus pneumoniae—A Review. Microorganisms. 2025 Mar 14;13(4). doi:10.3390/microorganisms13040827
108. Weiser JN, Ferreira DM, Paton JC. Streptococcus pneumoniae: transmission, colonization and invasion. Nat Rev Microbiol. 2018 Jun;16(6):355–67. doi:10.1038/s41579-018-0001-8
109. Chan JM, Ramos-Sevillano E, Betts M, Wilson HU, Weight CM, Houhou-Ousalah A, et al. Bacterial surface lipoproteins mediate epithelial microinvasion by *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun. 2024 May 7;92(5). doi:10.1128/iai.00447-23
110. Opavski N, Jovicevic M, Kabic J, Kekic D, Vasiljevic Z, Tosic T, et al. Serotype distribution, antimicrobial susceptibility and molecular epidemiology of invasive Streptococcus pneumoniae in the nine-year period in Serbia. Front Microbiol. 2023 Aug 21;14. doi:10.3389/fmicb.2023.1244366
111. Cilloniz C, Torres A. Diabetes Mellitus and Pneumococcal Pneumonia. Diagnostics. 2024 Apr 22;14(8):859. doi:10.3390/diagnostics14080859

112. Sender V, Hentrich K, Henriques-Normark B. Virus-Induced Changes of the Respiratory Tract Environment Promote Secondary Infections With Streptococcus pneumoniae. Front Cell Infect Microbiol. 2021 Mar 22;11. doi:10.3389/fcimb.2021.643326
113. Bergenfelz C, Hakansson AP. Streptococcus pneumoniae Otitis Media Pathogenesis and How It Informs Our Understanding of Vaccine Strategies. Curr Otorhinolaryngol Rep. 2017 Jun;5(2):115–24. doi:10.1007/s40136-017-0152-6
114. Ricci Conesa H, Skröder H, Norton N, Bencina G, Tsoumani E. Clinical and economic burden of acute otitis media caused by Streptococcus pneumoniae in European children, after widespread use of PCVs–A systematic literature review of published evidence. PLOS ONE. 2024 Apr 2;19(4):e0297098. doi:10.1371/journal.pone.0297098
115. Wilcox J, Lobo D, Anderson S. Sinusitis. Prim Care Clin Off Pract. 2025 Mar;52(1):87–97. doi:10.1016/j.pop.2024.09.010
116. Beatrice SAC, Luiza BP, Bogdan P, Simona BG, Mihnea CC, Ionela CA, et al. Antimicrobial therapy in complicated rhinosinusitis. Front Microbiol. 2022 Aug 22;13. doi:10.3389/fmicb.2022.960319
117. Ghia CJ, Dhar R, Koul PA, Rambhad G, Fletcher MA. *Streptococcus pneumoniae* as a Cause of Community-Acquired Pneumonia in Indian Adolescents and Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med. 2019 Jan;13. doi:10.1177/1179548419862790
118. Anderson R, Feldman C. The Role of Streptococcus pneumoniae in Community-Acquired Pneumonia. Semin Respir Crit Care Med. 2016 Dec 13;37(06):806–18. doi:10.1055/s-0036-1592074
119. Crotty M, Devall H, Cook N, Fischer F, Alexander J, Hunter L, et al. Short Versus Long Antibiotic Duration in *Streptococcus pneumoniae* Bacteremia. Open Forum Infect Dis. 2024 Aug 30;11(9):ofae478. doi:10.1093/ofid/ofae478
120. Wu S, Chen L, Zhang X, Fan J, Tang F, Xiao D. Prevalence and risk factors for bacteremia in community-acquired pneumonia: A systematic review and meta-analysis. Int J Infect Dis. 2025 Feb;151:107312. doi:10.1016/j.ijid.2024.107312
121. De Leau MM, Kuipers RS. Cardiovascular complications of *Streptococcus pneumoniae* bacteraemia. BMJ Case Rep. 2021 Apr;14(4):e240341. doi:10.1136/bcr-2020-240341
122. Gil E, Wall E, Noursadeghi M, Brown JS. Streptococcus pneumoniae meningitis and the CNS barriers. Front Cell Infect Microbiol. 2023 Jan 4;12:1106596. doi:10.3389/fcimb.2022.1106596
123. Wang B, Lin W, Qian C, Zhang Y, Zhao G, Wang W, et al. Disease Burden of Meningitis Caused by Streptococcus pneumoniae Among Under-Fives in

China: A Systematic Review and Meta-analysis. Infect Dis Ther. 2023 Nov;12(11):2567–80. doi:10.1007/s40121-023-00878-y
124. Xu Y, Wang J, Qin X, Liu J. Advances in the pathogenesis and treatment of pneumococcal meningitis. Virulence. 2024 Dec 31;15(1):2387180. doi:10.1080/21505594.2024.2387180
125. González-Díaz A, Càmara J, Ercibengoa M, Cercenado E, Larrosa N, Quesada MD, et al. Emerging non-13-valent pneumococcal conjugate vaccine (PCV13) serotypes causing adult invasive pneumococcal disease in the late-PCV13 period in Spain. Clin Microbiol Infect. 2020 Jun;26(6):753–9. doi:10.1016/j.cmi.2019.10.034
126. Henriet SSV, Langereis JD, Lo SW, Bentley S, Mesman RJ, Fejzic Z, et al. Endocarditis Caused by Nontypeable *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis. 2022 Sep 10;75(4):719–22. doi:10.1093/cid/ciac079
127. Yamazaki K, Miura T, Sunohara D, Komatsu T, Mochidome T, Kasai T, et al. Infective endocarditis caused by Streptococcus pneumoniae from sinusitis: A case report. J Cardiol Cases. 2022 May;25(5):279–81. doi:10.1016/j.jccase.2021.11.003
128. Kim T, Hong SI, Park SY, Jung J, Chong YP, Kim SH, et al. Clinical Features and Outcomes of Spontaneous Bacterial Peritonitis Caused by Streptococcus pneumoniae: A Matched Case-Control Study. Medicine (Baltimore). 2016 May;95(22):e3796. doi:10.1097/MD.0000000000003796
129. Hyams C, Amin-Chowdhury Z, Fry NK, North P, Finn A, Judge A, et al. *Streptococcus Pneumoniae* septic arthritis in adults in Bristol and Bath, United Kingdom, 2006–2018: a 13-year retrospective observational cohort study. Emerg Microbes Infect. 2021 Jan;10(1):1369–77. doi:10.1080/22221751.2021.1945955
130. Ligero J, Gómez MC. Pneumococcal septic arthritis in a patient with mixed connective tissue disease. Rev Esp Quimioter. 2020 Apr 15;33(3):221–2. doi:10.37201/req/004.2020
131. Golos M, Eliakim-Raz N, Stern A, Leibovici L, Paul M. Conjugated pneumococcal vaccine versus polysaccharide pneumococcal vaccine for prevention of pneumonia and invasive pneumococcal disease in immunocompetent and immunocompromised adults and children. Cochrane Database Syst Rev. 2019 Feb 20. doi:10.1002/14651858.cd012306.pub2
132. Subdirecció General de Vigilància i Resposta a Emergències de Salut Pública. Epidemiologia de la malaltia pneumocòccica invasiva a Catalunya. Informe 2019-2020. Agència de Salut Pública de Catalunya (ASPCAT) [Internet]. 2022 [cited 2025 Jul 22]. Available from: https://salutpublica.gencat.cat/ca/detalls/Article/malaltia-pneumococcica-invasiva-00001
133. Subdirecció General de Promoció de la Salut. Recomanacions de la vacunació sistemàtica antipneumocòccica conjugada 20-valent a Catalunya

[Internet]. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Departament de Salut; 2023 May [cited 2026 Mar 26]. (Programa de vacunacions de Catalunya). Report No. Available from: https://salutpublica.gencat.cat/web/.content/minisite/aspcat/promocio_salut/vacunacions/02protocols_i_recomanacions/1358_PREVENTIVA_Recomanacions-de-la-vacunacio-sistematica-antipneumococcia-conjugada-20-valent-a-Catalunya-nov-2022.pdf

134. Huang C, Moradi S, Sholeh M, Tabaei FM, Lai T, Tan B, et al. Global trends in antimicrobial resistance of Enterococcus faecium: a systematic review and meta-analysis of clinical isolates. Front Pharmacol. 2025 Apr 7;16:1505674. doi:10.3389/fphar.2025.1505674
135. Wei Y, Palacios Araya D, Palmer KL. Enterococcus faecium: evolution, adaptation, pathogenesis and emerging therapeutics. Nat Rev Microbiol. 2024 Nov;22(11):705–21. doi:10.1038/s41579-024-01058-6
136. Gao W, Howden BP, Stinear TP. Evolution of virulence in Enterococcus faecium, a hospital-adapted opportunistic pathogen. Curr Opin Microbiol. 2018 Feb;41:76–82. doi:10.1016/j.mib.2017.11.030
137. Thiercelin ME. Morphologie et modes de reproduction de l'enterocoque. Comptes Rendus Séances Société Biol Ses Fil. 1899;11:551–3.
138. Lee T, Pang S, Abraham S, Coombs GW. Antimicrobial-resistant CC17 Enterococcus faecium: The past, the present and the future. J Glob Antimicrob Resist. 2019 Mar;16:36–47. doi:10.1016/j.jgar.2018.08.016
139. Lebreton F, Willems RJL, Gilmore MS. Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. In: Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, editors. Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary; 2014 [cited 2025 Jul 29]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/ PubMed PMID: 24649513.
140. Andrewes FW, Horder TJ. A STUDY OF THE STREPTOCOCCI PATHOGENIC FOR MAN. The Lancet. 1906 Sep;168(4333):708–13. doi:10.1016/S0140-6736(01)31538-6
141. Orla-Jensen S. The Lactic Acid Bacteria. A.F. Host; 1919. 246 p.
142. Sherman JM, Wing HU. An Unnoted Hemolytic Streptococcus Associated with Milk Products. J Dairy Sci. 1935 Oct;18(10):657–60. doi:10.3168/jds.S0022-0302(35)93187-3
143. Kalina AP. The position of enterococci in the system of microorganisms. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1970 Jun;47(6):20–1. PubMed PMID: 4992950.
144. Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the Genus Enterococcus norn. rev. as Enterococcus faecalis comb. nov. and Enterococcus faecium comb. nov.

145. Schwartzman JA, Lebreton F, Salamzade R, Shea T, Martin MJ, Schaufler K, et al. Global diversity of enterococci and description of 18 previously unknown species. Proc Natl Acad Sci. 2024 Mar 5;121(10):e2310852121. doi:10.1073/pnas.2310852121
146. National Center for Biotechnology Information. NCBI Taxonomy database [Internet]. Bethesda, MD: U.S. National Library of Medicine; [cited 2025 Jul 29]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy
147. Facklam RR. Comparison of Several Laboratory Media for Presumptive Identification of Enterococci and Group D Streptococci. Appl Microbiol. 1973 Aug;26(2):138–45. doi:10.1128/am.26.2.138-145.1973
148. National Center for Biotechnology Information (NCBI). NCBI Genome Database [Internet]. 2025 [cited 2025 Jul 30]. Enterococcus faecium strain 1,231,408, complete genome. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_009734005.1/
149. Tanabe M, Natori T, Horiuchi K, Denda T, Koide S, Nagano Y, et al. Novel genomic island carrying a new vanD allele in a vancomycin-resistant Enterococcus faecium clinical isolate belonging to clade A1 in Japan. J Glob Antimicrob Resist. 2023 Sep;34:211–3. doi:10.1016/j.jgar.2023.07.019
150. Van Hal SJ, Willems RJL, Gouliouris T, Ballard SA, Coque TM, Hammerum AM, et al. The interplay between community and hospital Enterococcus faecium clones within health-care settings: a genomic analysis. Lancet Microbe. 2022 Feb;3(2):e133–41. doi:10.1016/S2666-5247(21)00236-6
151. Homan WL, Tribe D, Poznanski S, Li M, Hogg G, Spalburg E, et al. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. J Clin Microbiol. 2002 Jun;40(6):1963–71. doi:10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002
152. PubMLST. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity [Internet]. PubMLST; 2025 [cited 2025 Jul 30]. Enterococcus faecium. Available from: https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium
153. Bezdicek M, Hanslikova J, Nykrynova M, Dufkova K, Kocmanova I, Kubackova P, et al. New Multilocus Sequence Typing Scheme for Enterococcus faecium Based on Whole Genome Sequencing Data. Microbiol Spectr. 2023 Aug 17;11(4):e05107-22. doi:10.1128/spectrum.05107-22
154. Aung MS, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ohashi N, Hirose M, Kudo K, et al. Antimicrobial Resistance, Virulence Factors, and Genotypes of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Clinical Isolates in Northern Japan: Identification of optrA in ST480 E. faecalis. Antibiotics. 2023 Jan 6;12(1):108. doi:10.3390/antibiotics12010108
155. Georges M, Odoyo E, Matano D, Tiria F, Kyany'a C, Mbwika D, et al. Determination of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Antimicrobial Resistance and Virulence Factors and Their Association with

Clinical and Demographic Factors in Kenya. J Pathog. 2022 Nov 9;2022:1–9. doi:10.1155/2022/3129439
156. Hendrickx APA, Bonten MJM, Van Luit-Asbroek M, Schapendonk CME, Kragten AHM, Willems RJL. Expression of two distinct types of pili by a hospital-acquired Enterococcus faecium isolate. Microbiology. 2008 Oct 1;154(10):3212–23. doi:10.1099/mic.0.2008/020891-0
157. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. Nat Rev Microbiol. 2012 Apr;10(4):266–78. doi:10.1038/nrmicro2761
158. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in Enterococcus Faecium. N Engl J Med. 1988 Jul 21;319(3):157–61. doi:10.1056/NEJM198807213190307
159. Werner G, Neumann B, Weber RE, Kresken M, Wendt C, Bender JK, et al. Thirty years of VRE in Germany – "expect the unexpected": The view from the National Reference Centre for Staphylococci and Enterococci. Drug Resist Updat. 2020 Dec;53:100732. doi:10.1016/j.drup.2020.100732
160. Zhou X, Willems RJL, Friedrich AW, Rossen JWA, Bathoorn E. Enterococcus faecium: from microbiological insights to practical recommendations for infection control and diagnostics. Antimicrob Resist Infect Control. 2020 Dec;9(1):130. doi:10.1186/s13756-020-00770-1
161. O'Toole RF, Leong KWC, Cumming V, Van Hal SJ. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium and the emergence of new sequence types associated with hospital infection. Res Microbiol. 2023 May;174(4):104046. doi:10.1016/j.resmic.2023.104046
162. Patel S, Preuss CV, Bernice F. Vancomycin. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Aug 1]. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/ PubMed PMID: 29083794.
163. Aqib AI, Alsayeqh AF. Vancomycin drug resistance, an emerging threat to animal and public health. Front Vet Sci. 2022 Oct 28;9:1010728. doi:10.3389/fvets.2022.1010728
164. Brajerova M, Nyc O, Drevinek P, Krutova M. Genomic insights into the spread of vancomycin- and tigecycline-resistant Enterococcus faecium ST117. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2025 Jun 11;24(1):36. doi:10.1186/s12941-025-00806-7
165. Hammerum AM, Karstensen KT, Roer L, Kaya H, Lindegaard M, Porsbo LJ, et al. Surveillance of vancomycin-resistant enterococci reveals shift in dominating clusters from vanA to vanB Enterococcus faecium clusters, Denmark, 2015 to 2022. Eurosurveillance. 2024 Jun 6;29(23). doi:10.2807/1560-7917.ES.2024.29.23.2300633
166. Mullally CA, Fahriani M, Mowlaboccus S, Coombs GW. Non- *faecium* non- *faecalis* enterococci: a review of clinical manifestations, virulence

factors, and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2024 Jun 13;37(2):e00121-23. doi:10.1128/cmr.00121-23
167. Murray BE. Vancomycin-Resistant Enterococcal Infections. Wood AJJ, editor. N Engl J Med. 2000 Mar 9;342(10):710–21. doi:10.1056/NEJM200003093421007
168. Van Groesen E, Innocenti P, Martin NI. Recent Advances in the Development of Semisynthetic Glycopeptide Antibiotics: 2014–2022. ACS Infect Dis. 2022 Aug 12;8(8):1381–407. doi:10.1021/acsinfecdis.2c00253
169. Beh JQ, Daniel DS, Judd LM, Wick RR, Kelley P, Cronin KM, et al. Genomics to understand the global landscape of linezolid resistance in Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. Microb Genomics. 2025 Jun 18;11(6). doi:10.1099/mgen.0.001432
170. Radford-Smith DE, Anthony DC. Vancomycin-Resistant E. faecium: Addressing Global and Clinical Challenges. Antibiotics. 2025 May 19;14(5):522. doi:10.3390/antibiotics14050522
171. Pontali E, Baiardi G, Del Puente F, Mattioli F. Long-Acting Antibiotics: New Opportunities Beyond Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections (ABSSSIs)! Antibiotics. 2025 Feb 7;14(2):164. doi:10.3390/antibiotics14020164
172. Almeida-Santos AC, Novais C, Peixe L, Freitas AR. Vancomycin-resistant Enterococcus faecium: A current perspective on resilience, adaptation, and the urgent need for novel strategies. J Glob Antimicrob Resist. 2025 Mar;41:233–52. doi:10.1016/j.jgar.2025.01.016
173. Goodman-Meza D, Weiss RE, Poimboeuf ML, Feng J, Vijayan T, Martinello M, et al. Comparative Effectiveness of Long-Acting Lipoglycopeptides vs Standard-of-Care Antibiotics in Serious Bacterial Infections. JAMA Netw Open. 2025 May 21;8(5):e2511641. doi:10.1001/jamanetworkopen.2025.11641
174. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant Enterococci (VRE) Basics [Internet]. [cited 2025 Aug 4]. Available from: https://www.cdc.gov/vre/about/index.html
175. Huang G, Zhou Y, Cheng H, Lv T, Zheng L, Li C, et al. Genome and transcriptome analysis of Enterococcus faecium from intestinal colonization and Enterococcus faecium from urinary tract infection. Front Microbiol. 2023 Oct 31;14:1273949. doi:10.3389/fmicb.2023.1273949
176. Codelia-Anjum A, Lerner LB, Elterman D, Zorn KC, Bhojani N, Chughtai B. Enterococcal Urinary Tract Infections: A Review of the Pathogenicity, Epidemiology, and Treatment. Antibiotics. 2023 Apr 19;12(4):778. doi:10.3390/antibiotics12040778
177. Said MS, Tirthani E, Lesho E. Enterococcus Infections. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 [cited 2025 Aug 5].

Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567759/ PubMed PMID: 33620836.
178. Giannakopoulos X, Sakkas H, Ragos V, Tsiambas E, Bozidis P, M Evangelou A, et al. Impact of enterococcal urinary tract infections in immunocompromised - neoplastic patients. J BUON Off J Balk Union Oncol. 2019;24(5):1768–75. PubMed PMID: 31786836.
179. Gaston JR, Andersen MJ, Johnson AO, Bair KL, Sullivan CM, Guterman LB, et al. Enterococcus faecalis Polymicrobial Interactions Facilitate Biofilm Formation, Antibiotic Recalcitrance, and Persistent Colonization of the Catheterized Urinary Tract. Pathogens. 2020 Oct 13;9(10):835. doi:10.3390/pathogens9100835
180. Morvan AC, Mourvillier B, Garrouste-Orgeas M, Ruckly S, Forel JM, Argaud L, et al. Impact of species and antibiotic therapy of enterococcal peritonitis on 30-day mortality in critical care—an analysis of the OUTCOMEREA database. Crit Care. 2019 Dec;23(1):307. doi:10.1186/s13054-019-2581-8
181. Marcus G, Levy S, Salhab G, Mengesha B, Tzuman O, Shur S, et al. Intra-abdominal Infections: The Role of Anaerobes, Enterococci, Fungi, and Multidrug-Resistant Organisms. Open Forum Infect Dis. 2016 Oct 1;3(4):ofw232. doi:10.1093/ofid/ofw232
182. Mussa M, Martínez Pérez-Crespo PM, Lopez-Cortes LE, Retamar-Gentil P, Sousa-Dominguez A, Goikoetxea-Aguirre AJ, et al. Risk Factors and Predictive Score for Bacteremic Biliary Tract Infections Due to Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium: a Multicenter Cohort Study from the PROBAC Project. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e00051-22. doi:10.1128/spectrum.00051-22
183. Abaziou T, Vardon-Bounes F, Conil JM, Rouget A, Ruiz S, Grare M, et al. Outcome of community- versus hospital-acquired intra-abdominal infections in intensive care unit: a retrospective study. BMC Anesthesiol. 2020 Dec;20(1):295. doi:10.1186/s12871-020-01209-1
184. Dupont H, Friggeri A, Touzeau J, Airapetian N, Tinturier F, Lobjoie E, et al. Enterococci increase the morbidity and mortality associated with severe intra-abdominal infections in elderly patients hospitalized in the intensive care unit. J Antimicrob Chemother. 2011 Oct 1;66(10):2379–85. doi:10.1093/jac/dkr308
185. Scharloo F, Cogliati Dezza F, López-Hernández I, Martínez Pérez-Crespo PM, Goikoetxea Aguirre AJ, Pérez-Rodríguez MT, et al. Clinical characteristics, predisposing factors and outcomes for Enterococcus faecalis versus Enterococcus faecium bloodstream infections: a prospective multicentre cohort study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2024 Oct;43(10):2011–22. doi:10.1007/s10096-024-04917-5

186. Lupia T, Roberto G, Scaglione L, Shbaklo N, De Benedetto I, Scabini S, et al. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections caused by Enterococcus spp. within internal medicine wards: a two-year single-centre experience. Intern Emerg Med. 2022 Jun;17(4):1129–37. doi:10.1007/s11739-022-02926-w
187. Mendes RE, Sader HS, Castanheira M, Flamm RK. Distribution of main Gram-positive pathogens causing bloodstream infections in United States and European hospitals during the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2010–2016): concomitant analysis of oritavancin *in vitro* activity. J Chemother. 2018 Jul 4;30(5):280–9. doi:10.1080/1120009X.2018.1516272
188. Bager P, Kähler J, Andersson M, Holzknecht BJ, Kjær Hansen SG, Schønning K, et al. Comparison of morbidity and mortality after bloodstream infection with vancomycin-resistant versus -susceptible *Enterococcus faecium: a* nationwide cohort study in Denmark, 2010–2019. Emerg Microbes Infect. 2024 Dec 31;13(1):2309969. doi:10.1080/22221751.2024.2309969
189. Wagner L, Wurst M, Erber J, Bachfischer T, Haller B, Gleich S, et al. Risk factors for vancomycin resistance in patients with *Enterococcus faecium* bloodstream infections: an analysis of the Munich Multicentric Enterococci Cohort. Microbiol Spectr. 2025 Jul;13(7):e00052-25. doi:10.1128/spectrum.00052-25
190. Royo-Cebrecos C, Gudiol C, García J, Tubau F, Laporte J, Ardanuy C, et al. Characteristics, aetiology, antimicrobial resistance and outcomes of bacteraemic cholangitis in patients with solid tumours: A prospective cohort study. J Infect. 2017 Feb;74(2):172–8. doi:10.1016/j.jinf.2016.10.008
191. Fernández-Hidalgo N, Escolà-Vergé L. Enterococcus faecalis Bacteremia. J Am Coll Cardiol. 2019 Jul;74(2):202–4. doi:10.1016/j.jacc.2019.03.526
192. Garofoli N, Joly V, Le Pluart D, Hobson CA, Beaumont AL, Lariven S, et al. Enterococcal endocarditis management and relapses. JAC-Antimicrob Resist. 2024 Mar 5;6(2):dlae033. doi:10.1093/jacamr/dlae033
193. Hidalgo-Tenorio C, Sadyrbaeva-Dolgova S, Aparicio-Minguijón E, Alarcón A, Plata A, Martínez Marcos FJ, et al. Real-world evidence of dalbavancin effectiveness as consolidation therapy in infective endocarditis due to Enterococcus spp. J Microbiol Immunol Infect. 2025 Aug;58(4):429–36. doi:10.1016/j.jmii.2025.03.001
194. Hota S, Patil SR, Mane PM. Enterococcus: Understanding Their Resistance Mechanisms, Therapeutic Challenges, and Emerging Threats. Cureus. 2025 Feb 25. doi:10.7759/cureus.79628
195. World Health Organization. The burden of health care-associated infection worldwide [Internet]. 2010 [cited 2025 Aug 6]. Available from: https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-burden-of-health-care-associated-infection-worldwide

196. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care–associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. Am J Infect Control. 2008 Jun;36(5):309–32. doi:10.1016/j.ajic.2008.03.002
197. Raoofi S, Pashazadeh Kan F, Rafiei S, Hosseinipalangi Z, Noorani Mejareh Z, Khani S, et al. Global prevalence of nosocomial infection: A systematic review and meta-analysis. PLOS ONE. 2023 Jan 27;18(1):e0274248. doi:10.1371/journal.pone.0274248
198. Friedman ND, Levit D, Taleb E, Marcus G, Michaeli L, Broide M, et al. Towards a Definition for Health Care–Associated Infection. Open Forum Infect Dis. 2018 Jun 1;5(6):ofy116. doi:10.1093/ofid/ofy116
199. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Ann Intern Med. 2002 Nov 19;137(10):791–7. doi:10.7326/0003-4819-137-10-200211190-00007 PubMed PMID: 12435215.
200. Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Infecciones Relacionadas con la Asistencia Sanitaria [Internet]. [cited 2025 Aug 7]. Available from: https://cne.isciii.es/servicios/enfermedades-transmisibles/enfermedades-a-z/iras-infecciones_relacionadas_con_la_asistencia_sanitaria
201. Aiesh BM, Qashou R, Shemmessian G, Swaileh MW, Abutaha SA, Sabateen A, et al. Nosocomial infections in the surgical intensive care unit: an observational retrospective study from a large tertiary hospital in Palestine. BMC Infect Dis. 2023 Oct 13;23(1):686. doi:10.1186/s12879-023-08677-z
202. Taye ZW, Abebil YA, Akalu TY, Tessema GM, Taye EB. Incidence and determinants of nosocomial infection among hospital admitted adult chronic disease patients in University of Gondar Comprehensive Specialized Hospital, North–West Ethiopia, 2016–2020. Front Public Health. 2023 Feb 24;11:1087407. doi:10.3389/fpubh.2023.1087407
203. World Health Organization. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide. Geneva; 2011.
204. World Health Organization. Global report on infection prevention and control 2024 [Internet]. Geneva; 2024 [cited 2026 Mar 5]. Report No. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/9789240103986
205. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Gobierno de España. Revisión sistemática de eventos adversos y costes de la no seguridad. Las infecciones asociadas a la atención sanitaria [Internet]. 2015 [cited 2025 Aug 7]. Report No. Available from: https://www.who.int/es/news/item/06-05-2022-who-launches-first-ever-global-report-on-infection-prevention-and-control

206. ESTUDIO EPINE-EPPS nº 34: 2024. Prevalencia de infecciones (relacionadas con la asistencia sanitaria y comunitarias) y uso de antimicrobianos en hospitales de agudos [Internet]. Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro - Segovia de Arana; 2024 [cited 2025 Aug 7]. (ESTUDIO EPINE-EPPS). Report No.: 1.0. Available from: https://epine.es/api/documento-publico/2024%20EPINE%20Informe%20Espa%C3%B1a.pdf/reports-esp
207. World Health Organization. Infection prevention and control [Internet]. 2012 [cited 2025 Aug 6]. Available from: https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-burden-of-health-care-associated-infection-worldwide
208. Jenkins DR. Nosocomial infections and infection control. Medicine (Baltimore). 2017 Oct;45(10):629–33. doi:10.1016/j.mpmed.2017.07.005
209. Rangelova V, Kevorkyan A, Raycheva R, Krasteva M. Ventilator-Associated Pneumonia in the Neonatal Intensive Care Unit—Incidence and Strategies for Prevention. Diagnostics. 2024 Jan 23;14(3):240. doi:10.3390/diagnostics14030240
210. Shen L, Fu T, Huang L, Sun H, Wang Y, Sun L, et al. 7295 elderly hospitalized patients with catheter-associated urinary tract infection: a case-control study. BMC Infect Dis. 2023 Nov 24;23(1):825. doi:10.1186/s12879-023-08711-0
211. Isigi SS, Parsa AD, Alasqah I, Mahmud I, Kabir R. Predisposing Factors of Nosocomial Infections in Hospitalized Patients in the United Kingdom: Systematic Review. JMIR Public Health Surveill. 2023 Dec 19;9:e43743. doi:10.2196/43743
212. Liu X, Long Y, Greenhalgh C, Steeg S, Wilkinson J, Li H, et al. A systematic review and meta-analysis of risk factors associated with healthcare-associated infections among hospitalized patients in Chinese general hospitals from 2001 to2022. J Hosp Infect. 2023 May;135:37–49. doi:10.1016/j.jhin.2023.02.013
213. Buetti N, Marschall J, Drees M, Fakih MG, Hadaway L, Maragakis LL, et al. Strategies to prevent central line-associated bloodstream infections in acute-care hospitals: 2022 Update. Infect Control Hosp Epidemiol. 2022 May;43(5):553–69. doi:10.1017/ice.2022.87
214. European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. ECDC. Stockholm: ECDC; 2024 Mar. Report No. doi:10.2900/037665
215. Abban MK, Ayerakwa EA, Mosi L, Isawumi A. The burden of hospital acquired infections and antimicrobial resistance. Heliyon. 2023 Oct;9(10):e20561. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e20561
216. European Centre for Disease Prevention and Control. Each year, 4.3 million patients in hospitals in the EU/EEA are affected by healthcare-

associated infections [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 8]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/each-year-43-million-patients-hospitals-eueea-are-affected-healthcare-associated
217. De Kraker MEA, Tartari E, Tomczyk S, Twyman A, Francioli LC, Cassini A, et al. Implementation of hand hygiene in health-care facilities: results from the WHO Hand Hygiene Self-Assessment Framework global survey 2019. Lancet Infect Dis. 2022 Jun;22(6):835–44. doi:10.1016/S1473-3099(21)00618-6
218. World Health Organization. Infection prevention and control [Internet]. [cited 2025 Aug 9]. Hand hygiene. Available from: https://www.who.int/teams/integrated-health-services/infection-prevention-control/hand-hygiene
219. Peters A, Močenić M, Spitilli A, Bloomfield S, Bhutta MF. Quick and dirty: improper glove use increases infection risk and has global consequences. Antimicrob Resist Infect Control. 2025 May 15;14(1):52, s13756-025-01563–0. doi:10.1186/s13756-025-01563-0
220. Garvey M. Medical Device-Associated Healthcare Infections: Sterilization and the Potential of Novel Biological Approaches to Ensure Patient Safety. Int J Mol Sci. 2023 Dec 22;25(1):201. doi:10.3390/ijms25010201
221. Josephs-Spaulding J, Singh OV. Medical Device Sterilization and Reprocessing in the Era of Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria: Issues and Regulatory Concepts. Front Med Technol. 2021 Feb 10;2:587352. doi:10.3389/fmedt.2020.587352
222. Ssekitoleko RT, Oshabaheebwa S, Munabi IG, Tusabe MS, Namayega C, Ngabirano BA, et al. The role of medical equipment in the spread of nosocomial infections: a cross-sectional study in four tertiary public health facilities in Uganda. BMC Public Health. 2020 Dec;20(1):1561. doi:10.1186/s12889-020-09662-w
223. Huang H, Huang L, Yan S, Wang C, Wu T, Chen D, et al. A bundle-based approach on catheter-associated urinary tract infection: a multi-center study in Chinese tertiary hospitals. BMC Infect Dis. 2025 Feb 21;25(1):248. doi:10.1186/s12879-025-10638-7
224. Odada D, Munyi H, Gatuiku J, Thuku R, Nyandigisi J, Wangui A, et al. Reducing the rate of central line-associated bloodstream infections; a quality improvement project. BMC Infect Dis. 2023 Oct 30;23(1):745. doi:10.1186/s12879-023-08744-5
225. Rosenthal VD, Memish ZA, Bearman G. Preventing ventilator-associated pneumonia: A position paper of the International Society for Infectious Diseases, 2024 update. Int J Infect Dis. 2025 Feb;151:107305. doi:10.1016/j.ijid.2024.107305

226. Cunha T, Miguel S, Maciel J, Zagalo C, Alves P. Surgical site infection prevention care bundles in colorectal surgery: a scoping review. J Hosp Infect. 2025 Jan;155:221–30. doi:10.1016/j.jhin.2024.10.010
227. Centers for Disease Control and Prevention. Multidrug-resistant Organisms (MDRO) Management Guidelines [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 10]. Summary of Recommendations. Management of Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings. Available from: https://www.cdc.gov/infection-control/hcp/mdro-management/summary-recommendations.html
228. Gysin DV, Cookson B, Saenz H, Dettenkofer M, Widmer AF, ESCMID Study Group for Nosocomial Infections (ESGNI). Variability in contact precautions to control the nosocomial spread of multi-drug resistant organisms in the endemic setting: a multinational cross-sectional survey. Antimicrob Resist Infect Control. 2018 Jul 9;7(1):81. doi:10.1186/s13756-018-0366-5
229. Tschudin-Sutter S, Lucet JC, Mutters NT, Tacconelli E, Zahar JR, Harbarth S. Contact Precautions for Preventing Nosocomial Transmission of Extended-Spectrum β Lactamase–Producing Escherichia coli: A Point/Counterpoint Review. Clin Infect Dis. 2017 Jul 15;65(2):342–7. doi:10.1093/cid/cix258
230. World Health Organization. Antibiotics most responsible for drug resistance are overused – WHO report [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 10]. Available from: https://www.who.int/news/item/29-04-2025-antibiotics-most-responsible-for-drug-resistance-are-overused---who-report
231. Plan Nacional Resistencia Antibióticos. Plan Nacional Resistencia Antibióticos [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 10]. ¿Quiénes somos? Available from: https://resistenciaantibioticos.es/es/quienes-somos
232. World Health Organization. Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide. 2nd edition. 2002.
233. Badia JM, Calbo E, Besoli A, Casas I, Diaz E, Domenech D, et al. Vigilància de les infeccions relacionades amb l'atenció sanitària de Catalunya (VINCat): manual VINCat [Internet]. Barcelona: Generalitat de Catalunya. Servei Català de la Salut.; 2025 Jun [cited 2025 Aug 11]. Report No. Available from: http://hdl.handle.net/11351/7722.3 doi:10.62727/DSalut.SCS/7722.3
234. Atxaerandio-Landa A, Arrieta-Gisasola A, Laorden L, Bikandi J, Garaizar J, Martinez-Malaxetxebarria I, et al. A Practical Bioinformatics Workflow for Routine Analysis of Bacterial WGS Data. Microorganisms. 2022 Dec;10(12). doi:10.3390/microorganisms10122364
235. Centers for Disease Control and Prevention. Outbreak and Case Definitions [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 11]. Available from: https://www.cdc.gov/urdo/php/surveillance/outbreak-case-definitions.html

236. World Health Organization. Disease outbreaks [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 11]. Available from: http://www.emro.who.int/health-topics/disease-outbreaks/index.html
237. Centers for Disease Control and Prevention. National Outbreak Reporting System (NORS). Guidance document for reporting all enteric foodborne, person-to-person, environmental, animal contact, and unknown/indeterminate mode of transmission outbreaks and for the general sections for reporting waterborne outbreaks. 2014.
238. World Health Organization. Foodborne disease outbreaks: Guidelines for investigation and control. 2008.
239. Getino M, López-Díaz M, Ellaby N, Clark J, Ellington MJ, La Ragione RM. A Broad-Host-Range Plasmid Outbreak: Dynamics of IncL/M Plasmids Transferring Carbapenemase Genes. Antibiotics. 2022 Nov 17;11(11):1641. doi:10.3390/antibiotics11111641
240. European Centre for Disease Prevention and Control. Environmental and microbiological studies [Internet]. [cited 2025 Aug 11]. Sub-typing of isolates. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/healthtopics/food_and_waterborne_disease/toolkit/Documents/tool-07-1-sub-typing.pdf
241. Reintjes R, Zanuzdana A. Outbreak Investigations. Mod Infect Dis Epidemiol. 2009 Jul;Statistics for Biology and Health:159–76. doi:10.1007/978-0-387-93835-6_9
242. World Health Organization. Outbreak Toolkit. Providing the tools to investigate disease outbreaks, collect data and guide response activities [Internet]. [cited 2025 Aug 11]. Stages of an outbreak investigation. Available from: https://www.who.int/emergencies/outbreak-toolkit/investigating-outbreak-of-unknown-disease
243. Centers for Disease Control and Prevention. Field Epidemiology Manual [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 11]. Conducting a Field Investigation. Available from: https://www.cdc.gov/field-epi-manual/php/chapters/field-investigation.html
244. World Health Organization. Outbreak Case Definitions [Internet]. [cited 2025 Aug 11]. Available from: https://www.who.int/docs/default-source/outbreak-toolkit/september-october-2019---update/cdccasedefinitions.pdf?sfvrsn=5d57bdf8_2
245. Huang YC, Tu HC, Kuo HY, Shao PL, Gong YN, Weng HY, et al. Outbreak investigation in a COVID-19 designated hospital: The combination of phylogenetic analysis and field epidemiology study suggesting airborne transmission. J Microbiol Immunol Infect. 2023 Jun;56(3):547–57. doi:10.1016/j.jmii.2023.01.003
246. Centers for Disease Control and Prevention. Infection Control [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 11]. F. Environmental Sampling. Available

from:
https://www.cdc.gov/infection-control/hcp/environmental-control/environmental-sampling.html
247. Wang J, Wang G, Qi C. Evaluation of Nosocomial Infection Management Efficiency Based on the Data Envelopment Analysis Model. Risk Manag Healthc Policy. 2025 Apr;Volume 18:1197–208. doi:10.2147/RMHP.S520382
248. Gianfrancesco MA, Goldstein ND. A narrative review on the validity of electronic health record-based research in epidemiology. BMC Med Res Methodol. 2021 Dec;21(1):234. doi:10.1186/s12874-021-01416-5
249. Poirier B, Haag D, Soares G, Jamieson L. Whose values, what bias, which subjectivity?: The need for reflexivity and positionality in epidemiological health equity scholarship. Aust N Z J Public Health. 2023 Oct;47(5):100079. doi:10.1016/j.anzjph.2023.100079
250. Bauchner H, Ioannidis JPA. The Subjective Interpretation of the Medical Evidence. JAMA Health Forum. 2024 Mar 29;5(3):e240213. doi:10.1001/jamahealthforum.2024.0213
251. Landman F, Jamin C, De Haan A, Witteveen S, Bos J, Van Der Heide HGJ, et al. Genomic surveillance of multidrug-resistant organisms based on long-read sequencing. Genome Med. 2024 Nov 25;16(1):137. doi:10.1186/s13073-024-01412-6
252. European Centre for Disease Prevention and Control. Monitoring the use of whole-genome sequencing in infectious disease surveillance in Europe – 2015–2017. ECDC. Stockholm: ECDC; 2018 Sep. Report No. doi:10.2900/037665
253. Grohs E, Hill-Ricciuti A, Kelly N, Messina M, Green DA, Geng W, et al. *Spa* Typing of *Staphylococcus aureus* in a Neonatal Intensive Care Unit During Routine Surveillance. J Pediatr Infect Dis Soc. 2021 Aug 17;10(7):766–73. doi:10.1093/jpids/piab014
254. Dahyot S, Lebeurre J, Argemi X, François P, Lemée L, Prévost G, et al. Multiple-Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) and Tandem Repeat Sequence Typing (TRST), helpful tools for subtyping Staphylococcus lugdunensis. Sci Rep. 2018 Aug 3;8(1):11669. doi:10.1038/s41598-018-30144-y
255. Castro BBP, Gennari SM, Lorenzi H, Su C. A simple method to generate PCR-RFLP typing profiles from DNA sequences in Toxoplasma gondii. Infect Genet Evol. 2020 Nov;85:104590. doi:10.1016/j.meegid.2020.104590
256. Rivas-García L, Carballo-Amador MA, Flores-López CA. Design of a AFLP-PCR and PCR-RFLP test that identify the majority of discrete typing units of Trypanosoma cruzi. PLOS ONE. 2020 Aug 4;15(8):e0237180. doi:10.1371/journal.pone.0237180

257. Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell. 1984 May;37(1):67–75. doi:10.1016/0092-8674(84)90301-5
258. Sharma-Kuinkel BK, Rude TH, Fowler VG. Pulse Field Gel Electrophoresis. Methods Mol Biol. 2016;1373:117–30. doi:10.1007/7651_2014_191 PubMed PMID: 25682374; PubMed Central PMCID: PMC4582012.
259. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995 Sep;33(9):2233–9. doi:10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995
260. Santana AM, Silva DGD, Maluta RP, Pizauro LJL, Simplício KMDMG, Santana CH, et al. Comparative Analysis Using Pulsed-Field Gel Electrophoresis Highlights a Potential Transmission of Salmonella Between Asymptomatic Buffaloes and Pigs in a Single Farm. Front Vet Sci. 2020 Nov 10;7:552413. doi:10.3389/fvets.2020.552413
261. Davidson College. Pulse-Field Gel Electrophoresis [Internet]. [cited 2025 Aug 12]. Available from: https://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/pulse_field.html
262. Neoh H min, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. Infect Genet Evol. 2019 Oct;74:103935. doi:10.1016/j.meegid.2019.103935
263. Silva J, Gatica R, Aguilar C, Becerra Z, Garza-Ramos U, Velázquez M, et al. Outbreak of infection with extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae in a Mexican hospital. J Clin Microbiol. 2001 Sep;39(9):3193–6. doi:10.1128/JCM.39.9.3193-3196.2001 PubMed PMID: 11526149; PubMed Central PMCID: PMC88317.
264. Chiou CS, Wei HL, Yang LC. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and coagulase gene restriction profile analysis techniques in the molecular typing of Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol. 2000 Jun;38(6):2186–90. doi:10.1128/JCM.38.6.2186-2190.2000 PubMed PMID: 10834974; PubMed Central PMCID: PMC86760.
265. Lu HZ, Weng XH, Li H, Yin YK, Pang MY, Tang YW. *Enterococcus faecium* -Related Outbreak with Molecular Evidence of Transmission from Pigs to Humans. J Clin Microbiol. 2002 Mar;40(3):913–7. doi:10.1128/JCM.40.3.913-917.2002
266. Nutman A, Marchaim D. How to: molecular investigation of a hospital outbreak. Clin Microbiol Infect. 2019 Jun;25(6):688–95. doi:10.1016/j.cmi.2018.09.017
267. Peacock SJ, Silva GDID, Justice A, Cowland A, Moore CE, Winearls CG, et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel

electrophoresis as tools for typing Staphylococcus aureus isolates in a microepidemiological setting. J Clin Microbiol. 2002 Oct;40(10):3764–70. doi:10.1128/JCM.40.10.3764-3770.2002 PubMed PMID: 12354878.
268. Centers for Disease Control and Prevention. PulseNet [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 12]. About PulseNet. Available from: https://www.cdc.gov/pulsenet/hcp/about/index.html
269. Khakabimamaghani S, Najafi A, Ranjbar R, Raam M. GelClust: A software tool for gel electrophoresis images analysis and dendrogram generation. Comput Methods Programs Biomed. 2013 Aug;111(2):512–8. doi:10.1016/j.cmpb.2013.04.013
270. Timsit S, Armand-Lefèvre L, Le Goff J, Salmona M. The clinical and epidemiological impacts of whole genomic sequencing on bacterial and virological agents. Infect Dis Now. 2024 Mar;54(2):104844. doi:10.1016/j.idnow.2023.104844
271. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc Natl Acad Sci. 1998 Mar 17;95(6):3140–5. doi:10.1073/pnas.95.6.3140
272. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. J Clin Microbiol. 2012 Apr;50(4):1355–61. doi:10.1128/JCM.06094-11
273. Pérez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, Crandall KA. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. Infect Genet Evol. 2013 Jun;16:38–53. doi:10.1016/j.meegid.2013.01.009
274. Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 2018;3. doi:10.12688/wellcomeopenres.14826.1
275. Kirchberger PC, Orata FD, Barlow EJ, Kauffman KM, Case RJ, Polz MF, et al. A Small Number of Phylogenetically Distinct Clonal Complexes Dominate a Coastal Vibrio cholerae Population. Appl Environ Microbiol. 2016 Sep 15;82(18):5576–86. doi:10.1128/AEM.01177-16
276. Public databases for molecular typing and microbial genome diversity [Internet]. [cited 2025 Jun 27]. Available from: https://pubmlst.org/organisms
277. Carla López Causapé, Fernando González Candelas, Maria Tomás Carmona, Antonio Oliver Palomo. Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. Emilia Cercenado Mansilla, Rafael Cantón Moreno, editors. Soc Esp Enfermedades Infecc Microbiol Clínica SEIMC. 2021.
278. Doll M, Bryson AL, Palmore TN. Whole Genome Sequencing Applications in Hospital Epidemiology and Infection Prevention. Curr Infect Dis Rep. 2024 Apr;26(4):115–21. doi:10.1007/s11908-024-00836-w

279. Jamin C, De Koster S, Van Koeveringe S, De Coninck D, Mensaert K, De Bruyne K, et al. Harmonization of whole-genome sequencing for outbreak surveillance of Enterobacteriaceae and Enterococci. Microb Genomics. 2021 Jul 28;7(7). doi:10.1099/mgen.0.000567
280. Centers for Disease Control and Prevention. Advanced Molecular Detection [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 13]. Detecting Outbreaks with Whole Genome Sequencing. Available from: https://www.cdc.gov/advanced-molecular-detection/about/detecting-outbreaks.html
281. Parcell BJ, Gillespie SH, Pettigrew KA, Holden MTG. Clinical perspectives in integrating whole-genome sequencing into the investigation of healthcare and public health outbreaks – hype or help? J Hosp Infect. 2021 Mar;109:1–9. doi:10.1016/j.jhin.2020.11.001
282. Aanensen DM, Feil EJ, Holden MTG, Dordel J, Yeats CA, Fedosejev A, et al. Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive Staphylococcus aureus in Europe. mBio. 2016 Jul 6;7(3):e00444-16. doi:10.1128/mBio.00444-16
283. Bogaty C, Mataseje L, Gray A, Lefebvre B, Lévesque S, Mulvey M, et al. Investigation of a Carbapenemase-producing Acinetobacter baumannii outbreak using whole genome sequencing versus a standard epidemiologic investigation. Antimicrob Resist Infect Control. 2018 Nov 21;7(1):140. doi:10.1186/s13756-018-0437-7
284. Gilchrist CA, Turner SD, Riley MF, Petri WA, Hewlett EL. Whole-Genome Sequencing in Outbreak Analysis. Clin Microbiol Rev. 2015 Jul;28(3):541–63. doi:10.1128/CMR.00075-13
285. Silvotti MG, Scaltriti E, Bolzoni L, Zerbi B, Tocci G, Zappavigna A, et al. Outbreak of carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae in a neurorehabilitation unit: Genomic epidemiology reveals complex transmission pattern in a tertiary care hospital. J Glob Antimicrob Resist. 2025 Mar;41:195–201. doi:10.1016/j.jgar.2025.01.001
286. Greif G, Coithino C, Bentancor MN, Robello C. Mycobacterium tuberculosis evolution from monoresistance to pre-extensive drug resistance during a prolonged household outbreak. J Clin Tuberc Mycobact Dis. 2024 Dec;37:100482. doi:10.1016/j.jctube.2024.100482
287. Sundermann AJ, Babiker A, Marsh JW, Shutt KA, Mustapha MM, Pasculle AW, et al. Outbreak of Vancomycin-resistant Enterococcus faecium in Interventional Radiology: Detection Through Whole-genome Sequencing-based Surveillance. Clin Infect Dis. 2020 May 23;70(11):2336–43. doi:10.1093/cid/ciz666
288. PacBio. Sequencing 101: The Evolution of DNA Sequencing Tools [Internet]. 2020 Mar 25 [cited 2025 Aug 13]. Available from: https://www.pacb.com/blog/the-evolution-of-dna-sequencing-tools/

289. Biada I, Santacreu MA, González-Recio O, Ibáñez-Escriche N. Comparative analysis of Illumina, PacBio, and nanopore for 16S rRNA gene sequencing of rabbit's gut microbiota. Front Microbiomes. 2025 May 15;4:1587712. doi:10.3389/frmbi.2025.1587712
290. Roberts HE, Lopopolo M, Pagnamenta AT, Sharma E, Parkes D, Lonie L, et al. Short and long-read genome sequencing methodologies for somatic variant detection; genomic analysis of a patient with diffuse large B-cell lymphoma. Sci Rep. 2021 Mar 19;11(1):6408. doi:10.1038/s41598-021-85354-8
291. Cell Projects Ltd. Introducing Long Read Sequencing. Isohelix [Internet]. 2023 [cited 2026 Jan 15]. Available from: https://isohelix.com/resources/technical/introducing-long-read-sequencing/
292. Ridom GmbH. cgMLST.org Nomenclature Server (h25) [Internet]. [cited 2025 Aug 14]. Available from: https://www.cgmlst.org/ncs
293. Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, Goering RV. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene–based approaches. Clin Microbiol Infect. 2018 Apr;24(4):350–4. doi:10.1016/j.cmi.2017.12.016
294. Ridom GmbH. Bruker MBioSeq Ridom Typer - Overview [Internet]. 2025 [cited 2025 Aug 14]. Available from: https://www.ridom.de/ridom-typer/
295. Dabernig-Heinz J, Wagner GE, Prior K, Lipp M, Kienesberger S, Ruppitsch W, et al. Core genome multilocus sequence typing (cgMLST) applicable to the monophyletic *Klebsiella oxytoca* species complex. Diekema DJ, editor. J Clin Microbiol. 2024 Jun 12;62(6):e01725-23. doi:10.1128/jcm.01725-23
296. Fida M, Cunningham SA, Murphy MP, Bonomo RA, Hujer KM, Hujer AM, et al. Core genome MLST and resistome analysis of Klebsiella pneumoniae using a clinically amenable workflow. Diagn Microbiol Infect Dis. 2020 May;97(1):114996. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.114996
297. Gona F, Comandatore F, Battaglia S, Piazza A, Trovato A, Lorenzin G, et al. Comparison of core-genome MLST, coreSNP and PFGE methods for Klebsiella pneumoniae cluster analysis. Microb Genomics. 2020 Apr 1;6(4). doi:10.1099/mgen.0.000347
298. Leeper MM, Tolar BM, Griswold T, Vidyaprakash E, Hise KB, Williams GM, et al. Evaluation of whole and core genome multilocus sequence typing allele schemes for Salmonella enterica outbreak detection in a national surveillance network, PulseNet USA. Front Microbiol. 2023 Sep 21;14:1254777. doi:10.3389/fmicb.2023.1254777
299. Miro E, Rossen JWA, Chlebowicz MA, Harmsen D, Brisse S, Passet V, et al. Core/Whole Genome Multilocus Sequence Typing and Core Genome SNP-

Based Typing of OXA-48-Producing Klebsiella pneumoniae Clinical Isolates From Spain. Front Microbiol. 2020 Jan 31;10:2961. doi:10.3389/fmicb.2019.02961
300. Pitart C, Piquet M, Burgwinkel T, Arazo Del Pino R, Rubio M, Aguilar M, et al. Early identification of the nosocomial spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* by Fourier-transform infrared spectroscopy and performance comparison with PFGE and WGS. Emerg Microbes Infect. 2024 Dec 31;13(1):2392659. doi:10.1080/22221751.2024.2392659
301. Higgs C, Sherry NL, Seemann T, Horan K, Walpola H, Kinsella P, et al. Optimising genomic approaches for identifying vancomycin-resistant Enterococcus faecium transmission in healthcare settings. Nat Commun. 2022 Jan 26;13(1):509. doi:10.1038/s41467-022-28156-4
302. Maechler F, Weber A, Schwengers O, Schwab F, Denkel L, Behnke M, et al. Split k-mer analysis compared to cgMLST and SNP-based core genome analysis for detecting transmission of vancomycin-resistant enterococci: results from routine outbreak analyses across different hospitals and hospitals networks in Berlin, Germany. Microb Genomics. 2023 Jan 30;9(1). doi:10.1099/mgen.0.000937
303. Pearce ME, Alikhan NF, Dallman TJ, Zhou Z, Grant K, Maiden MCJ. Comparative analysis of core genome MLST and SNP typing within a European Salmonella serovar Enteritidis outbreak. Int J Food Microbiol. 2018 Jun;274:1–11. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.023
304. Blanc DS, Magalhães B, Koenig I, Senn L, Grandbastien B. Comparison of Whole Genome (wg-) and Core Genome (cg-) MLST (BioNumericsTM) Versus SNP Variant Calling for Epidemiological Investigation of Pseudomonas aeruginosa. Front Microbiol. 2020 Jul 22;11:1729. doi:10.3389/fmicb.2020.01729
305. Luterbach CL, Pasquale DK, Henderson HI, Cober E, Richter SS, Salata RA, et al. A network analysis of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae among healthcare facilities. Sci Rep. 2025 Jul 29;15(1):27565. doi:10.1038/s41598-025-04918-0
306. Stimson J, Gardy J, Mathema B, Crudu V, Cohen T, Colijn C. Beyond the SNP Threshold: Identifying Outbreak Clusters Using Inferred Transmissions. Leitner T, editor. Mol Biol Evol. 2019 Mar 1;36(3):587–603. doi:10.1093/molbev/msy242
307. Zhang Y, Chen C, Wu J, Jin J, Xu T, Zhou Y, et al. Sequence-Based Genomic Analysis Reveals Transmission of Antibiotic Resistance and Virulence among Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae Strains. Castanheira M, editor. mSphere. 2022 Jun 29;7(3):e00143-22. doi:10.1128/msphere.00143-22
308. On Y, Kim JW, Lee J, Yoo JS. Genomic analysis of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae blood isolates from nationwide surveillance in South

Korea. Front Microbiol. 2025 May 6;16:1562222. doi:10.3389/fmicb.2025.1562222
309. Derelle R, Von Wachsmann J, Mäklin T, Hellewell J, Russell T, Lalvani A, et al. Seamless, rapid, and accurate analyses of outbreak genomic data using split *k* -mer analysis. Genome Res. 2024 Oct;34(10):1661–73. doi:10.1101/gr.279449.124
310. Connor CH, Higgs CK, Horan K, Kwong JC, Grayson ML, Howden BP, et al. Rapid, reference-free identification of bacterial pathogen transmission using optimized split k-mer analysis. Microb Genomics. 2025 Mar 6;11(3). doi:10.1099/mgen.0.001347
311. Pasieczna-Patkowska S, Cichy M, Flieger J. Application of Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy in Characterization of Green Synthesized Nanoparticles. Molecules. 2025 Feb 4;30(3):684. doi:10.3390/molecules30030684
312. Kenney JPL, Gorzsás A. Applications of Fourier-transform Infrared Spectroscopy in Geomicrobiology. In: Kenney JPL, Veeramani H, Alessi DS, editors. Analytical Geomicrobiology. 1st edn. Cambridge University Press; 2019. p. 288–313. doi:10.1017/9781107707399.012
313. Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Mar;38(3):427–48. doi:10.1007/s10096-018-3431-3 PubMed PMID: 30483997.
314. Rodríguez-Temporal D, García-Cañada JE, Candela A, Oteo-Iglesias J, Serrano-Lobo J, Pérez-Vázquez M, et al. Characterization of an outbreak caused by Elizabethkingia miricola using Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2024 Apr;43(4):797–803. doi:10.1007/s10096-024-04764-4
315. Rodriguez-Temporal D, Sánchez-Cueto M, Buenestado-Serrano S, Blázquez-Sánchez M, Cercenado E, Gutiérrez-Pareja M, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by VIM-1 Klebsiella michiganensis using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. J Hosp Infect. 2025 Aug;162:9–16. doi:10.1016/j.jhin.2025.05.003
316. Lurie-Weinberger MN, Temkin E, Kastel O, Bechor M, Bychenko-Banyas D, Efrati-Epchtien R, et al. Use of a national repository of Fourier-transform infrared spectroscopy spectra enables fast detection of silent outbreaks and prevention of spread of new antibiotic-resistant sequence types. Antimicrob Resist Infect Control. 2025 Apr 21;14(1):34. doi:10.1186/s13756-025-01546-1
317. Kon H, Lurie-Weinberger MN, Lugassy C, Chen D, Schechner V, Schwaber MJ, et al. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for real-time outbreak investigation of OXA-48-producing *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother. 2024 Feb 1;79(2):349–53. doi:10.1093/jac/dkad387

318. Vogt S, Löffler K, Dinkelacker AG, Bader B, Autenrieth IB, Peter S, et al. Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy for Typing of Clinical Enterobacter cloacae Complex Isolates. Front Microbiol. 2019 Nov 6;10:2582. doi:10.3389/fmicb.2019.02582
319. Martak D, Valot B, Sauget M, Cholley P, Thouverez M, Bertrand X, et al. Fourier-transform infra red spectroscopy can quickly type gram-negative bacilli responsible for hospital outbreaks. Front Microbiol. 2019;10:1440. doi:10.3389/fmicb.2019.01440
320. Randall HM, Smith DW, Colm AC, Nungester WJ. Correlation of biologic properties of strains of Mycobacterium with infra-red spectrums. I. Reproducibility of extracts of M. tuberculosis as determined by infra-red spectroscopy. Am Rev Tuberc. 1951 Apr;63(4):372–80. doi:10.1164/art.1951.63.4.372 PubMed PMID: 14819556.
321. Griffiths PR. The Early Days of Commercial FT-IR Spectrometry: A Personal Perspective. Appl Spectrosc. 2017 Mar;71(3):329–40. doi:10.1177/0003702816683529 PubMed PMID: 28287313.
322. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. Nature. 1991 May;351(6321):81–2. doi:10.1038/351081a0
323. Edinburgh Instruments. Common Sampling Techniques of FTIR Spectroscopy [Internet]. 2023 [cited 2025 Aug 17]. Available from: https://www.edinst.com/resource/common-sampling-techniques-of-ftir-spectroscopy/
324. Kassem A, Abbas L, Coutinho O, Opara S, Najaf H, Kasperek D, et al. Applications of Fourier Transform-Infrared spectroscopy in microbial cell biology and environmental microbiology: advances, challenges, and future perspectives. Front Microbiol. 2023 Nov 21;14:1304081. doi:10.3389/fmicb.2023.1304081
325. Hulme PE. Hierarchical cluster analysis of herbicide modes of action reveals distinct classes of multiple resistance in weeds. Pest Manag Sci. 2022 Mar;78(3):1265–71. doi:10.1002/ps.6744
326. Segura-Alabart N, Serratosa F, Gómez S, Fernández A. Nonunique UPGMA clusterings of microsatellite markers. Brief Bioinform. 2022 Sep 20;23(5):bbac312. doi:10.1093/bib/bbac312
327. Ultsch A, Lötsch J. Euclidean distance-optimized data transformation for cluster analysis in biomedical data (EDOtrans). BMC Bioinformatics. 2022 Dec;23(1):233. doi:10.1186/s12859-022-04769-w
328. Cubas Pereira D, Pupin B, De Simone Borma L. Influence of sample preparation methods on FTIR spectra for taxonomic identification of tropical trees in the Atlantic forest. Heliyon. 2024 Mar;10(5):e27232. doi:10.1016/j.heliyon.2024.e27232

329. Novais Â, Freitas AR, Rodrigues C, Peixe L. Fourier transform infrared spectroscopy: unlocking fundamentals and prospects for bacterial strain typing. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Mar;38(3):427–48. doi:10.1007/s10096-018-3431-3
330. Rebuffo-Scheer CA, Dietrich J, Wenning M, Scherer S. Identification of five Listeria species based on infrared spectra (FTIR) using macrosamples is superior to a microsample approach. Anal Bioanal Chem. 2008 Mar;390(6):1629–35. doi:10.1007/s00216-008-1834-1
331. Maity JP, Kar S, Lin CM, Chen CY, Chang YF, Jean JS, et al. Identification and discrimination of bacteria using Fourier transform infrared spectroscopy. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2013 Dec;116:478–84. doi:10.1016/j.saa.2013.07.062
332. Feng B, Shi H, Xu F, Hu F, He J, Yang H, et al. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria. Anal Chim Acta. 2020 May;1111:75–82. doi:10.1016/j.aca.2020.03.037
333. Kochan K, Lai E, Richardson Z, Nethercott C, Peleg AY, Heraud P, et al. Vibrational Spectroscopy as a Sensitive Probe for the Chemistry of Intra-Phase Bacterial Growth. Sensors. 2020 Jun 18;20(12):3452. doi:10.3390/s20123452
334. Spain O, Funk C. Detailed Characterization of the Cell Wall Structure and Composition of Nordic Green Microalgae. J Agric Food Chem. 2022 Aug 10;70(31):9711–21. doi:10.1021/acs.jafc.2c02783
335. Javad Jafari M, Golabi M, Ederth T. Antimicrobial susceptibility testing using infrared attenuated total reflection (IR-ATR) spectroscopy to monitor metabolic activity. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2024 Jan;304:123384. doi:10.1016/j.saa.2023.123384
336. Bonner M, Barrera Patiño CP, Borsatto AR, Soares JM, Blanco KC, Bagnato VS. FTIR-Derived Feature Insights for Predicting Time-Dependent Antibiotic Resistance Progression. Antibiotics. 2025 Aug 15;14(8):831. doi:10.3390/antibiotics14080831
337. Kochan K, Jiang JH, Kostoulias X, Lai E, Richardson Z, Pebotuwa S, et al. Fast and Accurate Prediction of Antibiotic Susceptibility in Clinical Methicillin-Resistant *S. aureus* Isolates Using ATR-FTIR Spectroscopy: A Model Validation Study. Anal Chem. 2025 Mar 25;97(11):6041–8. doi:10.1021/acs.analchem.4c06086
338. Zhang J, Su P, Chen H, Qiao M, Yang B, Zhao X. Impact of reactive oxygen species on cell activity and structural integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria in electrochemical disinfection system. Chem Eng J. 2023 Jan;451:138879. doi:10.1016/j.cej.2022.138879
339. Zlotnikov ID, Ezhov AA, Vigovskiy MA, Grigorieva OA, Dyachkova UD, Belogurova NG, et al. Application Prospects of FTIR Spectroscopy and CLSM to Monitor the Drugs Interaction with Bacteria Cells Localized in Macrophages

for Diagnosis and Treatment Control of Respiratory Diseases. Diagnostics. 2023 Feb 12;13(4):698. doi:10.3390/diagnostics13040698
340. Liauw CM, Vaidya M, Slate AJ, Hickey NA, Ryder S, Martínez-Periñán E, et al. Analysis of Cellular Damage Resulting from Exposure of Bacteria to Graphene Oxide and Hybrids Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Antibiotics. 2023 Apr 18;12(4):776. doi:10.3390/antibiotics12040776
341. Passaris I, Mauder N, Kostrzewa M, Burckhardt I, Zimmermann S, Sorge NM van, et al. Validation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Serotyping of Streptococcus pneumoniae. J Clin Microbiol. 2022 Jul;60(7). doi:10.1128/jcm.00325-22 PubMed PMID: 35699436.
342. Jønsson R, Ingholt MM, Krogfelt KA. Fritz Kauffmann: innovator in microbial classification. APMIS. 2025 Jan;133(1):e13504. doi:10.1111/apm.13504
343. Cordovana M, Mauder N, Kostrzewa M, Wille A, Rojak S, Hagen RM, et al. Classification of Salmonella enterica of the (Para-)Typhoid Fever Group by Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Microorganisms. 2021 Apr 15;9(4):853. doi:10.3390/microorganisms9040853
344. Cordovana M, Mauder N, Join-Lambert O, Gravey F, LeHello S, Auzou M, et al. Machine learning-based typing of Salmonella enterica O-serogroups by the Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy-based IR Biotyper system. J Microbiol Methods. 2022 Oct;201:106564. doi:10.1016/j.mimet.2022.106564
345. Fredes-García D, Jiménez-Rodríguez J, Piña-Iturbe A, Caballero-Díaz P, González-Villarroel T, Dueñas F, et al. Development of a robust FT-IR typing system for *Salmonella enterica* , enhancing performance through hierarchical classification. Microbiol Spectr. 2025 Jul;13(7):e00159-25. doi:10.1128/spectrum.00159-25
346. Tata A, Marzoli F, Cordovana M, Tiengo A, Zacometti C, Massaro A, et al. A multi-center validation study on the discrimination of Legionella pneumophila sg.1, Legionella pneumophila sg. 2-15 and Legionella non-pneumophila isolates from water by FT-IR spectroscopy. Front Microbiol. 2023 Apr 13;14:1150942. doi:10.3389/fmicb.2023.1150942
347. Pascale MR, Bisognin F, Mazzotta M, Girolamini L, Marino F, Dal Monte P, et al. Use of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy With IR Biotyper® System for Legionella pneumophila Serogroups Identification. Front Microbiol. 2022 Apr 26;13:866426. doi:10.3389/fmicb.2022.866426
348. Nakajima N, Jinnai M, Izumiyama S, Kuroki T. Evaluating Fourier-transform infrared spectroscopy with IR Biotyper as a faster and simpler method for investigating the sources of an outbreak of legionellosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2024 May;43(5):991–7. doi:10.1007/s10096-024-04781-3

349. Karakaya E, Aydin F, Gümüşsoy KS, Kayman T, Güran Ö, Güran C, et al. Listeria monocytogenes from different sources: The serotyping, genotyping, virulotyping, and antibiotic susceptibilities of the recovered isolates. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2025 Apr;118:102314. doi:10.1016/j.cimid.2025.102314
350. Romanolo KF, Gorski L, Wang S, Lauzon CR. Rapid Identification and Classification of Listeria spp. and Serotype Assignment of Listeria monocytogenes Using Fourier Transform-Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Network Analysis. Freitag NE, editor. PLOS ONE. 2015 Nov 23;10(11):e0143425. doi:10.1371/journal.pone.0143425
351. Oberreuter H, Dyk M, Rau J. Validated differentiation of Listeria monocytogenes serogroups by FTIR spectroscopy using an Artificial Neural Network based classifier in an accredited official food control laboratory. Clin Spectrosc. 2023 Dec;5:100030. doi:10.1016/j.clispe.2023.100030
352. Rodrigues C, Sousa C, Lopes JA, Novais Â, Peixe L. A Front Line on Klebsiella pneumoniae Capsular Polysaccharide Knowledge: Fourier Transform Infrared Spectroscopy as an Accurate and Fast Typing Tool. mSystems. 2020 Apr 28;5(2):e00386-19. doi:10.1128/mSystems.00386-19
353. Orlandi Barth P, Mörschbächer Wilhelm C, Castro Pereira D, Czekster Antochevis L, Francisco Martins A, Barth AL. Use of IR Biotyper as a feasible methodology to type *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2025 Nov 4;13(11):e01146-25. doi:10.1128/spectrum.01146-25
354. Vasconcelos TM, Rodrigues LS, Krul D, Barbosa S da C, Siqueira AC, Almeida SCG, et al. Fourier transform infrared spectroscopy for Streptococcus pneumoniae capsular serotype classification in pediatric patients with invasive infections. Front Microbiol. 2024;15:1497377. doi:10.3389/fmicb.2024.1497377
355. Romero CT, Moreira NK, Da Cunha GR, Mott MP, Dias C, Barth AL, et al. Evaluation of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy with IR Biotyper® system for Streptococcus pneumoniae serotyping. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2025 Aug;44(8):1967–76. doi:10.1007/s10096-025-05162-0
356. Wong RCW, Cheung IYY, Lai CKC, Yuk MT, Chow VCY, Leung JSL, et al. Potential use of Fourier-transform infrared spectroscopy as a rapid screening tool for investigating nosocomial outbreaks of ST-80 vancomycin-resistant Enterococcus faecium. J Hosp Infect. 2025 Jan;155:161–9. doi:10.1016/j.jhin.2024.10.005
357. Pérez Rodríguez L, García García J, García Casas V, Vázquez Blanquiño A, Alberola Romano A, Recacha E, et al. Evaluation of IR BIOTYPER® as a new tool for Enterobacter cloacae complex typing and its potential in management of nosocomial infections. Antimicrob Resist Infect Control. 2025 Dec 23. doi:10.1186/s13756-025-01684-6

358. Rakovitsky N, Frenk S, Kon H, Schwartz D, Temkin E, Solter E, et al. Fourier transform infrared spectroscopy is a new option for outbreak investigation: A retrospective analysis of an extended-spectrum-beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae outbreak in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol. 2020 May;58(5). doi:10.1128/JCM.00098-20 PubMed PMID: 32161093.
359. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2021 [cited 2025 Jun 27]. Available from: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance
360. O'Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: final report and recommendations [Internet]. London; 2016 [cited 2026 Jan 16]. Report No. Available from: https://amr-review.org/
361. Dadgostar P. Antimicrobial resistance: implications and costs. Infect Drug Resist. 2019;12:3903–10. doi:10.2147/IDR.S234610
362. Poudel AN, Zhu S, Cooper N, Little P, Tarrant C, Hickman M, et al. The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE. 2023 May;18. doi:10.1371/journal.pone.0285170 PubMed PMID: 37155660.
363. Brüssow H. The antibiotic resistance crisis and the development of new antibiotics. Microb Biotechnol. 2024 Jul;17(7). doi:10.1111/1751-7915.14510 PubMed PMID: 38970161.
364. Thomas CM, Morkeberg OH, Walker PF, Stauffer WM. The cost of global connectivity: Faster and more efficient spread of antimicrobial resistance by international travelers – A controversial commentary. Travel Med Infect Dis. 2021 May;41:102045. doi:10.1016/j.tmaid.2021.102045
365. Painuli S, Semwal P, Sharma R, Akash S. Superbugs or multidrug resistant microbes: A new threat to the society. Health Sci Rep. 2023 Aug;6(8). doi:10.1002/hsr2.1480 PubMed PMID: 37547359.
366. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. 2022 Feb;399(10325):629–55. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0 PubMed PMID: 35065702.
367. European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet]. 2023 [cited 2025 Jun 27]. Available from: https://atlas.ecdc.europa.eu/
368. Brouqui P, Boudjema S, Aladro AS, Chabrière E, Florea O, Nguyen H, et al. New Approaches to Prevent Healthcare-Associated Infection. Clin Infect Dis. 2017 Aug;65:S50–4. doi:10.1093/cid/cix433 PubMed PMID: 28859352.
369. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Bakar MA. Health care-associated infections – An overview. Infect Drug Resist. 2018;11:2321–33. doi:10.2147/IDR.S177247 PubMed PMID: 30532565.

370. Osman R, Dema E, David A, Hughes G, Field N, Cole M, et al. Understanding the potential role of whole genome sequencing (WGS) in managing patients with gonorrhoea: A systematic review of WGS use on human pathogens in individual patient care. J Infect. 2024 Jun;88(6):106168. doi:10.1016/j.jinf.2024.106168
371. Yahiaoui RY, Bootsma HJ, Heijer CDJ den, Pluister GN, Paget WJ, Spreeuwenberg P, et al. Distribution of serotypes and patterns of antimicrobial resistance among commensal Streptococcus pneumoniae in nine European countries. BMC Infect Dis. 2018 Aug;18(1). doi:10.1186/s12879-018-3341-0 PubMed PMID: 30157780.
372. Burckhardt I, Sebastian K, Mauder N, Kostrzewa M, Burckhardt F, Zimmermann S. Analysis of Streptococcus pneumoniae using Fourier-transformed infrared spectroscopy allows prediction of capsular serotype. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019 Oct;38(10):1883–90. doi:10.1007/s10096-019-03622-y PubMed PMID: 31286288.
373. Dinkelacker AG, Vogt S, Oberhettinger P, Mauder N, Rau J, Kostrzewa M, et al. Typing and Species Identification of Clinical Klebsiella Isolates by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2018 Nov;56(11):e00843-18. doi:10.1128/JCM.00843-18
374. Hu Y, Zhou H, Lu J, Sun Q, Liu C, Zeng Y, et al. Evaluation of the IR Biotyper for *Klebsiella pneumoniae* typing and its potentials in hospital hygiene management. Microb Biotechnol. 2021 Jul;14(4):1343–52. doi:10.1111/1751-7915.13709
375. Quintelas C, Ferreira EC, Lopes JA, Sousa C. An Overview of the Evolution of Infrared Spectroscopy Applied to Bacterial Typing. Biotechnol J. 2018 Jan;13(1):1700449. doi:10.1002/biot.201700449
376. Raro OHF, Da Silva RMC, Filho EMR, Sukiennik TCT, Stadnik C, Dias CAG, et al. Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC–2 or blaNDM–1. Front Microbiol. 2020 Jul 15;11:1563. doi:10.3389/fmicb.2020.01563
377. Teng ASJ, Habermehl PE, Van Houdt R, De Jong MD, Van Mansfeld R, Matamoros SPF, et al. Comparison of fast Fourier transform infrared spectroscopy biotyping with whole genome sequencing-based genotyping in common nosocomial pathogens. Anal Bioanal Chem. 2022 Oct;414(24):7179–89. doi:10.1007/s00216-022-04270-6
378. Park S, Ryoo N. Comparative analysis of IR-Biotyper, MLST, cgMLST, and WGS for clustering of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in a neonatal intensive care unit. Microbiol Spectr. 2024 Apr 2;12(4):e04119-23. doi:10.1128/spectrum.04119-23

6. Anexos

6.1. Comunicaciones presentadas en congresos

Germans Trias i Pujol Hospital
Servei de Microbiologia

UAB Universitat Autònoma de Barcelona

IGTP Germans Trias i Pujol Research Institute

32nd ECCMID EUROPEAN CONGRESS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES
Lisbon, Portugal
23–26 April 2022

Evaluation of Fourier-Transform Infrared spectroscopy as a rapid first-line epidemiological typing tool for vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* outbreak analysis

Jun Hao Wang-Wang[1,2], Verónica Saludes[1,2,3,4], Montserrat Giménez[1,4], David Panisello Yagüe[3], María Dolores Quesada Fernández[1,2,4], Antoni E. Bordoy[1,3], Sònia Molinos Abós[1,2], Laia Soler Puebla[1], Miriam Campos Ruiz[1,2], Gemma Clarà i Borrell[1], Andrea Tiburcio Lara[1], Marina Navarro Albareda[1], María José García Quesada[5], Beatriz Julieta Blanco Rojas[6], Elisa Martró[1,2,3,4], Pere-Joan Cardona[1,2,3,7]

[1]Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain. [2]Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Catalonia, Spain. [3]Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Catalonia, Spain. [4]Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. [5]Enfermería Control de Infección, Dirección Enfermería, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain. [6]Preventive Medicine Department, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Catalonia, Spain. [7]Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain.

Introduction and aim

Early detection of pathogen cross-transmission events and environmental reservoirs is needed to control derived nosocomial outbreaks. Whole-genome sequencing (WGS) is considered the gold standard for outbreak confirmation but, in most cases, it is complex, time-consuming and costly. Fourier-Transform InfraRed Spectroscopy (FTIR) is a rapid technique (3-4h) that establishes similarity among bacteria based on the comparison of infrared light absorption patterns of the bacterial wall polysaccharide region. The **aim** of the present study was to evaluate the performance of the FTIR as a first-line typing tool for identification of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE) nosocomial outbreaks.

Methods

- Seventeen clinical isolates and four environmental samples were collected from July to October 2021 during a VRE nosocomial outbreak occurred at a single hospital ward.
- All samples were typed by both FTIR (**Figure 1**) with the IR Biotyper system (Bruker GmbH, Leipzig, Germany) and core genome multilocus sequence typing (cgMLST) from WGS data as the gold standard method (**Figure 2**).
- Concordance between both clustering methods was calculated using the adjusted Rand index (AR) and the adjusted Wallace coefficient (AW).

Fig. 1A. **Fig. 1B.** **Fig. 1C.** **Fig. 1D.**

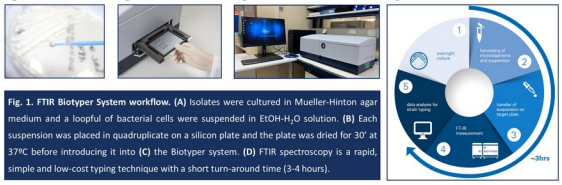
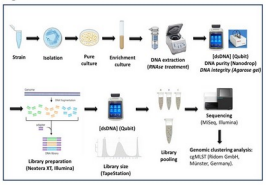


Fig. 1. FTIR Biotyper System workflow. (A) Isolates were cultured in Mueller-Hinton agar medium and a loopful of bacterial cells were suspended in EtOH-H_2O solution. **(B)** Each suspension was placed in quadruplicate on a silicon plate and the plate was dried for 30' at 37ºC before introducing it into **(C)** the Biotyper system. **(D)** FTIR spectroscopy is a rapid, simple and low-cost typing technique with a short turn-around time (3-4 hours).

Fig. 2. WGS workflow.



Results

- Analysis with FTIR and cgMLST has allowed us to identify two unrelated clusters as the cause of the VRE outbreak. Specifically, a minor cluster of four isolates (ST117, *vanA*) and a major cluster including 12 isolates plus all four environmental samples (ST80, *vanA*) (**Figure 3**).
- One sample was not related to any of the two clusters (singleton), according to both methods.
- Both AR and AW coefficients were 1.00 (95%CI, 1.00-1.00).

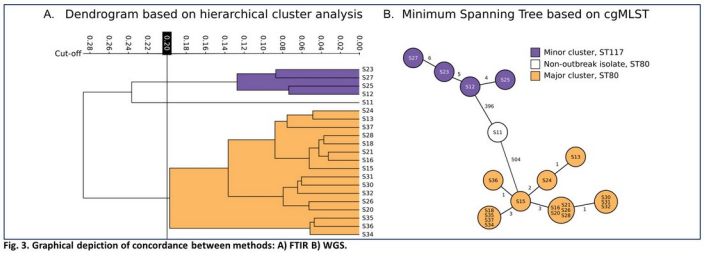


Fig. 3. Graphical depiction of concordance between methods: A) FTIR B) WGS.

Conclusion

The FTIR method is a quick, low cost, and reliable first-line tool for the detection of VRE outbreaks while WGS analyses are being performed for further characterization.

Application of Fourier-Transform Infrared Spectroscopy for the detection of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreaks

Alba Llop-Alguero[1,2], Antoni E. Bordoy[3], Jun Hao Wang-Wang[1,2], Maria Dolores Quesada[1,2], Jessica Hidalgo Heredia[1], Marina Navarro Albareda[1], Dina Reina Sarrió[4], Raúl Lopez Salas[4], Nieves Sopena[5], Montserrat Giménez[1,2,6], Elisa Martró[2,3,7], Verónica Saludes[2,3,7], Pere-Joan Cardona[2,3,6]

[1]Microbiology Department, Laboratori Clinic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain. [2]Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain. [3]Microbiology Department, Laboratori Clinic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital, Germans Trias i Pujol Research Team (IGTP), Badalona, Spain. [4]Infectious Diseases Control Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain. [5]Infectious Diseases Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain. [6]CIBER in Respiratory Diseases (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain. [7]CIBER in Epidemiology and Public Health (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain.

Introduction and aim

Early detection of multi-resistant bacteria outbreaks in hospitals is important because health-care-associated infections increase the hospital burden and hospitalization length. Whole genome sequencing (WGS) is the current method for outbreak confirmation, however, WGS techniques are laborious. In contrast, Fourier-Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy used by the IR Biotyper System (Bruker GmbH, Leipzig, Germany) is a simple typing method that can help in outbreak investigations, offering rapid results (4 hours). The aim of this study was to evaluate the performance of the FTIR as a real-time outbreak detection method for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* (ESBL-*Kp*).

Methods

- Fourteen clinical samples and thirteen colonization samples were collected from January to August 2022 during two epidemiological ESBL-*Kp* outbreaks from two different wards of the same hospital.
- All samples were prospectively typed by FTIR with the IR Biotyper System (**Figure 1**). WGS with the MiSeq platform (Illumina Inc., San Diego, United States) was performed as gold standard retrospective confirmation (**Figure 2**). Ridom SeqSphere+ software (Ridom GmbH, Münster, Germany) was used for cqMLST analysis.
- Concordance between both methods was calculated using the adjusted Rand index (AR) and the adjusted Wallace coefficient (AW).

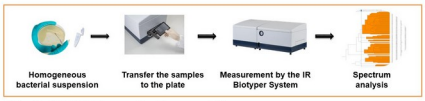


Fig. 1. FTIR Biotyper System workflow.

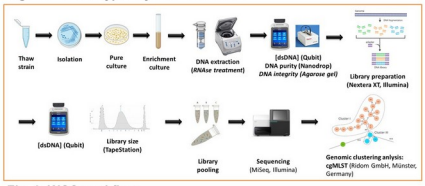


Fig. 2. WGS workflow.

Results

- FTIR identified three clusters (I-III) of eleven, ten, and two isolates.
- Two of the identified clusters by both FTIR and WGS included patients from both hospital wards.
- The two epidemiological outbreaks were confirmed as polyclonal by both techniques.

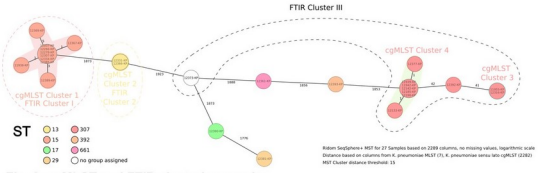


Fig. 3. cgMLST and FTIR clustering results.

- Only four isolates identified as part of the eleven-sample cluster by FTIR (cluster III) were discordant compared to WGS, which classified two as singletons and two in a separate cluster of the same ST (**Figure 3**).
- AR and AW values of 0.713 (95% CI, 0.411-1.000) and 0.608 (95% CI, 0.417-0.800) were obtained.

After outbreak confirmation by FTIR, the hospital infection prevention and control team started infection control measures

- Rectal screening at admission and weekly
- Auditing hand hygiene protocol
- Enhancing cleaning and disinfection

Conclusion

FTIR is a rapid and useful technique with a high concordance with WGS for epidemiological ESBL-*Kp* outbreak confirmation that helps the early implementation of infection control measures.

Copenhagen, Denmark 15–18 April 2023
33rd ECCMID

Aplicació de l'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier per a la detecció de brots de *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa d'espectre estès

Alba Llop-Alguero[1, 2], Antoni E Bordoy[1], Jun Hao Wang-Wang[1, 2], Maria Dolores Quesada[1, 2], Jessica Hidalgo Heredia[1], Marina Navarro Albareda[1], Dina Reina Sarrió[3], Raúl Lopez Salas [3], Nieves Sopena[4], Montserrat Giménez[1, 2, 5], Elisa Martró[1, 2, 6], Verónica Saludes [1, 2, 6], Pere-Joan Cardona [1, 2, 5]

[1]Servei de Microbiologia, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP) – Badalona, [2]Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona – Bellaterra, [3]Departament de Control d'Infecció Nosocomial, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol – Badalona, [4]Servei de Malalties Infeccioses, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol – Badalona, [5]CIBER en Malalties Respiratòries (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Madrid, [6] CIBER en Epidemiologia i Salut Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Madrid.

Introducció i objectius

La detecció ràpida de brots de bacteris multirresistents als hospitals és important degut a que les infeccions associades a l'atenció sanitària augmenten la càrrega hospitalària i la durada de l'hospitalització. La seqüenciació completa del genoma (WGS) és el mètode actual per confirmar els brots, però les tècniques de WGS són laborioses. L'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier (FTIR) utilitzada pel sistema IR Biotyper (Bruker GmbHm Leipzig, Alemanya) és un mètode de tipificació senzill que pot ajudar en la investigació dels brots, oferint resultats ràpids (4 hores). L'objectiu d'aquest estudi és avaluar el rendiment del FTIR com a mètode de detecció de brots en temps real per a *Klebsiella pneumoniae* productora de beta-lactamasa d'espectre estès (BLEE-*Kp*).

Mètodes

- Es van recollir catorze mostres clíniques i tretze mostres de colonització entre els mesos de gener a agost de 2022 durant dos brots de BLEE-*Kp* en dus plantes diferents de l'hospital.
- Totes les mostres es van tipar gairebé en temps real mitjançant FTIR utilitzant el sistema IR Biotyper (**Figura 1**). Es va realitzar la seqüenciació WGS utilitzant la plataforma MiSeq (Illumina Inc., San Diego, United States) com a *gold standard* per la confirmació retrospectiva dels brots (**Figura 2**). Es va utilitzar el software SeqSphere+ software (Ridom GmbH, Münster, Germany) per l'anàlisi cqMLST.
- La concordança entre ambdós mètodes es va calcular utilitzant l'índex Rand ajustat (AR) i el coeficient de Wallace ajustat (AW).



Fig. 1. Fluxe de treball del sistema FTIR Biotyper.



Fig. 2. Fluxe de treball de la seqüenciació WGS.

Resultats

- FTIR va identificar tres clusters (I-III) d'onze, deu i dos aïllats.
- Dos dels clústers identificats tant per FTIR com per WGS inclouen pacients d'ambues plantes de l'hospital.
- El brots es van confirmar com a policlonals per ambdues tècniques.

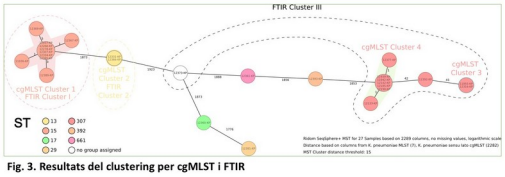


Fig. 3. Resultats del clustering per cgMLST i FTIR

- Només quatre aïllats identificats com el mateix clúster per FTIR (clúster III) van ser discordants en comparació amb WGS, que va classificar dos com a singletons i dos en un clúster diferent del mateix ST (**Figura 3**).
- Es van obtenir valors de AR i AW de 0.713 (95% CI, 0.411-1.000) i 0.608 (95% CI, 0.417-0.800).

Després de la confirmació de brot per FTIR, l'equip de prevenció i control d'infeccions de l'hospital va iniciar mesures de control d'infeccions → Cribatge rectal a l'admissió i setmanal → Revisió del protocol d'higiene de mans → Millora de la neteja i la desinfecció

Conclusion

FTIR es una tècnica ràpida i útil amb una alta concordança amb WGS per a la confirmació de brots de BLEE-*Kp* que ajuda a la implementació precoç de mesures de control de la infecció nosocomial.

Evaluation of Fourier-transform infrared spectroscopy as a method for rapid *Streptococcus pneumoniae* serotyping

M.Campos-Ruiz[1,2], JH Wang-Wang[1,2], P. Pillado[1,2], T. Vela[1,2], MD. Quesada[1,2,4], M. Giménez[1,4], PJ Cardona[1,2,3,5]

[1]Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord (LCMN), University Hospital Germans Trias i Pujol - Badalona (Spain), [2]Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona - Barcelona (Spain), [3]Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Catalonia, Spain. [4]Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain, [5]Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud† Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

Background

Streptococcus pneumoniae remains a significant cause of bacteraemia and meningitis, known as invasive pneumococcal disease (IPD). Accurate serotyping is essential, as some serotypes linked to disease severity and antimicrobial resistance. Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopy has been explored for bacterial serotyping.

Objective: Evaluation of the FTIR-IR Biotyper (Bruker GmbH, Germany) as a routine serotyping tool for *S. pneumoniae* in clinical microbiology laboratory.

Materials and methods

A total of 150 pneumococcal strains from 32 serotypes were collected from IPD cases in a tertiary hospital between 2016 and 2023. Forty nine samples (33%) exhibited a serotype included in PCV13 vaccine (Fig. 1)

Each strain was analyzed using two approaches:

A) FTIR-based clustering based on hierarchical cluster analysis;

B) FTIR machine-learning-based PneumoClassifier algorithm.

Then, Adjusted Rand Index (ARI) and Adjusted Wallace Index (AWI) was obtained comparing each method with Quellung technique (gold standard).

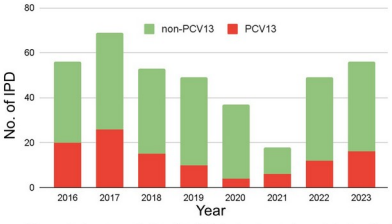


Figure 1. Serotypes isolated in IPD during the study period classified based on whether they are included in the PCV13 or not

Results

Clustering Method

- Correctly grouped 48/150 isolates, including PCV13 serotypes 1, 3, 19F and non-PCV13 serotypes 6C, 7BC, 17F, 24F, 31, 35B.

PneumoClassifier Performance (Fig. 2)

- Accurately classified 100% (49/49) of PCV13 serotypes, including highly virulent ones (1, 6B, 7F, 14).
- Correctly identified 73/101 (72.3%) non-PCV13 serotypes but struggled with 12F, 15AB, 16F, 17F, 23A, 24F.
- Overall accuracy: 122/150 (79.8%).

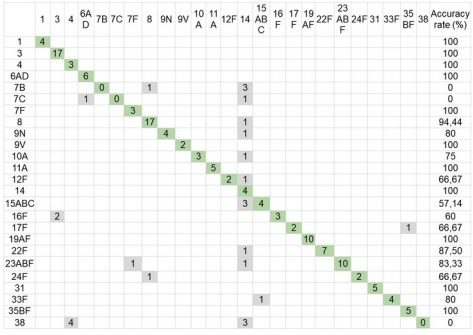


Figure 2. Confusion matrix comparing PneumoClassifier results with Quellung reaction. In green: correctly identified strains. In grey: incorrectly typed isolates.

Comparison with Quellung

•PneumoClassifier showed higher concordance (ARI: 0.717, AWI: 0.636) than the clustering method (0.397 and 0.378, respectively) ($p<0.001$).

Conclusions

FTIR is a rapid, user-friendly, and cost-effective tool for *S. pneumoniae* serotyping in clinical microbiology laboratories. Effectively identifies common circulating strains and beta-lactam-resistant serotypes. Provides added value over Quellung as a first-line screening method.

Congress of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
ESCMID Global

6.2. Premios obtenidos en congresos



SOCIETAT CATALANA DE MALALTIES INFECCIOSES

I MICROBIOLOGIA CLÍNICA

XXXII JORNADES DE LA SOCIETAT

CONCEDEIX EL PREMI JOSEP BARRIO (Microbiologia)

a:

Jun Hao Wang-Wang [1,2], *Antoni E. Bordoy* [1,3], *Elisa Martró* [1,2,3,4], *María Dolores Quesada* [1,2,4]; *María Pérez-Vázquez* [5,6], *Mercedes Guerrero-Murillo* [7,8], *Andrea Tiburcio* [1], *Marina Navarro* [1], *Laia Castellà* [9], *Nieves Sopena* [10], *Irma Casas* [11], *Verónica Saludes* [1,2,3,4‡], *Montserrat Giménez* [1,4‡] *and Pere-Joan Cardona* [1,2,3,12]*

[1] *Microbiology Department, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain,* [2] *Genetics and Microbiology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Spain,* [3] *Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Badalona, Spain,* [4] *Centro de Investigación Biomédica en Red en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain,* [5] *Reference and Research Laboratory for Antibiotic Resistance and Health Care Infections, National Centre for Microbiology, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain,* [6] *Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Infecciosas (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain,* [7] *Clinical Genomics Research Unit, Germans Trias i Pujol Research Institute (IGTP), Can Ruti Campus, Badalona, Spain,* [8] *Clinical Genomics Unit, Clinical Genetics Service, Laboratori Clínic Metropolitana Nord, Germans Trias i Pujol University Hospital, Can Ruti Campus, Badalona, Spain,* [9] *Enfermería Control de Infección, Dirección Enfermería, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain,* [10] *Infectious Diseases Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain,* [11] *Preventive Medicine Department, Germans Trias i Pujol University Hospital, Badalona, Spain,* [12] *Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain*

pel seu projecte:

Evaluation of Fourier Transform Infrared Spectroscopy as a First-Line Typing Tool for the Identification of Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Outbreaks in the Hospital Setting

Calonge, 21 d'octubre de 2023

Climent Casals Pascual

President SCMIMC

SOCIETAT CATALANA DE MALALTIES INFECCIOSES

I MICROBIOLOGIA CLÍNICA

XXXII JORNADES DE LA SOCIETAT

CONCEDEIX EL

Premi al millor pòster en microbiologia de les XXXII Jornades de la Societat Catalana de Malalties Infeccioses i Microbiologia Clínica

a:

Alba Llop-Alguero[1,2]; Antoni E Bordoy[1]; Jun Hao Wang-Wang[1,2]; Maria Dolores Quesada[1,2]; Jessica Hidalgo Heredia[1]; Marina Navarro Albareda[1]; Dina Reina Sarrió[3]; Raúl Lopez Salas[3]; Nieves Sopena[4]; Montserrat Giménez[1,2,5]; Elisa Martró[1,2,6]; Verónica Saludes[1,2,6]; Pere-Joan Cardona[1,2,5]

Servei de Microbiologia, Hospital Germans Trias i Pujol-Badalona; [2]Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona – Bellaterra; [3]Departament de Control d'Infecció Nosocomial, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol; [4]Servei de Malalties Infeccioses, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol – Badalona; [5]CIBER en Malaties Respiratòries (CIBERES), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Madrid; [6]CIBER en Epidemiologia i Salut Pública (CIBERESP), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) – Madrid

pel seu projecte:

Aplicació de l'espectroscòpia infraroja per transformada de Fourier per a la detecció de brots de Klebsiella pneumoniae productora de beta-lactamasa d'espectre estès

Calonge, 21 d'octubre de 2023

Climent Casals Pascual

President SCMIMC