



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAGISTER EN CIENCIAS MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**

Epidemiología molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en hospitales de Chile portadoras de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas.

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias biológicas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias mención Microbiología

POR: Maximiliano Matus-Köhler

PROFESOR Guía: Dra. Helia Bello-Toledo

PROFESOR Co-Guía: Dr. Felipe Morales-León

**Octubre, 2025
Concepción, Chile**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

© 2025, Maximiliano Matus Köhler

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
Resistencia antimicrobiana en clínica	10
Epidemiología e implicancias de bacterias resistentes a antimicrobianos	11
Antimicrobianos de última línea	13
Carbapenémicos.....	13
Aminoglucósidos-aminociclitolos	15
Nuevas combinaciones de β -lactámicos más inhibidores de β -lactamasas en la era de las carbapenemasas.....	21
<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente a antimicrobianos de última línea	23
<i>Klebsiella pneumoniae</i> specie complex (KpSC).....	23
Linajes exitosos, ¿casualidad o causalidad?.....	24
Elementos genéticos móviles	32
Elementos genéticos móviles asociados a diseminación de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas en <i>K. pneumoniae</i> (Kp1).....	33
Pregunta de investigación	36
Hipótesis de trabajo	36
Objetivo general.....	37
Objetivos específicos	37
Materiales y métodos	38
Cepas bacterianas	38
Estudios Moleculares	38
Extracción ADN para PCR convencional.....	38
Determinación de genes codificantes de metiltransferasas de ARNr 16S	39

Detección de genes codificantes de carbapenemasa	40
Genotipificación molecular (ERIC-PCR)	43
Estudios genómicos	43
Extracción de ADN para la secuenciación del genoma completo	43
Secuenciación del genoma completo	44
Construcción de la base de datos de genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1)	45
Análisis filogenético	46
Estudio de genes de resistencia, virulencia serotipos capsulares y antígenos O	46
Estudio de plataformas genéticas asociadas a metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas	46
Genotipificación de cepas de <i>K. pneumoniae</i>	49
Análisis genómico de <i>K. pneumoniae</i> co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	51
Análisis del resistoma de cepas co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas, carbapenemasas.	60
Fenómeno de co-portación de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	74
Análisis filogenético	78
<i>Locus</i> capsulare (KL), antígeno O (OL) y marcadores de virulencia relevantes	80
Análisis de plásmidos putativos portadores de genes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	93
Entornos genéticos de genes de 16S-RMTasas y carbapenemasas .	102

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química básica de los carbapenémicos.....	14
Figura 2. Núcleo estructural de los aminoglucósidos.	16
Figura 3. Aminoglucósidos del tipo 4,6 disustituidos 2-DOS.	17
Figura 4. Modelo de entrada de aminoglucósidos en bacterias Gram negativa	20
Figura 5. Relación genética de 36 cepas de <i>K. pneumoniae</i> portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas.	50
Figura 6. Distribución geográfica de linajes basado en esquema MLST Pasteur (ST) de 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes 16S-RMTasas y carbapenemasas	54
Figura 7. Distribución geográfica de linajes basado en esquema cgMLST (SL) de 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	55
Figura 8. Heatmap de distribución secuencio tipos (ST) basado en esquema MLST Pasteur de 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas.	56
Figura 9. Heatmap de distribución de sublinajes (SL) basado en esquema cgMLST de 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	57
Figura 10. Heatmap de distribución de clonal groups (CG) basado en esquema cgMLST de 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	58
Figura 11. Diagrama aluvial de distribución de linajes de 139 genomas de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> (Kp1) basado en esquema MLST Pasteur (ST), cgMLST (<i>Sublinage</i> y <i>Clonal Group</i>) y la región geográfica de origen (<i>Location</i>).	59
Figura 12. Distribución geográfica de genes codificantes de metiltransferasas en 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	62
Figura 13. Distribución geográfica de genes codificantes de carbapenemasas en 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	63
Figura 14. Heatmap de distribución de frecuencia de genes de resistencia a metales pesados encontrados en diferentes STs de 139 genomas de <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	73

Figura 15. Correlación de diferentes genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas en 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	77
Figura 16. Árbol filogenético basado en esquema de cgMLST de <i>K. pneumoniae</i> para 139 genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas	79
Figura 17. Análisis comparativo del plásmido pAA860 mediante MOB-recon contra el plásmido más cercano (<i>mash nearest neighbor</i>) pCFR17394 (número de acceso Genbank: MH995506.1) de la base de datos proporcionada por MOB-cluster.....	99
Figura 18. Análisis comparativo del plásmido pAA018 portador del gen <i>bla</i> _{KPC-2} , reconstruido de la secuencia 17U mediante la herramienta MOB-recon contra el plásmido más cercano (<i>mash nearest neighbor</i>) pG12-KPC-2 (número de acceso GenBank: KU665642.1) de la base de datos proporcionada por MOB-cluster..	99
Figura 19. Análisis comparativo del plásmido pAA356 portador del gen <i>bla</i> _{KPC-2} , inferido en el genoma de 28U mediante la herramienta MOB-recon contra el plásmido más cercano (<i>mash nearest neighbor</i>) pRYCKPC3.1 (número de acceso Genbank: NC_019151.1) de la base de datos proporcionada por MOB-cluster.....	101
Figura 20. Análisis comparativo de plásmidos pAC741 portador del gen <i>bla</i> _{VIM-2} , inferido en el genoma de K2070 mediante la herramienta MOB-recon contra el plásmido más cercano (<i>mash nearest neighbor</i>) pKPN-704 (número de acceso Genbank: CP014764.1) de la base de datos proporcionada por MOB-cluster.....	102
Figura 21. Entorno genético de <i>rmtC</i> y <i>bla</i> _{NDM-1} detectados en los genomas de las cepas 17U, 28U, 40U, 41U y P88.....	103
Figura 22. Entorno genético de <i>bla</i> _{KPC-2} de genomas 17U y 28U.	104
Figura 23. Entorno genético de <i>rmtD2</i> de genoma K2070.....	105
Figura 24. Entorno genético de <i>bla</i> _{VIM-2} en el genoma K2070.	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los aminoglucósidos según su estructura química. ...	17
Tabla 2. Perfil de hidrolisis de antimicrobianos y actividad de inhibidores de carbapenemasas.	22
Tabla 3. Espectro de inhibición de aminoglucósidos por EMAs.	29
Tabla 4. Partidores utilizados para la amplificación mediante PCR convencional de genes codificantes de metiltransferasas de ARNr 16S.	41
Tabla 5. Partidores utilizados para la amplificación por PCR convencional de genes codificantes de carbapenemasas.	42
Tabla 6. Genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (CBP) detectados en cepas de <i>K. pneumoniae</i>	48
Tabla 7. Estadísticas de ensamblaje de las cepas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) secuenciadas en este trabajo.	53
Tabla 8. Descripción de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas de genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de América del Sur. Incluidas las 6 cepas secuenciadas en este trabajo (17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070).	64
Tabla 9. Resistoma de las seis cepas secuenciados en este trabajo (17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070).	70
Tabla 10. Descripción del viruloma de genomas de <i>K. pneumoniae</i> (Kp1) provenientes de Brasil portadores de genes codificantes 16S-RMTasas y carbapenemasas.	85
Tabla 11. Descripción de plásmidos putativos reconstruidos utilizando los genomas de cepas 17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070.	95

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) representa una amenaza creciente para la salud pública global, especialmente en bacterias Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae*. Esta tesis aborda la epidemiología molecular de cepas clínicas de *K. pneumoniae* aisladas en hospitales de Chile, co-portadoras de genes que codifican metiltransferasas de ARNr 16S (16S-RMTasas) y carbapenemasas.

Se analizaron 36 cepas co-portadoras de 16S-RMTasas y carbapenemasas mediante PCR convencional, ERIC-PCR y, secuenciación del genoma completo. La co-portación más prevalente fue *rmtC* junto con *bla_{NDM-1}*.

El análisis filogenético evidenció una diversidad de linajes en las cepas co-portadoras, destacando el ST25 como el predominante en Chile y el ST258 en Sudamérica. Se identificaron plásmidos conjugativos tipo IncC co-portadores de *rmtC* y *bla_{NDM-1}*, mientras que *bla_{KPC-2}* y *bla_{VIM-2}* no se encontraron co-portados en el mismo plásmido que *rmtC* y *rmtD2*, respectivamente. El gen *bla_{VIM-2}* se detectó en un plásmido del rep-cluster 435, sin grupo de incompatibilidad determinado. En total, se reconstruyeron 29 plásmidos putativos, lo que evidenció una amplia diversidad de plataformas genéticas.

Estos resultados sugieren que la diseminación de genes de resistencia está mediada por múltiples elementos genéticos móviles, varios de ellos con capacidad de transferencia horizontal. La co-portación de 16S-RMTasas y carbapenemasas representa un desafío terapéutico significativo, especialmente en entornos hospitalarios. Este estudio contribuye al fortalecimiento de la vigilancia genómica y a la optimización de estrategias de control de *K. pneumoniae* multirresistente, mediante una caracterización epidemiológica y genómica.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) represents a growing threat to global public health, especially in Gram-negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae*. This thesis addresses the molecular epidemiology of clinical strains of *K. pneumoniae* isolated in Chilean hospitals, co-carrying genes encoding 16S rRNA methyltransferases (16S-RMTases) and carbapenemases.

Thirty-six strains co-carrying 16S-RMTases and carbapenemases were analyzed using conventional PCR, ERIC-PCR and whole genome sequencing. The most prevalent co-carriage was *rmtC* together with *bla*_{NDM-1}.

Phylogenetic analysis revealed a diversity of lineages in the co-carrying strains, with ST25 being the predominant one in Chile and ST258 in South America. IncC-type conjugative plasmids co-carrying *rmtC* and *bla*_{NDM-1} were identified, while *bla*_{KPC-2} and *bla*_{VIM-2} were not found co-carried on the same plasmid as *rmtC* and *rmtD2*, respectively. The *bla*_{VIM-2} gene was detected in a *rep-cluster* 435 plasmid, with no determined incompatibility group. In total, 29 putative plasmids were reconstructed, revealing a wide diversity of genetic platforms.

These results suggest that the spread of resistance genes is mediated by multiple mobile genetic elements, several of which have the capacity for horizontal transfer. The co-carriage of 16S-RMTases and carbapenemases represents a significant therapeutic challenge, especially in hospital settings. This study contributes to strengthening genomic surveillance and optimizing control strategies for multidrug-resistant *K. pneumoniae* through epidemiological and genomic characterization.

INTRODUCCIÓN

Resistencia antimicrobiana en clínica

La resistencia de las bacterias a compuestos químicos denominados antimicrobianos es un fenómeno evolutivo (Baquero *et al.*, 2021). Este proceso implica la selección de células bacterianas que poseen la capacidad de expresar mecanismos de resistencia y, posteriormente, dar origen a linajes con dichas características (Baquero *et al.*, 2021). Ahora bien, la definición de una bacteria resistente a un antimicrobiano es un concepto complejo (Pitchforth *et al.*, 2023). En la clínica, una bacteria se considera resistente a un antimicrobiano cuando las probabilidades de éxito de un tratamiento farmacológico frente a esta son bajas. Estas probabilidades se basan en las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), definidas como la mínima cantidad de compuesto requerido para inhibir el crecimiento de un microorganismo. Asimismo, las distribuciones de valores de CMI de un grupo específico de microorganismos darán lugar a una distribución normal de la cual se obtienen los puntos de corte epidemiológicos (*ECOFF*, abreviatura oficial de EUCAST). Aquellos microorganismos con valores de CMI superiores a los *ECOFFs* se consideran potencialmente resistentes (Baquero *et al.*, 2021).

Por otro lado, las clasificaciones de fenotipos bacterianos respecto a los patrones de resistencia a diferentes familias de antimicrobianos son variadas. La más popular es la clasificación según el número de familias de antimicrobianos a las cuales la bacteria es resistente, el fenotipo *multidrug-resistant* (MDR), definido

como aquel en el que la bacteria es resistente al menos a un agente antimicrobiano de tres o más clases diferentes; el fenotipo *extensively drug-resistant* (XDR), que incluye bacterias susceptibles a una o dos clases de antimicrobianos y, finalmente, el fenotipo *pandrug-resistant* (PDR), definido como aquel resistente a todos los miembros de todas las categorías (Magiorakos *et al.*, 2012). Aunque la clasificación propuesta por Magiorakos *et al.* (2012) presenta un valor epidemiológico importante, no siempre es viable probar todas las opciones de antimicrobianos en todos los centros clínicos (Kadri *et al.*, 2018). Últimamente, se ha propuesto, para las bacterias Gram negativas, una nueva categoría que define un nuevo fenotipo de resistencia conocido como fenotipo de resistencia difícil de tratar (*difficult to treat resistance*, DTR), que considera la resistencia a opciones de tratamiento de primera línea, como los β -lactámicos, incluidos los carbapenémicos y las combinaciones de inhibidores de β -lactamasas, así como a fluoroquinolonas (Kadri *et al.*, 2018). Se sugiere que esta definición pueda ser empleada en un contexto local o regional para orientar los protocolos de uso de antibióticos (Huh *et al.*, 2020).

Epidemiología e implicancias de bacterias resistentes a antimicrobianos

En la actualidad la resistencia antimicrobiana (RAM) es una amenaza para la población global y se posiciona como uno de los principales problemas de salud pública. Sin duda, desde el informe de O'Neill J. en 2016, que estimaba 10 millones de muertes anuales para el año 2050 si no se tomaban medidas para enfrentar el problema de la RAM, los esfuerzos se han centrado en cuantificar de manera más precisa el impacto global de esta problemática.

Así, el trabajo publicado el 2022 por Murray *et al.* cuantifica la carga de la RAM a nivel mundial, analizando datos recopilados en 2019 de 204 países. Se reportaron 7,7 millones de muertes anuales causadas por bacterias, de las cuales 4,95 millones fueron asociadas a bacterias resistentes a antimicrobianos incluyendo 1,27 millones de muertes que fueron causadas por estas bacterias. En esta misma línea, el trabajo publicado el 2024 por Naghavi *et al.*, con datos recopilados entre 1990 y 2021 de 204 países, reporta que en 2021 se estimaron 4,71 millones de muertes asociadas a bacterias resistentes a antimicrobianos, incluyendo 1,14 millones de muertes atribuidas a estas bacterias resistentes. De manera preocupante, las infecciones causadas por bacterias Gram negativas resistentes a carbapenémicos ha sufrido un importante aumento, reflejando un incremento de muertes asociadas desde 619,000 en 1990 a 1,03 millones en 2021. De estas, las muertes atribuibles pasaron de 127,000 en 1990 a 216,000 en 2021.

Finalmente, el estudio publicado el 2024 por Wise *et al.* presenta un reporte sobre las tendencias de resistencia a carbapenémicos en bacterias Gram negativas recolectadas a través del programa de vigilancia mundial ATLAS entre los años 2018 y 2022. El estudio reporta que, en Latinoamérica, tomando a Brasil como referencia, hubo un aumento de Enterobacterales resistentes a carbapenémicos (ERCBP) del 4,7% el 2018 a 12,9% el 2019.

En Chile, no se encuentran publicaciones actualizadas con datos sobre ERCBP; el último reporte del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) fue publicado en 2022 y recopila datos históricos desde 2012 hasta 2020, indicando un aumento de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (KpRC) de 26,5% a 46,3% para ertapenem; de 7,3% a 25,7% para meropenem, y de 3,6% a 7,1% para imipenem (Instituto de Salud Pública de Chile, 2022). De manera similar, en el mismo estudio se observa la tendencia a una mayor frecuencia de cepas resistentes a otros antibióticos. Así, desde el periodo 1991-1993 hasta

2020 el porcentaje de cepas resistentes a ciprofloxacino aumento de 21,4% a 73,9%, para gentamicina este aumento fue de 47,7% a 57,2% y para cefotaxima de 22,4% a 74%.

Antimicrobianos de última línea

Carbapenémicos

Entre los antimicrobianos de última línea, los cuales son eficaces para enfrentar a bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos se encuentran los carbapenémicos (CBP), compuestos químicos que forman parte de la familia de los β -lactámicos con un amplio espectro de acción contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y anaerobias (Aguayo Reyes *et al.*, 2023). Aunque la indicación y racionalización de su uso clínico limitan su administración a casos de infecciones mediadas por bacterias Gram negativas resistentes a cefalosporinas de tercera generación.

La estructura química de los CBP (**Figura 1**) consiste en un anillo β -lactámico (2-azatidinona) fusionado a un ciclopenteno insaturado en posiciones C2-C3, lo que le otorga la denominación “penem”. Dentro de los representantes de esta familia, imipenem carece de un grupo metilo en la posición C1, lo que, entre otras características, lo diferencia de meropenem y ertapenem, los cuales poseen este grupo en dicha posición (Aguayo-Reyes *et al.*, 2021; El-Gamal *et al.*, 2017; Tooke *et al.*, 2019).

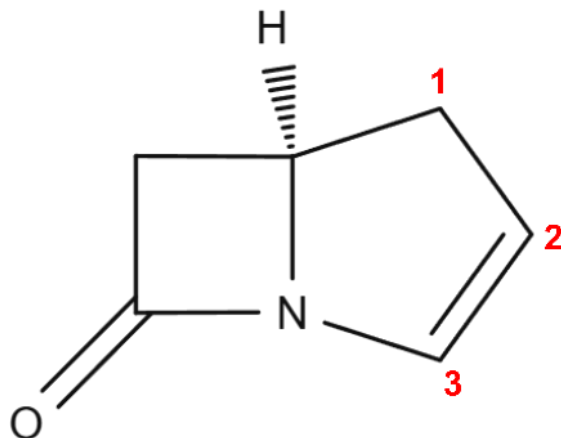


Figura 1. Estructura química básica de los carbapenémicos, imagen obtenida desde <https://molview.org>

Los CBP, al igual que todos los β -lactámicos, tienen como blanco las enzimas que catalizan las últimas reacciones de la polimerización del peptidoglucano al nivel de la pared celular. Esta familia de enzimas es conocida como proteínas de unión a la penicilina (PBPs, por sus siglas en inglés) y se caracterizan por tener un sitio activo con residuos de serina altamente conservados. Brevemente, las PBP se pueden clasificar según su tamaño, encontrándose las de alto y bajo peso molecular. De estas, las de alto peso molecular (PBP1, 2, 3 y 4) comprenden transpeptidasas y transglicosilasas, esenciales para la síntesis de pared celular; mientras que las de bajo peso molecular (PBP 5, 6, 7 y 8) son carboxipeptidasas, consideradas como no esenciales. Los CBP poseen mayor afinidad por PBP1a, 1b y 2 que por PBP3 (Aguayo Reyes *et al.*, 2023; Mayers *et al.*, 2017). Respecto a la farmacocinética, los CBP poseen una unión variable a proteínas plasmáticas y son excretados principalmente a nivel renal. El modelo PK/PD que

favorece la actividad de los CBP (al igual que todos los β -lactámicos) es el tiempo sobre la CMI. Respecto a sus efectos adversos (EA), en general son las de la familia de β -lactámicos, encontrando reacciones alérgicas de distinto grado de severidad, intolerancia gastrointestinal y diarrea asociada a *Clostridioides difficile* (Aguayo Reyes *et al.*, 2023).

Aminoglucósidos-aminociclitolos

De manera menos popular que los carbapenémicos, los aminoglucósidos (AMGs), siguen siendo utilizados en la clínica. Estos son antibióticos de amplio espectro, bactericidas y con un efecto postantibiótico ampliamente estudiado (Aguayo Reyes *et al.*, 2023).

Actualmente, los AMGs pueden emplearse en tratamientos empíricos en pacientes con riesgo de infección por bacilos Gram negativos MDR en casos de sepsis, infecciones intraabdominales complicadas e infecciones del tracto urinario complicadas, siempre en combinación con antibióticos inhibidores de la síntesis de pared bacteriana, como los β -lactámicos, (Aguayo-Reyes *et al.*, 2023; Avent *et al.*, 2011; Krause *et al.*, 2016; Pagkalis *et al.*, 2011). Cabe destacar que el uso de una terapia empírica combinada puede ser apropiada en el caso de pacientes con riesgo de infección por bacilos Gram negativos MDR y factores de riesgo adicionales (Tamma *et al.*, 2012).

Respecto a la estructura química de estos antimicrobianos, puede estar conformada por alcoholes cíclicos y azúcares (Aguayo Reyes *et al.*, 2023), los cuales pueden ser:

1. Alcoholes cíclicos
 - 1.1. Aminados (aminociclitolos)
 - 1.2. No aminados (ciclitolos)
2. Azúcares
 - 2.1. Aminados (aminoglucósidos)
 - 2.2. No aminados (glucósidos)

El núcleo de los AMG (**Figura 2**) por lo general, es una molécula de ciclohexano saturada con radicales de tipo amina e hidroxilo. Existen dos variantes del núcleo estructural: el núcleo de estreptidina, del cual la estreptomina es el único representante y los núcleos de tipo 2-desoxiestreptamina (2-DOS), que se encuentran en la mayoría de los AMG de uso clínico (Jana & Deb, 2006).

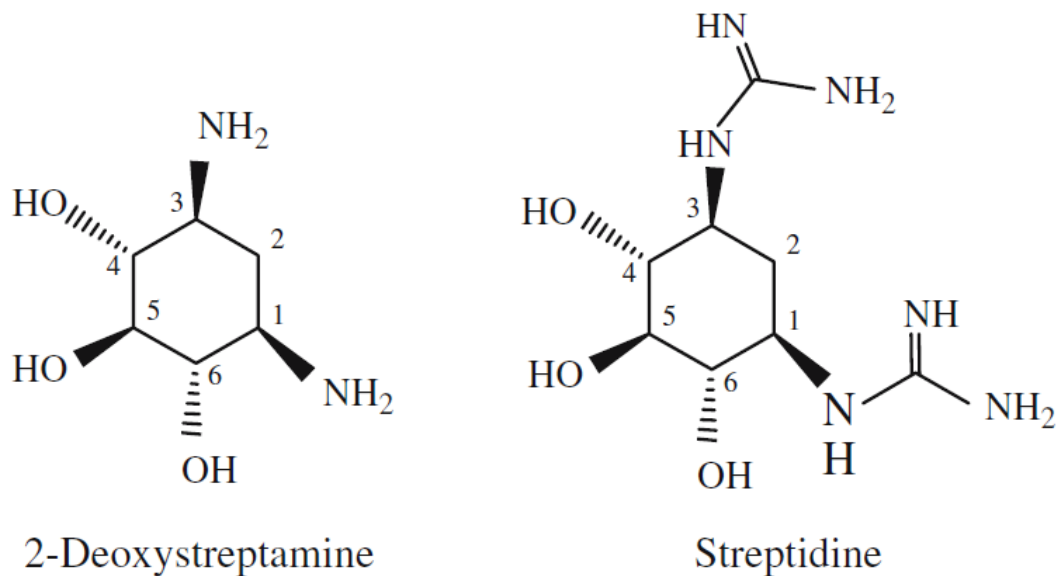


Figura 2. Núcleo estructural de los aminoglucósidos, extraído de Jana & Deb, (2006).

A su vez, el núcleo de los AMG puede estar unido mediante enlaces glucosídicos a uno o más azúcares, que pueden ser aminados o no-aminados (Chittapragada *et al.*, 2009; Jana & Deb, 2006). Dependiendo de la posición de unión de los azúcares al núcleo central se conforman los cuatro grupos de clasificación ilustrados en la **Tabla 1**.

De todos estos grupos, los 4,5-disustituidos-2-DOS; 4,6-disustituidos-2-DOS y otros, tienen un actual rol terapéutico (**Figura 3**).

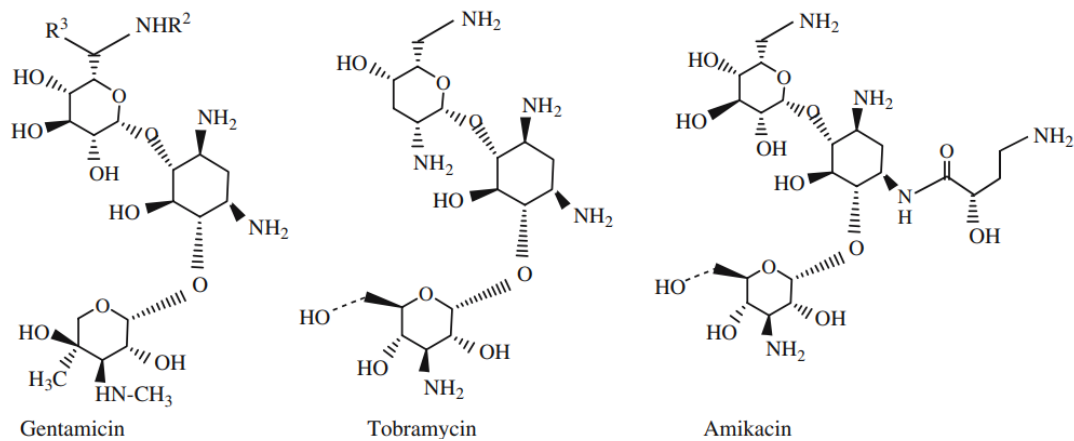


Figura 3. Aminoglucósidos del tipo 4,6 disustituidos 2-DOS, extraído de Jana & Deb, (2006).

Tabla 1. Clasificación de los aminoglucósidos según su estructura química.

Estructura	Aminoglucósidos-aminociclitoles
4-monosustituido	paromamina, apramicina
4,5-disustituidos-2-DOS	ribostamicina, butirosina B, neomicina B, paromomicina y lividomicina A

4,6-disustituidos-2-DOS	Gentamicina-C1, C2 y C3; tobramicina, amikacina, netilmicina, arbecacina, dibecacina, kanamicina-A, B y C; sisomicina, geneticina y plazomicina
Otros	estreptomina, espectomicina, apramicina, higromicina-B, kasumagicina

Respecto a su mecanismo de acción, los AMG actúan afectando la síntesis proteica, ya que se unen al ribosoma, específicamente a la subunidad 30S, formada por el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S), provocando errores en la traducción de proteínas (Lang *et al.*, 2023; Mella *et al.*, 2004). Cabe destacar que los 4,5-DOS y 4,6-DOS también se unen a la subunidad 50S, específicamente al ARN ribosomal 23S (ARNr 23S), impidiendo el ensamblaje y el reciclaje del ribosoma (Lang *et al.*, 2023).

Si bien no se cuenta con total claridad respecto a cómo ingresan los AMG a la célula bacteriana, la teoría que sustenta la farmacocinética de los AMG, mencionada por Lang *et al.* (2023), define la entrada de estos antibióticos a la célula bacteriana en tres etapas (Webster & Shepherd, 2023):

- i) Entrada independiente de energía
- ii) Entrada lineal lenta dependiente de energía (EDP-I)
- iii) Entrada rápida dependiente de energía (EDP-II)

De manera más detallada, la etapa i) se caracteriza por una entrada inicial dependiente de la concentración de AMG en el medio. Este ingreso es posible gracias a la naturaleza policatiónica de los AMG la cual les permite interactuar con estructuras celulares de polaridad negativa, como el lipopolisacárido (LPS),

específicamente, la región del núcleo interno del LPS, conformada por grupos fosfato (Clifton *et al.*, 2015; Kučerka *et al.*, 2008).

De esta forma, los AMG interactúan con el LPS mediante la formación de estructuras tipo puentes de hidrógeno, desplazando los cationes divalentes Mg^{+2} y Ca^{+2} encargados de estabilizar ciertas regiones topológicas del núcleo interno del LPS, así como los AMG son capaces de permeabilizar la membrana externa previo a su paso al espacio periplásmico (Lang *et al.*, 2023). De forma importante, esta disrupción ocurre sin alterar el grosor o fluidez de la membrana, pero induce un desorden e incrementa la dinámica de lípidos de membrana, lo que causa una fuga de material intracelular hacia el espacio extracelular (Lang *et al.*, 2023).

En la etapa ii), llamada EDP-I (*energy dependent phase I*), una pequeña cantidad del AMG atraviesa la membrana interna a través de difusión pasiva dependiente de energía. Esta energía es en realidad un gradiente de protones (ΔpH), conocido como fuerza protón motriz (FPM) formado en el proceso de respiración celular. A su vez, el ΔpH produce un potencial de membrana ($\Delta \psi$).

La etapa iii), llamada EDP-II se basa en la acción de los AMG sobre la síntesis de proteínas, lo cual provoca la producción de proteínas no funcionales, mal plegadas o truncadas. Se plantea que estos productos proteicos, conocidos como proteínas aberrantes, se movilizan e insertan en la membrana celular formando poros, a través de los cuales se incrementa exponencialmente la entrada de AMG a la célula, provocando finalmente una lisis bacteriana.

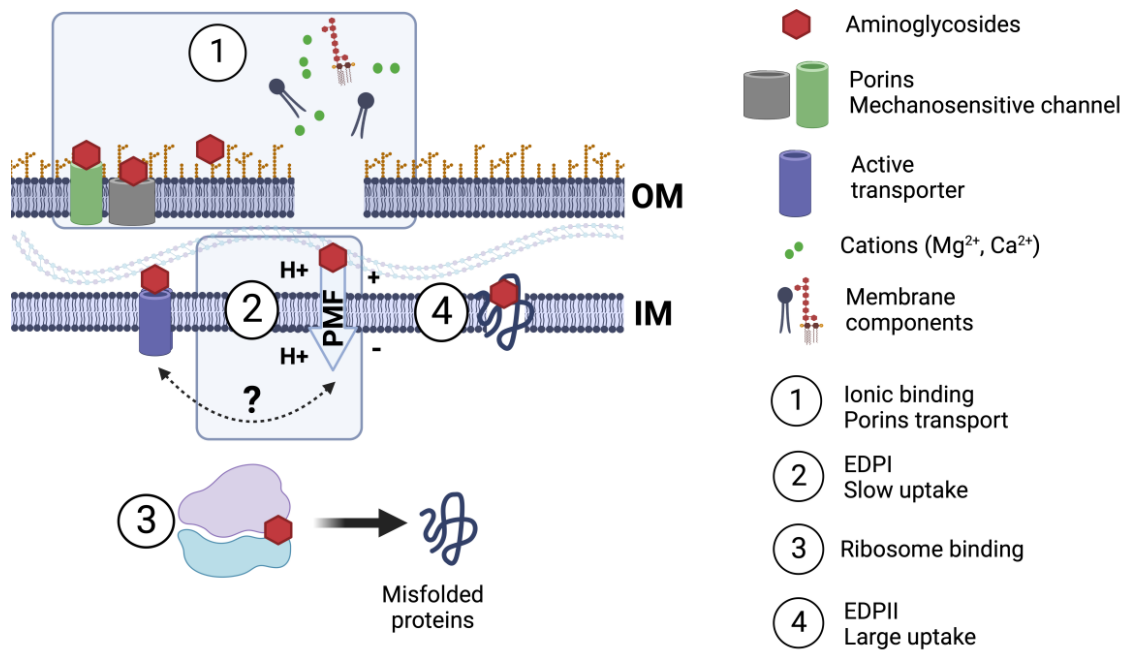


Figura 4. Modelo de entrada de aminoglucósidos en bacterias Gram negativas, recuperado de Lang *et al.* (2023)

Respecto a la farmacocinética, los AMG son eliminados principalmente por vía renal de manera inalterada. Se ha observado que los pacientes con función renal disminuida y los pacientes adultos mayores eliminan los AMG de manera más lenta; por tanto, la vida media ($t_{1/2}$) del fármaco aumenta en comparación con población adulta normal (McLawnon, 2012). El modelo PK/PD que favorece la actividad de los AMG es la concentración máxima sobre la CMI (Aguayo Reyes *et al.*, 2023; Lang *et al.*, 2023; McLawnon, 2012).

Además, los AMG se caracterizan por poseer un efecto post antibiótico (EPA) de tres a siete horas (Isaksson *et al.*, 1988). Generalmente, para asegurar un tratamiento efectivo, minimizar los riesgos de selección de mutantes resistentes

al antibiótico y lograr un EPA óptimo, se recomiendan dosis entre ocho a diez veces la CMI del microorganismo (Aguayo Reyes *et al.*, 2023; Lang *et al.*, 2023). Lamentablemente, sus EA limitan su uso en la clínica. La nefrotoxicidad y ototoxicidad son los EA más importantes de este grupo. La nefrotoxicidad se produce por una bioacumulación de los AMG en la corteza renal, lo que induce un proceso apoptótico y causa una necrosis tubular que puede llevar a una insuficiencia renal aguda (Aguayo Reyes *et al.*, 2023; Lang *et al.*, 2023).

Por otro lado, la ototoxicidad, al igual que la nefrotoxicidad, se produce por una bioacumulación que lleva a la destrucción de células sensitivas vestibulares y cocleares, lo que conduce un deterioro del equilibrio y la audición (Aguayo Reyes *et al.*, 2023; Lang *et al.*, 2023).

Nuevas combinaciones de β -lactámicos más inhibidores de β -lactamasas en la era de las carbapenemasas

Si bien, en los últimos años se han introducido nuevos inhibidores de β -lactamasas, como es el caso de las diazabiciclooctanonas, como avibactam y relebactam, o los boronatos cíclicos, como vaborbactam, con el propósito de tratar infecciones causadas por Enterobacterales productores de carbapenemasas de clase A y D, especialmente KPC, ninguna de estas combinaciones tiene actividad contra bacterias productoras de NDM (Tooke *et al.*, 2019). Por su parte, el β -lactámico aztreonam, que pertenece a la familia de los monobactámicos, no es hidrolizado por las metalo- β -lactamasas (MBLs) como NDM. Lamentablemente, las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que se encuentran ampliamente distribuidas en cepas hospitalarias de *K.*

pneumoniae, son capaces de hidrolizarlo perdiendo de manera importante su acción (Wu *et al.*, 2019). Por lo tanto, avibactam sumado a aztreonam es actualmente la opción terapéutica para Enterobacterales productores de MBLs (Harris *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2019). Lo mencionado previamente se resume en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Perfil de hidrolisis de antimicrobianos y actividad de inhibidores de carbapenemasas.

Familias	AM	SeCBPs	MeCBPs
β-lactámicos	C3G	-	-
	CBP	-	-
	ATM	-	+
Inh. β- lactamasas	Inh. irreversibles	-	-
	DBOs	+	-
	BBs	+	+

AM | antimicrobiano; SeCBPs | serino-carbapenemasas; MeCBPs | metalo-carbapenemasas; C3G | cefalosporinas de tercera generación; ATM | aztreonam; DBOs | diazabicyclooctanonas; BBs | Boronatos bicíclicos; (+) | presenta actividad; (-) | NO presenta actividad. Modificado de Tooke *et al.*, 2019.

***Klebsiella pneumoniae* resistente a antimicrobianos de última línea**

Como se ha planteado previamente, *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos (KpRC) se posiciona como un patógeno de importancia clínica mundial. Para estudiar el fenotipo y genotipo de resistencia presentado por este microorganismo, es necesario conocer que la taxonomía de *Klebsiella* ha estado en constante desarrollo y, es así como actualmente, gracias a técnicas de secuenciación del genoma completo sabemos que *K. pneumoniae* es un miembro más de un grupo heterogéneo, que comparte una identidad nucleotídica del 95-96 % denominado *Klebsiella pneumoniae specie complex*. En el contexto actual, técnicas avanzadas como la espectrometría de masa MALDI-TOF, ampliamente utilizados en centros clínicos a nivel mundial, no son capaces de diferenciar los representantes del complejo de especies de *K. pneumoniae*.

***Klebsiella pneumoniae specie complex* (KpSC)**

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gram negativo asociado comúnmente a infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) (Wyres *et al.*, 2020). Diversos estudios epidemiológicos atribuyen a las infecciones causadas por este microorganismo altas tasas de morbilidad y mortalidad (Wyres *et al.*, 2020). Más aún, la actualización de la lista de patógenos prioritarios, la cual es un documento oficial de la Organización mundial de la Salud (OMS) que tiene por objetivo establecer directrices generales respecto al problema de la RAM, posiciona a KpRC como el microorganismo de mayor prioridad (Geneva: World Health

Organization, 2024), enfatizando el peligro que supone esta bacteria para la salud mundial.

Respecto a la taxonomía, la cual se construye evaluando la identidad nucleotídica promedio de los genomas obtenidos por técnicas de secuenciación del genoma completo, *K. pneumoniae* forma parte de un complejo de cinco especies, distribuidas en siete filogrupos (Kp1 a Kp7): *K. pneumoniae sensu stricto* (Kp1), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp3), *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp4), *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5), *K. quasivariicola* (Kp6) y *Klebsiella africana* (Kp7), siendo Kp1 el representante más prevalente en clínica (Wyres *et al.*, 2020).

Linajes exitosos, ¿casualidad o causalidad?

En biología, nada tiene sentido si no es a la luz de la evolución. Los linajes se establecen por eventos sucesivos de divergencia; estos fenómenos están afectados por múltiples factores que favorecen un linaje por sobre otro. Los linajes, por tanto, estarán sometidos a constantes fenómenos de presión selectiva. Esta presión selectiva está dada en clínica principalmente por el uso de antimicrobianos, lo que conlleva a la selección de aquellos linajes que expresan fenotipos de resistencia a múltiples antimicrobianos (MDR). Adicionalmente, la selección de fenotipos que medien procesos infecciosos de mayor eficacia se conoce como linajes hipervirulentos (Martínez & Baquero, 2002). De esta manera, cada linaje posee un conjunto de genes que, al expresarse, le otorgan ventajas competitivas a dicha bacteria frente a aquellas que no poseen el mecanismo.

Linajes y mecanismos de resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* sensu stricto (Kp1)

La resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae*, se encuentra representada principalmente por ertapenem y esta es mediada por alteraciones en las porinas de membrana externa, especialmente por deleciones o mutaciones en los genes *ompK35* y *ompK36*, que ocasiona la deficiencia de porinas y reducen la permeabilidad a estos antibióticos (Doménech-Sánchez *et al.*, 2003; Poulou *et al.*, 2013). No obstante, en los últimos años se ha observado la emergencia de cepas productoras de carbapenemasas, las cuales contribuyen a un perfil de resistencia ampliado que incluye niveles elevados de resistencia a imipenem y meropenem (Instituto de Salud Pública de Chile, 2022).

Estas enzimas pueden clasificarse de diversas maneras, una de las cuales es la clasificación de Ambler, que las agrupa según sus características moleculares. La clasificación de Ambler distingue cuatro grupos, A, B, C y D. Los grupos A, C y D comparten como característica común presentar en su sitio activo un residuo de serina, siendo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) y OXA-48-like (oxacilinas) las enzimas con la capacidad de hidrolizar carbapenémicos. Por otro lado, las enzimas del grupo B median la hidrólisis de los carbapenémicos en un proceso dependiente de Zinc (Zn^{+2}). Este grupo presenta una gran diversidad de enzimas que, dependiendo de la región geográfica, muestran diferentes distribuciones en las cepas de *K. pneumoniae* (Kp1). Entre ellas, se encuentran principalmente NDM (*New Delhi Metallo- β -lactamase*), VIM (*Verona Integron-encoded Metallo- β -lactamase*) e IMP (*Imipenemase*) (Bush, 2013).

Dependiendo de la región geográfica, la distribución de las carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae* (Kp1) puede variar. Por ejemplo, el estudio ATLAS reporta que, en la región de Asia/Pacífico, los tres genotipos de carbapenemasas

más prevalentes en Enterobacterales fueron NDM, OXA-48-*like* y co-portación de NDM y OXA-48-*like*. En cambio, en Europa, la carbapenemasa más frecuente fue KPC. En Latinoamérica, las carbapenemasas más comunes fueron KPC y NDM (Wise *et al.*, 2024).

En este contexto, el estudio prospectivo, multicéntrico (71 hospitales) CRACKLE-2, analizó genomas de cepas clínicas de *K. pneumoniae* (Kp1) productoras de carbapenemasas de diferentes continentes. En cuanto a los resultados destacados, se identificó que en China el linaje de mayor prevalencia fue el ST11, y los locus capsulares de mayor frecuencia en este linaje fueron KL64 o KL47; en América del Sur, el linaje prevalente fue a el ST11 y sus locus capsulares de mayor frecuencia fueron KL105 y KL39; y en Estados Unidos fue el ST258 junto con los locus capsulares KL107 y KL106 (Wyres & Holt, 2022).

Lamentablemente, la pandemia de COVID-19 produjo un cambio en la epidemiología local. La carga de uso de antimicrobianos en hospitales aumentó drásticamente y la movilización de paciente entre centros de salud de diferentes regiones del país se volvió una práctica habitual, lo que favoreció un cambio epidemiológico y la diseminación de nuevos mecanismos de resistencia que anteriormente se encontraban restringidos a ciertos centros específicos (Allel *et al.*, 2023).

Como se mencionó previamente, en Chile, aunque el último reporte de epidemiología de carbapenemasas en *K. pneumoniae* se publicó en el boletín de 2022, documentos previos del mismo instituto informan que la carbapenemasa de mayor prevalencia es KPC seguida de NDM. En este sentido, datos recopilados durante la pandemia de COVID-19 por el ISP, a través del “Programa de Vigilancia Nacional de Enterobacterales Productores de Carbapenemasas”, actualmente en proceso de publicación, reportan un aumento significativo de cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas. Durante el periodo 2012-2018, se aislaron 251 cepas productoras de KPC y 41 de NDM, mientras

que entre 2019-2022, se aislaron 2175 cepas productoras de KPC y 677 de NDM, lo que indica un aumento de 766 % respecto a KPC y 1533 % a NDM entre el periodo 2012-2018 comparado a 2019-2022, respectivamente. Además, se observó un preocupante aumento de cepas coproductoras de KPC/NDM, KPC/VIM, NDM/VIM y KPC/OXA.

Por lo tanto, las carbapenemasas más frecuentes en *K. pneumoniae* en Chile son KPC y NDM. Sin embargo, la distribución de los linajes que portan estas enzimas aún no se conoce completamente. A nivel global, se considera que la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* (Kp1) productoras de KPC pertenecen al complejo clonal (CC) 258, que incluye los secuencios tipos ST258, ST11, ST340, ST437 y ST512 (Jiang *et al.*, 2010; Wyres *et al.*, 2020). En Chile, el trabajo de Barría-Loaiza *et al.* (2016), estudió 17 cepas de *K. pneumoniae* portadoras de *bla*_{KPC}, de estas identificó que la plataforma genética asociada a la portación del gen *bla*_{KPC} fue el transposón Tn4401a (11 de 17 cepas). Por otro lado, 7 de las 17 cepas incluidas en el estudio presentaron un nuevo ST, designado como 1161 mientras que las cepas restantes fueron ST11, ST101, ST258, ST29 y ST25.

En cuanto a NDM, no existe un consenso sobre a un linaje predominante, aunque se han reportado cepas de los secuencios tipos ST11, ST14, ST15 y ST147 (Dong *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2019). Siendo el ST14, según la literatura, el más prevalente (Wu *et al.*, 2019). Preocupantemente, en China se ha reportado portación de NDM en cepas pertenecientes al ST23, un linaje considerado como hipervirulento (Wu *et al.*, 2019). Aunque este linaje se creía propio de regiones asiáticas, investigaciones recientes han reportado la aparición de cepas del ST23 en Chile (Gálvez-Silva *et al.*, 2023; Morales-León *et al.*, 2023).

Linajes y mecanismos de resistencia a aminoglucósidos

Los mecanismos que median la resistencia a los AMG son, principalmente, enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMA) las cuales presentan un alto grado de especificidad (**Tabla 3**). Por lo general, una EMA confiere resistencia a un AMG, pudiendo utilizar sin problemas otros representantes de la familia (Lang *et al.*, 2023). Desafortunadamente, este no es el caso de las enzimas metiltransferasas de ARNr 16S (16S-RMTasa), las cuales confieren resistencia a todos los AMG de uso clínico. En 2003 se reportó por primera vez una enzima 16S-RMTasa, esta fue RmtA, encontrada en una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* aislada en 1997 en Japón (Yokoyama *et al.*, 2003). En la actualidad, se ha descrito un total de once enzimas, tales como ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH, NpmA y NmpB. De estas, ArmA, RmtB y RtmC son las más frecuentes en la familia Enterobacteriaceae (Kawai *et al.*, 2021; Wachino *et al.*, 2020).

Tabla 3. Espectro de inhibición de aminoglucósidos por EMAs.

Familia	EMA	GEN	AMK	PLZ
AACs	AAC(3)-I	-	+	+
	AAC(3)-VII, AAC(3)-VIII, AAC(3)-IX	-	-	+
	AAC(2')	-	+	+
	AAC(2')-Ia	-	-	-
	AAC(6')-Ib	-	-	+
	AAC(6')-II	-	+	+
	AAC(6')-Ib-cr	+/-	+/-	+
ANTs	ANT(2'')-Ia	-	+	+
APHs	APH(2'')-IVa	+	+	-

EMA | Enzima modificante de aminoglucósidos; AACs | acetiltransferasas; ANTs | nucleotidiltransferasas; APHs | fosforilasas; GEN | gentamicina; AMK | amikacina; PLZ | plazomicina; (+) | presenta actividad; (-) | No presenta actividad; (+/-) | presenta actividad variable. Modificado de Cox *et al.*, 2018; Ramirez & Tolmasky, 2010; Shaw *et al.*, 1993; Toth *et al.*, 2013.

En relación con la prevalencia y distribución de las enzimas 16S-RMTasa en Chile, se dispone de cuatro artículos que las mencionan. El primero, un estudio de Fritsche *et al.* (2008), identificó cepas de *E. cloacae* y *K. pneumoniae*, ambas

portadoras de *rmtD*. En el segundo estudio, realizado por Poirel *et al.* (2014), se reportó una cepa de *K. pneumoniae*, que portaba *rmtG* y presentaba resistencia a cefalosporinas de tercera generación mediada por CTX-M-2. La tercera investigación consistió en un análisis *in silico* de secuencias obtenidas de la base del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Este análisis reveló que ocho cepas de bacterias Gram negativas aisladas en Chile eran portadoras de 16S-RMTasas, tales como *armA* (2), *rmtB* (2), *rmtC* (1), *rmtD* (2) y *rmtG* (1). Estas cepas fueron aisladas desde seres humanos (seis cepas) y de animales (dos cepas) (Sellera *et al.*, 2023). La cuarta publicación corresponde a un estudio realizado por Veloso *et al.* (2023), en el que lograron reconstruir, mediante técnicas de secuenciación del genoma completo y bioinformática, diferentes plásmidos portados por cepas de *K. pneumoniae* aisladas en hospitales chilenos, encontrando portación de *bla*_{NDM-1}, *bla*_{NDM-7} y *bla*_{KPC-2}. Sorprendentemente, el plásmido pVA833-92-IncM2, portaba los genes *bla*_{KPC-2} y *armA*.

Linajes y mecanismos de virulencia

Al igual que el proceso de selección natural que experimentan las poblaciones bacterianas frente a la acción de un antimicrobiano, el proceso de selección está determinado por las barreras inmunes que deben enfrentar los microorganismos. La definición de patógeno considera un escenario polarizado, en el cual se describe como patógeno a aquel microorganismo capaz de causar un cuadro infeccioso. Ahora bien, este proceso de patogenicidad es multifactorial; sin embargo, existen denominadores comunes en cuanto a los mecanismos necesarios para alcanzar dicha categoría (Martínez & Baquero, 2002).

Por otro lado, dentro del concepto de patogenicidad se encuentra la noción de virulencia, término que se refiere al grado infeccioso del patógeno. Este puede estar respaldado por una mayor cantidad de mecanismos de virulencia que favorecen el crecimiento bacteriano en comparación con poblaciones de la misma especie. Cabe destacar que algunos mecanismos de virulencia, al igual que los mecanismos de resistencia a antibióticos pueden ser transferidos mediante transmisión genética horizontal, ejemplo de esto es el plásmido de virulencia de *K. pneumoniae* (Kp1) pvKp el cual porta factores de virulencia de tipo sideróforos como aerobactina (*iuc*) y salmochelina (*iro*) al igual que reguladores del fenotipo mucosoide como *rmpADC* (Wyres *et al.*, 2020). Esto hace crucial estudiar ambos fenómenos de manera integral, considerándolos no como eventos antagónicos, sino como características vitales y necesarias para comprender la evolución de las poblaciones microbianas (Martínez & Baquero, 2002).

La evolución de las poblaciones de bacterias resistentes está determinada por una interacción estrecha con su anfitrión a lo largo de la historia. Los genes que codifican mecanismos de virulencia pueden estar presentes a nivel cromosómico, como islas genómicas (islas de patogenicidad), o en elementos genéticos móviles, como plásmidos o regiones de fagos (Martínez & Baquero, 2002).

Uno de los problemas respecto a la definición de virulencia es que, dependiendo del microorganismo, la determinación de aquel con un mayor grado de virulencia suele evaluarse en función de la gravedad del cuadro clínico observado (Martínez & Baquero, 2002).

En general, los factores de virulencia conocidos y considerados importantes según la literatura son la cápsula, el lipopolisacárido (LPS), los sideróforos y las fimbrias. (Paczosa & Mecsas, 2016; Russo & Marr, 2019).

Específicamente, en *K. pneumoniae*, Lam *et al.* (2021) estableció un puntaje de virulencia basado en tres genes marcadores, los sideróforos yersiniabactina (*ybt*)

y aerobactina (*iuc*) y la genotoxina colibactina (*clb*). Si bien este puntaje facilita la identificación de cepas clasificadas como virulentas e hipervirulentas, nuevos estudios han sugerido la necesidad imperante de considerar nuevos genes de virulencia en el estudio del viruloma de *K. pneumoniae*, como la microcina E492, la cual es una microcina siderófora que posee la capacidad de eliminar a otras bacterias mediante un mecanismo de caballo de Troya y aumentan la capacidad de colonización de cepas de *K. pneumoniae* hipervirulenta (Tan *et al.*, 2024). Ahora bien, actualmente, se reconoce en *K. pneumoniae* (Kp1) un sublinaje definido como SL23, el que es considerado hipervirulento. Esto se debe a que las infecciones que causa suelen ser de origen comunitario y se caracterizan por la formación de abscesos en pacientes inmunocompetentes, lo que las diferencia de las infecciones causadas por el fenotipo clásico de *K. pneumoniae*. En este contexto, la hipervirulencia se ha asociado principalmente a un plásmido de virulencia que porta diferentes genes codificantes de sideróforos (operón *iuc*, operón *iro*) y reguladores de fenotipos mucoides (operón *rmp*) (Hennart *et al.*, 2022; Lam *et al.*, 2021; Paczosa & Meccas, 2016; Russo, Alvarado, *et al.*, 2024; Russo, Carlino-MacDonald, *et al.*, 2024; Russo & Marr, 2019).

Elementos genéticos móviles

Los elementos genéticos móviles (*MGE*, del inglés *mobile genetic elements*) son definidos como secuencias codificantes de ADN que median el movimiento de ADN intracelular o extracelularmente. Todos los elementos genéticos que tributen a esta movilidad constituirán el moviloma (Baquero *et al.*, 2021). Entre éstos encontramos los plásmidos, definidos como moléculas de ADN

extracromosomales con capacidad auto replicativa que son capaces de coexistir junto con cromosomas (Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). De esta forma, los plásmidos poseen un importante rol en cuanto a la diseminación de genes de resistencia a antimicrobianos a nivel intra e interespecies (Baquero *et al.*, 2021; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021). Adicionalmente, existen diferentes formas de agruparlos, una de ellas es en base a la diversidad de su maquinaria de replicación y conjugación (Baquero *et al.*, 2021).

Los MGE de tipo transponibles se han agrupado históricamente a través de la diversidad de transposasas, las que son proteínas que permiten su auto movilización (Baquero *et al.*, 2021). Dentro de estos elementos transponibles encontramos a las secuencias de inserción IS (*insertion sequence*) las que son el MGE más simple.

Elementos genéticos móviles asociados a diseminación de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas en *K. pneumoniae* (Kp1)

Como se detalló previamente, las carbapenemasas encontradas con mayor frecuencia en *K. pneumoniae* son KPC y NDM, seguidas de OXA-48-like, VIM e IMP, con sus respectivas diferencias en prevalencia asociadas a la región geográfica estudiada.

En el caso de KPC, el gen codificante *bla*_{KPC} se encuentra transportado en el transposón Tn4401, perteneciente a la familia Tn3 (Chen *et al.*, 2014). Adicionalmente, se ha encontrado *bla*_{KPC} en plataformas no relacionadas con Tn4401, denominadas como NTE_{KPC} (non-Tn4401 *elements*). En Chile, se han reportado ambas plataformas, la convencional, ampliamente distribuida, y la no convencional, como fue mencionado por Wozniak *et al.* (2021).

En este último caso, se identificó el elemento NTE_{KPC-IIe} en cepas de *K. pneumoniae* y *Escherichia coli*. A su vez, Barría-Loaiza *et al.* (2016) lograron identificar NTE_{KPC} en cepas de *K. pneumoniae*.

Respecto a NDM, la movilización está dada principalmente a través de plásmidos. El estudio publicado por Li *et al.* (2023) informa que la portación de NDM presenta variaciones según la localización geográfica. Por ejemplo, los plásmidos de tipo IncX portarían con mayor frecuencia NDM en Asia del Este, mientras que los plásmidos de tipo IncFI portarían NDM con mayor frecuencia en América del Norte. Además, la plataforma genética de *bla*_{NDM} está compuesta por una región río arriba, que siempre incluye una IS, generalmente una IS_{Aba125}, y una región río abajo conservada que contiene los genes *ble*_{MBL}, *trpF*, *dsdB*, *cutA*, *groES-groEL* y otra IS.

Respecto a VIM e IMP, no existen estudios que realicen un análisis comparativo de las plataformas genéticas que transportan estos genes. Sin embargo, análisis genómicos de *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP} aislados de cepas provenientes de las regiones del sur de Europa y el sudeste asiático muestran una asociación de ambos genes con integrones de clase 1 (Taggar *et al.*, 2020).

Por otro lado, a diferencia de otras oxacilinasas, *bla*_{OXA-48-like} no está asociada a integrones de clase 1, sino a la plataforma Tn1999 y sus respectivas variantes: Tn1999.2, Tn1999.3, Tn1999.4 y Tn1999.5 (Boyd *et al.*, 2022).

Por otro lado, los genes codificantes de metiltransferasas constituyen una gran familia con una amplia distribución que no ha sido tan bien estudiada como las carbapenemasas. Sin embargo, existen estudios que reportan la diversidad de plataformas genéticas en las cuales estos genes se encuentran insertos (Yang & Hu, 2022). Cabe destacar que, al igual que las carbapenemasas, los genes codificantes de metiltransferasas de ARNr 16S se movilizan principalmente a través de plásmidos (Yang & Hu, 2022).

El gen *armA* se ha asociado con la IS26, mientras que el gen *rmtA* se ha encontrado en el transposón de resistencia a mercurio *Tn5041*, flanqueado por *IS6100*. El gen *rmtB* se ha asociado con elementos como *ISCR1*, *ISCfr1* e *IS26*. Por su parte, el gen *rmtC* se ha vinculado con *ISEcp1*, que pertenece a la familia *IS1380*; este elemento flanquea a *rmtC* y contiene un gen codificante de transposasa (*tnpA*), que otorga una actividad promotora para la expresión de *rmtC* (Yang & Hu, 2022).

En cuanto a *rmtD*, este gen se ha encontrado localizado en el transposón *Tn21*. El gen *rmtE1* fue identificado en un elemento *ISCR20-like* y junto a un elemento *IS1294-like*, mientras que *rmtE2* se encontró entre los elementos *ISCR20-like* e *ISVs1-like*. Por otro lado, *rmtE3* se asoció con una transposasa similar a *ISVs1-like* (Yang & Hu, 2022). Respecto al gen *rmtF*, este se encontró asociado con los elementos *ISCR5*. Estudios recientes también han identificado elementos como *Tn3*, *Tn1721*, *IS91* e *IS6100* flanqueando a los genes *rmtF1* y *rmtF2* (Yang & Hu, 2022). Por otra parte, el gen *rmtG* se ha encontrado generalmente inserto en un *Tn3*. Además, en regiones reportadas como de multiresistencia, *rmtG* se identificó flanqueado por *ISCR2* e *IS91-like* (Yang & Hu, 2022). Por su parte, el gen *rmtH* se localizó en el transposón *Tn6329*, flanqueado por *IS26* e *ISCR2*, mientras que, los entornos genéticos de los genes *npmA* y *npmB* aún no han sido estudiados en detalle (Yang & Hu, 2022).

Por todo lo descrito anteriormente, en Chile no se dispone de información que dé cuenta de la situación respecto al estado de portación de genes codificantes de enzimas 16S-RMTasa y carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae*, los linajes asociados y las plataformas en las que se encuentren insertos estos genes.

Pregunta de investigación

¿Los genes de metiltransferasa de ARNr 16S y carbapenemasas portados por cepas de *K. pneumoniae* aisladas en hospitales de Chile se encontrarán en la misma plataforma genética móvil, y a su vez estas cepas compartirán un mismo linaje?

Hipótesis de trabajo

En cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico los genes codificantes de metiltransferasa de ARNr 16S y carbapenemasas se encuentran en la misma plataforma genética móvil y, a su vez, estas cepas comparten un mismo linaje.

Objetivo general

Estudiar la epidemiología molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en hospitales de Chile portadoras de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas.

Objetivos específicos

1. Determinar la presencia de genes de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a aminoglucósidos y carbapenémicos.
2. Establecer el linaje de las cepas de *K. pneumoniae* portadoras de genes de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas.
3. Caracterizar las plataformas genéticas donde se encuentren insertos los genes de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas portados por cepas de *K. pneumoniae*.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

Se analizaron 36 cepas de *Klebsiella pneumoniae* que cumplieron el criterio de inclusión, el cual fue ser resistentes a los aminoglucósidos amikacina y gentamicina y a los carbapenémicos imipenem y meropenem determinado mediante test de Kirby-Bauer según criterio CLSI 2023. Las 36 cepas fueron aisladas entre los años 2012 y 2023 desde el Hospital Sótero del Río (5), el Hospital Guillermo Grant Benavente de Concepción (26). Además, se incluyeron 5 cepas recuperadas por el Instituto de Salud Pública de Chile. Todas las cepas fueron crioconservadas a -80 °C en una mezcla de caldo Tripticasa-Soya (OXOID™) y glicerol al 50 % v/v en una relación 2:1. Todas las cepas forman parte de la colección del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA), perteneciente al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Estudios Moleculares

Extracción ADN para PCR convencional

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando una solución de Chelex® (Bio-Rad ®) al 5 % p/v. Para ello, las cepas se cultivaron en agar Tripticasa-Soya (ATS) (OXOID™) durante 18-24 h a 35 ± 2 °C. A partir del cultivo en agar, se

seleccionaron 4-5 colonias aisladas, las cuales se resuspendieron en un tubo Eppendorf con 1 mL de agua estéril, y se centrifugaron durante 1 min a 14.000 rpm. Luego, se eliminó el sobrenadante, se añadió 100 µL de Chelex® al 5 %, y la mezcla se homogenizó en un vortex durante 20 s, seguido de una ebullición a 100 °C durante 10 min. Posteriormente, se homogenizó nuevamente en un vortex durante 10 s y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. Finalmente, se recuperó un volumen de 70 µL del sobrenadante, el cual se almacenó a -20 °C para análisis posteriores.

Determinación de genes codificantes de metiltransferasas de ARNr 16S

La detección de genes que codifican metiltransferasas de ARNr 16S (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* y *rmtH*) se llevó a cabo mediante PCR convencional utilizando el termociclador MiniAmp Plus (Applied Biosystems). La mezcla de PCR tenía un volumen total de 10 µL (5 µL de GoTaq® G2 Master Mix, 0,2 µL de cada partidor (25uM) y 3,6 µL de agua libre de nucleasas). Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con el generador de imágenes MaestroSafe™ y el transiluminador UVITEC (Cambridge). Se utilizaron como controles las cepas *K. pneumoniae*-UCO398 (*rmtG*), *Pseudomonas aeruginosa*-UCO397 (*rmtD*), *K. pneumoniae*-UCO399 (*rmtB*), *Enterobacter cloacae*-UCO400 (*rmtA*), *Escherichia coli*-UCO401 (*rmtE*) y *K. pneumoniae*-P88 (*rmtC*). En la **Tabla 4** se presenta la lista de partidores y secuencias, el tamaño de los amplicones y los programas de PCR que se utilizaron.

Detección de genes codificantes de carbapenemasa

La detección de genes de resistencia a carbapenémicos (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} y *bla*_{OXA-48}) se realizó mediante PCR convencional utilizando el termociclador MiniAmp Plus (Applied Biosystems). (Doosti *et al.*, 2013; Pillai *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2018). La mezcla de PCR tenía un volumen total de 10 µL (5 µL de GoTaq® G2 Master Mix, 0,2 µL de cada partidor (25uM) y 3,6 µL de agua libre de nucleasas). Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con el generador de imágenes MaestroSafe™ y el transiluminador UVITEC (Cambridge). Se utilizaron como controles *K. pneumoniae*-UCO318 (*bla*_{KPC}), *K. pneumoniae*-K2044 (*bla*_{NDM}), *Serratia marcescens*-UCO143 (*bla*_{IMP}), *K. pneumoniae*-K2070 (*bla*_{VIM}) y *K. pneumoniae*-UCO322 (*bla*_{OXA-48}). En la **Tabla 5**. Partidores utilizados para la amplificación por PCR convencional de genes codificantes de carbapenemasas., el tamaño de los amplicones y los programas de PCR que se utilizaron.

Tabla 4. Partidores utilizados para la amplificación mediante PCR convencional de genes codificantes de metiltransferasas de ARNr 16S.

Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón (pb)	Programa PCR	Referencia
<i>armA</i>	F - AGGTTGTTTCCATTTCTGAG R - TCTCTTCCATTCCCTTCTCC	590	95°C 5 min, [95°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 30 s] 30 ciclos, 72°C 5 min	Kim, J., <i>et al.</i> 2008.
<i>rmtA</i>	F - ACTGTGATGGGATACGCGTC R - AGCGATATCCAACACACGATGG	315	93°C 5 min, [93°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min] 35 ciclos, 72°C 5 min	Zhao, F., <i>et al.</i> 2013.
<i>rmtB</i>	F - ATGAACATCAACGATGCCCTC R - TTATCCATTCTTTTTTATCAAGTATAT	756	93°C 2 min, [93°C 20 s, 50°C 1 min, 72°C 1 min] 30 ciclos, 72°C 5 min	Zhang, T., <i>et al.</i> 2017.
<i>rmtC</i>	F - ATGAAAACCAACGATAATTAT R - TTAACAATCTCGATACGATAAAATAC	846	95°C 1 min, [94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min] 33 ciclos, 72°C 4 min	Gholami, M., <i>et al.</i> 2017.
<i>rmtD</i>	F - ATGAGCGAACTGAAGGAAAACTGCT R - TCATTTTCGTTTCAGCACGTAAAACAG	744	93°C 2 min, [93°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min] 35 ciclos, 72°C 5 min	Zhao, F., <i>et al.</i> 2013.
<i>rmtE</i>	F - TGATTGATTCCTCCGTTTTTG R - ATGAATATTGATGAAATGGTTGC	818	94°C 5 min, [94°C 30 s, 55°C 30 s, 70°C 30 s] 30 ciclos, 72°C 5 min	Wang, Y., <i>et al.</i> 2016.
<i>rmtG</i>	F - AAATACCGCGATGTGTGTCC R - ACACGGCATCTGTTTCTTCC	251	95°C 2 min, [95°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 45 s] 30 ciclos, 72°C 5 min	Bueno, M., <i>et al.</i> 2013.
<i>rmtF</i>	F - GCTGAACCCGATCCTACTGG R - TCCGACACCGTAAATCGGTC	384	95°C 2 min, [95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min] 30 ciclos, 72°C 5 min	Elaboración propia
<i>rmtH</i>	F - CAGGTGAAAAGCAGGCAAG R - TTTGGGCATAGGGGGTTAGC	259	95°C 2 min, [95°C 1 min, 59°C 1 min, 72°C 1 min] 30 ciclos, 72°C 5 min	Elaboración propia

Tabla 5. Partidores utilizados para la amplificación por PCR convencional de genes codificantes de carbapenemasas.

Gen	Secuencia 5'-3'	Tamaño amplicón (pb)	Programa PCR	Referencia
<i>bla_{KPC}</i>	F - ATGTCACTGTATCGCCGTCT R - TTTTCAGACCCTTACTGCCC	893	95°C 15 min, [94°C 1 min, 62°C 1 min, 72°C 1 min] 38 ciclos, 72°C 10 min	Pillai, D. R., <i>et al.</i> 2009.
<i>bla_{NDM}</i>	F - GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT R - GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC	782	95°C 5 min, [95°C 20 s, 65°C 20 s, 72°C 1 min] 35 ciclos, 72°C 5 min	Chen, Y., <i>et al.</i> 2019.
<i>bla_{VIM}</i>	F - CCGATGGTGTGTTGGTCGCAT R - GAATGCCGAGCACCCAGGAT	391	95°C 5 min, [72°C 7 min, 72°C 1 min, 58°C 1 min] 35 ciclos, 72°C 1 min	Poirel, L., <i>et al.</i> 2011.
<i>bla_{IMP}</i>	F - GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R - GGTTTAAAYAAAACAACCA CC	232	95°C 5 min, [94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 2 min] 40 ciclos, 72°C 10 min	Iran. Doosti, M., <i>et al.</i> 2013.
<i>bla_{OXA-48}</i>	F - GCGTGGTTAAGGATGAACAC R - CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	94°C 10 min, [94°C 30 s, 52°C 40 s, 72°C 50 s] 36 ciclos, 72°C 5 min	Nordmann, P., <i>et al.</i> 2011.

Genotipificación molecular (ERIC-PCR)

Los ensayos de genotipificación molecular se llevaron a cabo mediante ERIC-PCR utilizando el partidor ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') para amplificar la secuencia ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) (Vila *et al.*, 1996). La mezcla de PCR se preparó en un volumen final de 20 μ L, que incluyó 10 μ L de GoTaq® G2 Green Master Mix, 0,8 μ L del partidor (25 μ M), 0,4 μ L de MgCl₂ (25 mM) y 4,8 μ L de agua libre de nucleasas. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % utilizando el visualizador MR-031201-MaestroSafe™. Finalmente, el dendrograma se construyó mediante el método de la media no ponderada de grupos pareados (UPGMA) utilizando el coeficiente de similitud de Dice y una tolerancia de posición de banda del 2 %. El coeficiente de Dice consideró una similitud >90 % como cepas genéticamente relacionadas utilizando el software GelJ v.2.0 (Heras *et al.*, 2015).

Estudios genómicos

Extracción de ADN para la secuenciación del genoma completo

La extracción de ADN para la secuenciación del genoma completo mediante la plataforma Illumina® se llevó a cabo utilizando el kit de extracción InstaGene Matrix® (Bio-Rad). Las cepas se cultivaron en medio de crecimiento ATS (OXOID™) durante 18-24 h a 35 ± 2 °C. Posteriormente, se seleccionaron 4-5

colonias aisladas, las cuales se resuspendieron en un tubo Eppendorf con 1 mL de agua estéril, y fueron centrifugadas durante 1 min a 14.000 rpm. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron 200 μ L de Chelex® al 5% (Bio-Rad), se homogenizó la mezcla en un vortex durante 20 s, y se incubó a 100 °C durante 10 min. A continuación, se homogenizó nuevamente en un vortex durante 10 s y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min, recuperando un volumen de 100 μ L del sobrenadante, el cual se almacenó a -20 °C. El rendimiento y la pureza del ADN recuperado se determinó utilizando el espectrofotómetro EPOCH (Biotek) junto con la placa TAKE3 (Biotek), considerando rangos óptimos de pureza valores entre 1,9 y 2,1 de la relación de absorbancia 260/280.

Secuenciación del genoma completo

La secuenciación del genoma completo se llevó a cabo utilizando la tecnología Illumina®. Para este propósito, se contrataron los servicios de SeqCenter, Estados Unidos (<https://www.seqcenter.com>), donde se empleó la plataforma Illumina® NextSeq2000 (150 pb paired-end). Posteriormente, se evaluó la asignación taxonómica de las lecturas mediante Kraken2 v2.13 (Wood *et al.*, 2019). Luego, el control de calidad y *trimming* fue realizado mediante FastQC v0.12.1 (Andrews, 2010) y FastP v0.23.4 (S. Chen *et al.*, 2018), respectivamente. Se realizó el ensamblaje *de novo* de las secuencias utilizando la herramienta Shovill v1.1.0 (Seemann, 2017) que integra el ensamblador SKESA v2.5.1 (Souvorov *et al.*, 2018). La calidad del ensamblaje fue evaluada mediante QUAST v5.2.0 (Gurevich *et al.*, 2013) y CheckM v1.2.3 (Parks *et al.*, 2015). Cabe destacar que no existió un criterio de selección para los genomas secuenciados en esta

tesis. Estos se encontraban disponibles en el la base de datos del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos y coincidieron con las cepas a estudiar.

Construcción de la base de datos de genomas de *K. pneumoniae* (Kp1)

Se descargaron 21.219 genomas de *K. pneumoniae specie complex*, los que correspondieron a la totalidad informada en la base de datos NCBI-Refseq hasta la fecha 16.09.2024 junto con su *metadata*. De éstos, se seleccionaron 991 genomas que pertenecieran a la región de América del Sur. Posteriormente, mediante la herramienta AMRFinderPlus v3.12.8 (Feldgarden *et al.*, 2021) se identificaron 145 genomas que portaron genes codificantes de metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas. Finalmente, de estos 145 genomas, se trabajó con aquellos que cumplieron criterios de calidad propuestos por Hennart *et al.* (≥ 1.000 contigs, tamaño del genoma ≤ 4.5 Mpb o ≥ 6.5 Mpb, contenido GC $> 59\%$ y ANI $< 96\%$ respecto al genoma de referencia de la cepa HS11286 (código de acceso: GCF_000240185.1), los que, finalmente, fueron 133 genomas. Los análisis previamente mencionados fueron realizados con las herramientas QUAST v5.3.0 (Gurevich *et al.*, 2013); CheckM v1.2.3 (Parks *et al.*, 2015); y FastANI disponible en Galaxy Australia (toolshed.g2.bx.psu.edu/repos/iuc/fastani/fastani/1.3).

Los 133 genomas filtrados desde NCBI-Refseq junto a los 6 genomas secuenciados en este trabajo recibirán la denominación de base de datos Ω DB.

Análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó con los 139 genomas de la Ω DB. Para establecer el ST de los genomas se utilizó la herramienta Kleborate v3.0.8 (Lam *et al.*, 2021). Para el análisis filogenético, la asignación de los sublinajes (SL) y grupos clonales (CG) se utilizó el esquema cgMLST de 629 loci propuesto por (Hennart *et al.*, 2022) disponible en la página web PathogenWatch (<https://pathogen.watch/>).

Estudio de genes de resistencia, virulencia serotipos capsulares y antígenos O

La determinación de genes de resistencia a antimicrobianos y metales pesados fue realizada mediante la herramienta AMRFinderPlus v3.12.8 (Feldgarden *et al.*, 2021), mientras que la determinación de genes de virulencia, serotipos capsulares y antígenos O fue realizada mediante la herramienta Kleborate v3.0.8 (Lam *et al.*, 2021).

Estudio de plataformas genéticas asociadas a metiltransferasas de ARNr 16S y carbapenemasas

Mediante la herramienta MOB-suite v3.0.3 (Robertson & Nash, 2018), se identificó tanto los grupos de incompatibilidad, los contigs asociados a plásmidos utilizando los genes de replicación, genes codificantes de proteínas de movilización y genes asociados al origen de transferencia. Posteriormente, se empleó la herramienta *Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) v2024-

07-18.build7555 (Tatusova *et al.*, 2016) para describir el entorno genético asociado a las 16S-RMTasas y carbapenemasas. Además, la herramienta ISFinder (Siguier *et al.*, 2006) se utilizó para corroborar las secuencias de inserción anotadas por PGAP. Para analizar el grado de homología de plásmidos se utilizó la herramienta FastANI disponible en GalaxyAustralia (toolshed.g2.bx.psu.edu/repos/iuc/fastani/fastani/1.3).

RESULTADOS

En las 36 cepas de *K. pneumoniae specie complex* resistentes a aminoglucósidos y carbapenémicos incluidas en esta tesis, se identificó la presencia de los siguientes genes de 16S-RMTasa, *armA* (6), *rmtC* (24), *rmtD* (2) y *rmtG* (3), en el caso de las carbapenemasas se detectó los genes *bla_{KPC}* (10), *bla_{NDM}* (23) y *bla_{VIM}* (1). En la **Tabla 6** se presentan las diversas co-portaciones de genes encontrados en las cepas estudiadas. Se pudo observar que la co-portación de genes más frecuente correspondió *rmtC* + *bla_{NDM}* (22 cepas) seguido de *armA* + *bla_{KPC}* (5 cepas). En menor frecuencia se encontró la co-portación de *rmtG* + *bla_{KPC}* (3 cepas), *armA* + *bla_{NDM}* (1 cepa), *rmtD* + *bla_{KPC}* (1 cepa), *rmtD* + *bla_{VIM}* (1 cepa). Cabe destacar que en 1 cepa se detectaron dos genes de 16S-RMTasa, *armA* + *rmtC*, asociados a *bla_{NDM}*, como así también se detectaron 2 cepas portando dos genes de carbapenemasas, *bla_{KPC}* + *bla_{NDM}*, asociados a *rmtC*.

Tabla 6. Genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (CBP) detectados en cepas de *K. pneumoniae*.

Cepa	16S-RMTasa	CBP
K2040, K2041, K2042, K2043 y UCO318	<i>armA</i>	<i>bla_{KPC}</i>
K2044	<i>armA</i>	<i>bla_{NDM}</i>
1U, 6U, 10U, 11U, 13U, 14U, 16U,19U, 24U, 29U, 33U, 34U, 35U, 36U, 36U, 38U, 40U, 41U, 43U, 44U, K2067 y P88	<i>rmtC</i>	<i>bla_{NDM}</i>
17U y 28U	<i>rmtC</i>	<i>bla_{KPC} & bla_{NDM}</i>
7U	<i>armA & rmtC</i>	<i>bla_{NDM}</i>
UCO-384	<i>rmtD</i>	<i>bla_{KPC}</i>
K2070	<i>rmtD</i>	<i>bla_{VIM}</i>
UCO-333, UCO-340, UCO-341	<i>rmtG</i>	<i>bla_{KPC}</i>

Denominación | K (cepario del LIAA, Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos); U (Hospital Guillermo Grant Benavente); UCO (Universidad de Concepción).

Genotipificación de cepas de *K. pneumoniae*

Los resultados del estudio de relación genética entre las 36 cepas co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas se muestra en la **Figura 5**. Se obtuvieron 5 *clusters*, cada *cluster* está conformado por cepas que poseen una estrecha relación genética, pudiendo ser, potencialmente clones. El *cluster* 5 fue el que estuvo formado por el mayor número de cepas (18 cepas), de las cuales 16 cepas co-portaban los genes *rmtC+bla_{NDM}* y dos cepas *rmtC+bla_{KPC}+bla_{NDM}*. En este *cluster* todas las cepas provenían de la ciudad de Concepción y fueron aisladas el año 2023.

Respecto a los otros *clusters*, el *cluster* 2 estuvo formado por tres cepas, siendo dos co-portadoras de los genes *rmtG+bla_{KPC}*, ambas cepas aisladas en Santiago el 2013. La tercera cepa fue co-portadora de *armA+bla_{KPC}*, también aislada en Santiago el año 2019.

El *cluster* 1 estuvo formado por 3 cepas, dos co-portaron *rmtC+bla_{NDM}*, ambas aisladas en Concepción, los años 2019 y 2021. La tercera cepa correspondió a una cepa aislada en Santiago el año 2013 y, que co-portaba los genes *rmtG+bla_{KPC}*.

En relación con el *cluster* 3, estuvo formado por tres cepas co-portadoras de *armA+bla_{KPC}*, todas aisladas en Santiago el año 2019. Finalmente, el *cluster* 4 estuvo constituido por 3 cepas, de estas, dos portaron los genes *rmtC+bla_{NDM}* y una portó *armA+rmtC+bla_{NDM}*, todas fueron aisladas en Concepción el año 2023. Finalmente, seis cepas no estuvieron relacionadas genéticamente (UCO318, 44U, K2070, K2044, 14U y UCO384) presentando las siguientes co-portaciones, *armA+bla_{KPC}*, *rmtC+bla_{NDM}*, *rmtD+bla_{VIM}*, *arma+bla_{NDM}* y *rmtD+bla_{KPC}*.

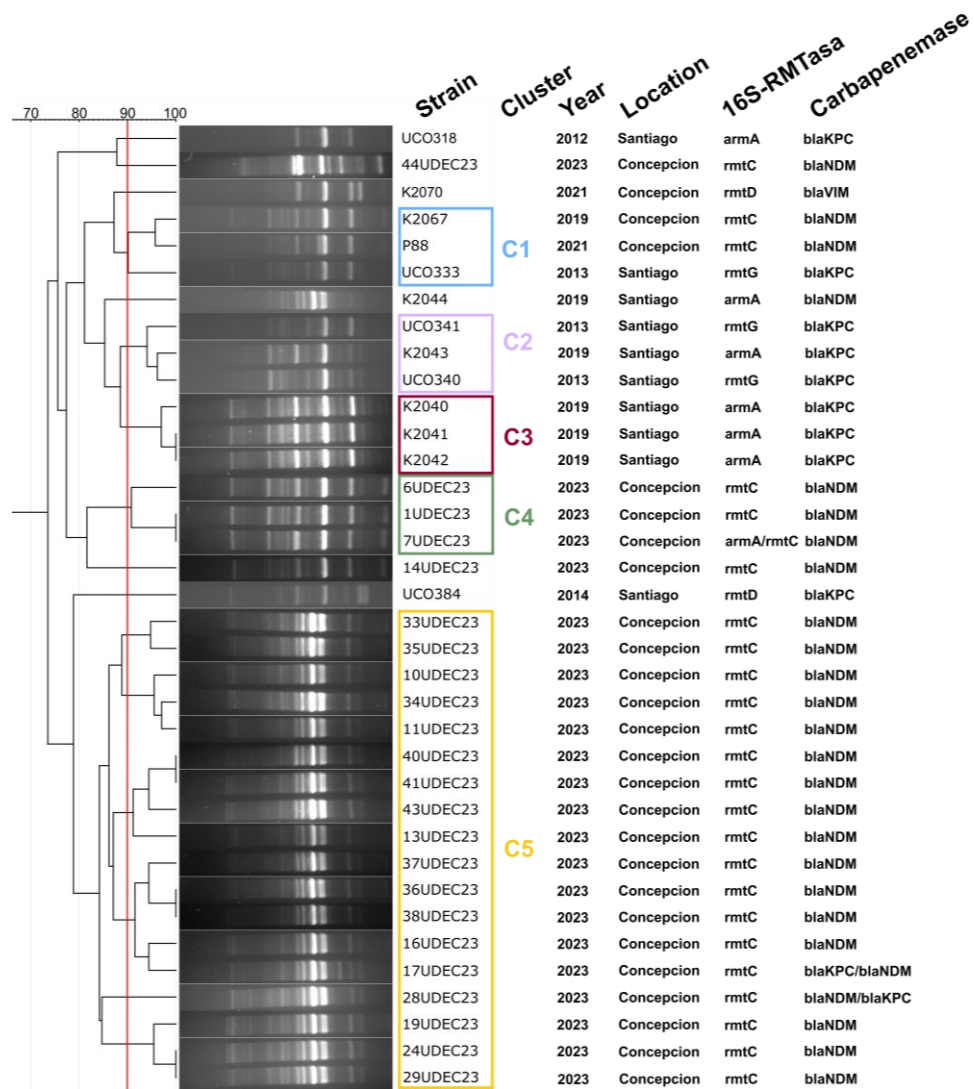


Figura 5. Relación genética de 36 cepas de *K. pneumoniae* co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas.

Análisis genómico de *K. pneumoniae* co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas

Respecto a los genomas de las cepas secuenciadas en el presente trabajo, la totalidad de estas (seis) provenía de Concepción, dos cepas fueron aisladas el 2021 y cuatro el 2023. El análisis del cgMLST indicó que cuatro cepas (17U, 28U, 40U, 41U) pertenecían al ST 25, sublinaje (SL) 25 y grupo clonal (CG) 10224, mientras que las otras dos cepas (P88 y K2070) pertenecían al ST11 y ST5830, compartiendo el SL258 y CG340.

De la misma manera, se analizó el linaje de los 133 genomas desde la base de datos Ω DB (Anexo 3), los que provenían de 7 países de América del Sur (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela). En la **Figura 6** y **Figura 7** se observa la distribución geográfica de los linajes identificados. En los 133 genomas se observó una diversidad de quince secuencia tipos (ST258, ST11, ST25, ST437, ST340, ST16, ST874, ST378, ST442, ST629, ST629-3LV, ST129, ST219, ST5 y ST5830); diez sublinajes (SL258, SL17, SL25, SL874, SL378, SL629, SL107, SL442, SL1082 y SL5) y doce grupos clonales (CG258, CG340, CG10224, CG5, CG16, CG107, CG378, CG629, CG442, CG874, CG1082 y CG10268).

De manera relevante, el mayor número de genomas provenía de Brasil (107 genomas), detectándose en ellos diversos ST, como ST258 (n=88), ST11 (n=17), ST436 (n=6), ST340 (n=4), ST16 (n=3), ST874 (n=3) y ST442 (n=2). Respecto a la nomenclatura obtenida mediante el esquema de cgMLST, se encontró que el SL258 (n=92) estuvo comprendido por el CG258 (n=70), CG340 (n=16) y CG10268 (n=6). El SL17 (n=3) por CG16 (n=3). El SL874 (n=3) por CG874 (n=3). El SL378 por CG378 (n=2). El SL107 (n=1) por CG107 (n=1), el SL442 (n=1) por CG442 (n=1) y el SL1082 (n=1) por CG1082 (n=1). Adicionalmente, a cuatro

genomas pertenecientes a los ST258 (n=2), ST442 (n=1) y ST629-3LV (n=1) no fue posible asignarles (NA) una denominación de SL o CG mediante el esquema de cgMLST debido a que presentaron <600 genes requeridos por el esquema (Anexo 3).

En relación con los 9 genomas provenientes de Argentina, se encontró la siguiente distribución ST258 (n=7), SL258 (n=7), CG258 (n=7) y ST11 (n=2), SL258 (n=2), CG340 (n=2). Información muy similar fue obtenida para los 5 genomas que provenían de Perú, los cuales fueron ST258 (n=4), SL258 (n=4), CG258 (n=4) y ST11 (n=1), SL258 (n=1) y CG340 (n=1), como así también para los 4 genomas de Colombia, todos pertenecieron al ST258, SL258 y CG258. Por el contrario, en los 5 genomas de Ecuador se detectaron ST no pesquisados previamente, como lo fue el ST629 (n=3), SL629 (n=2), CG629 (n=2) y ST5 (n=2), SL5 (n=2) y CG5 (n=2). En el caso de los 2 genomas que provenían de Chile, uno de ellos correspondió al ST258, SL258 y CG258 y el otro fue ST25, SL25 y CG10224. Finalmente, el único genoma que provenía de Venezuela correspondiendo al ST11, SL258 y CG258.

De acuerdo con los linajes descritos anteriormente, el ST prevalente correspondió al ST258 (88 genomas), SL258 (114 genomas) y CG258 (86 genomas) como se muestra en las **Figura 8**, **Figura 9** y **Figura 10**.

En la **Figura 11** se presenta un resumen de la relación entre STs, SLs, CGs y lugar geográfico desde donde fueron aisladas las cepas trabajadas.

Tabla 7. Estadísticas de ensamblaje de las cepas de *K. pneumoniae* (Kp1) secuenciadas en este trabajo.

NSQ	TT (Mpb)	Contigs	%GC	N50	L50	CMT (%)	CTO (%)
17U	5.7	88	57,11	161033	11	98.93	1.21
28U	5.7	91	57,18	210315	9	99.19	0.96
40U	5.6	104	57,21	136816	14	99.19	1.13
41U	5.6	94	57,20	147279	13	99.19	0.96
P88	5.7	217	56,99	76364	25	99.45	1.49
K2070	5.6	136	57,28	97623	16	99.45	0.91

NSQ | Nombre de la secuencia; TT | Tamaño total; CMT | Completitud; CTO | Contaminación.

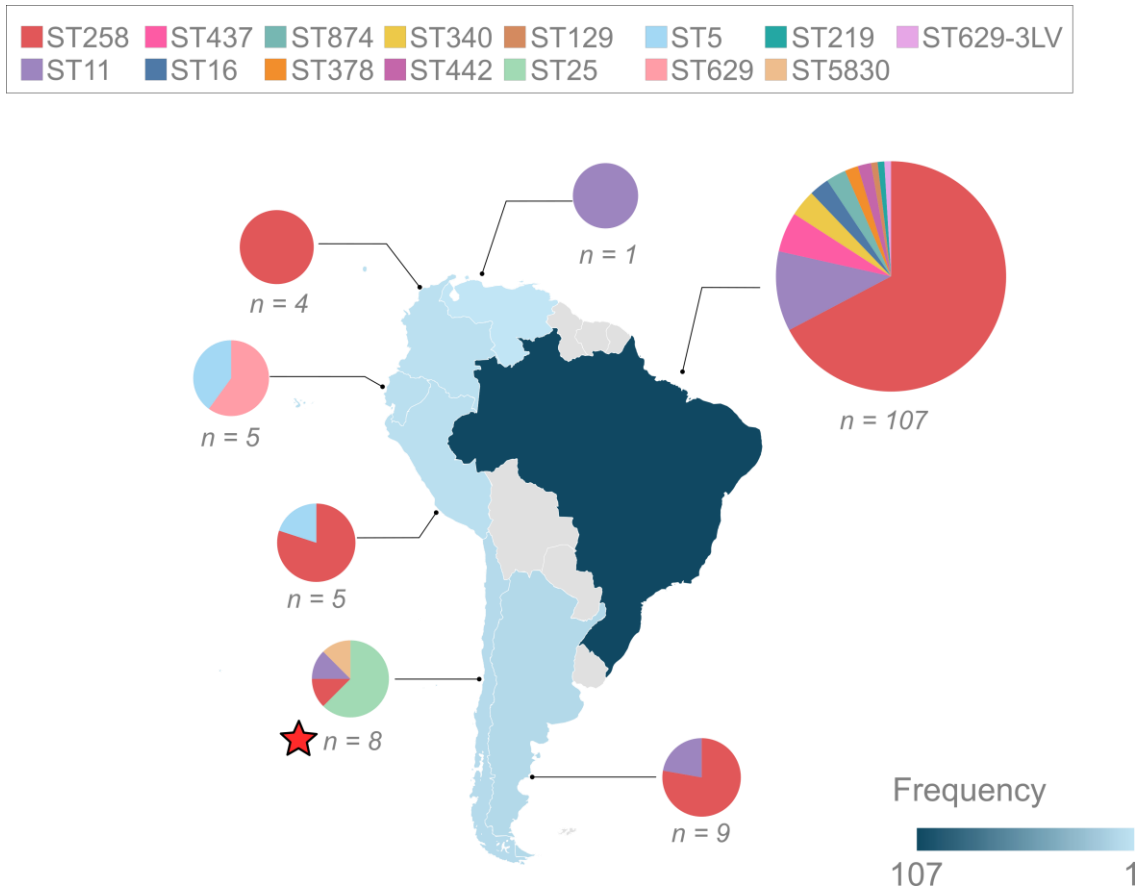


Figura 6. Distribución geográfica de linajes basado en esquema MLST Pasteur (ST) de 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes 16S-RMTasas y carbapenemasas (133 genomas obtenidos de base de datos ΩDB y 6 descritos en esta tesis (estrella roja)).

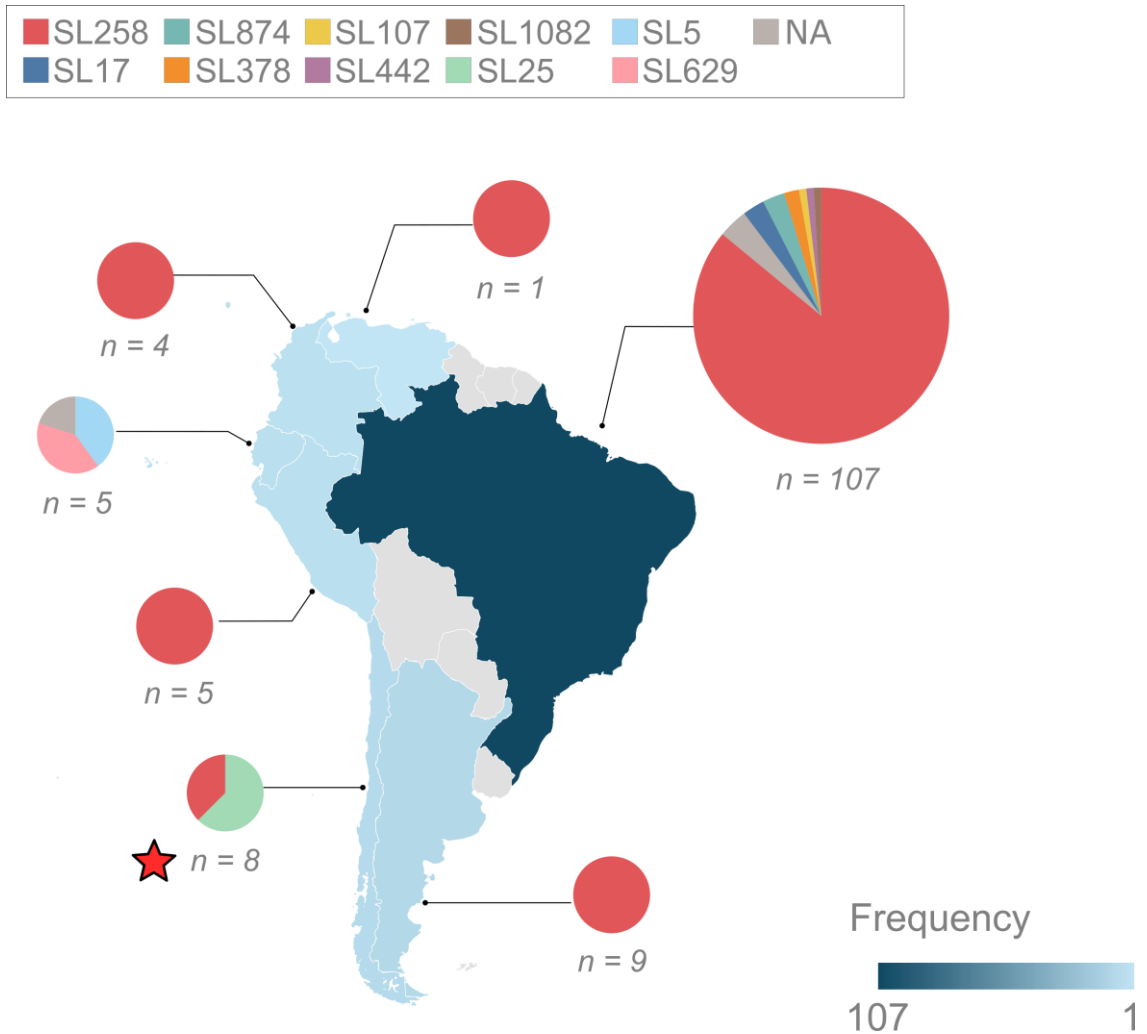


Figura 7. Distribución geográfica de linajes basado en esquema cgMLST (SL) de 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (133 genomas obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis (estrella roja)); NA | No asignado.

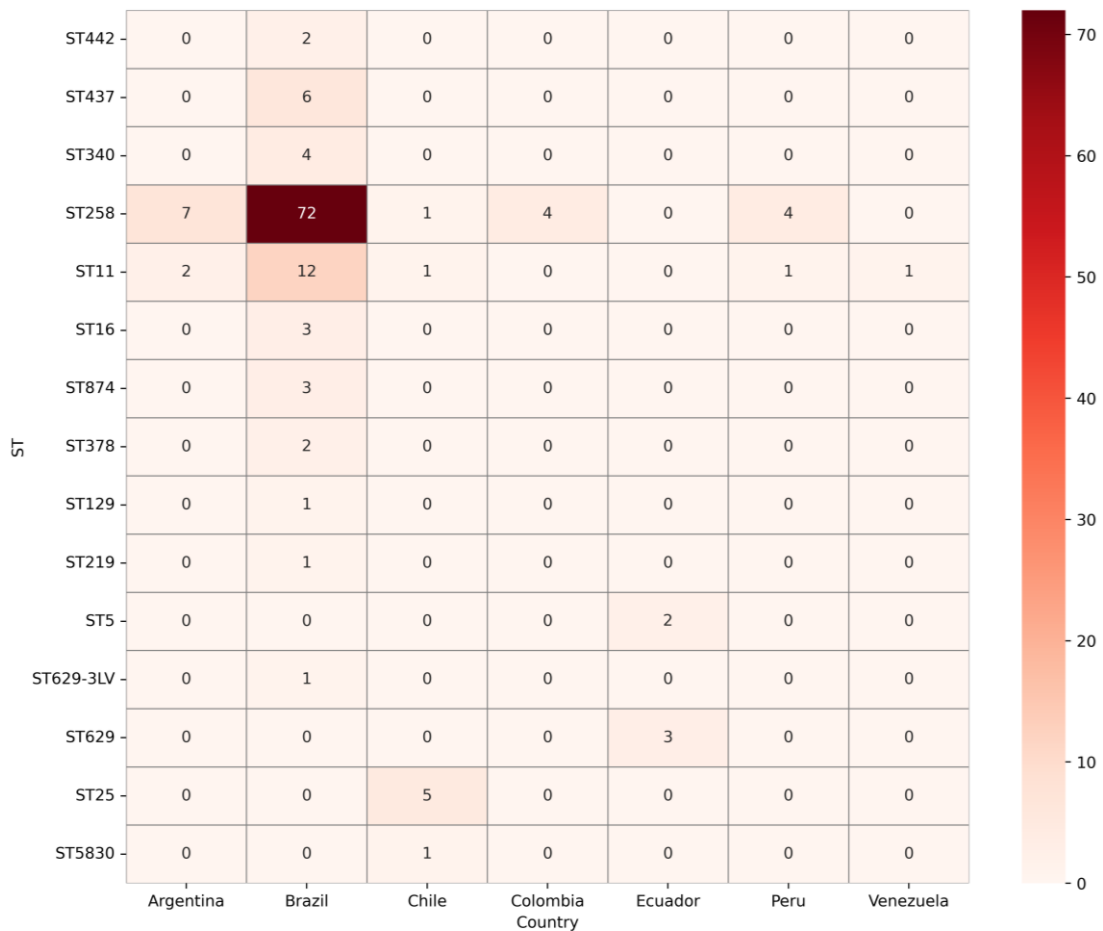


Figura 8. *Heatmap* de distribución secuencio tipos (ST) basado en esquema MLST Pasteur de 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas. (133 genomas obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis).

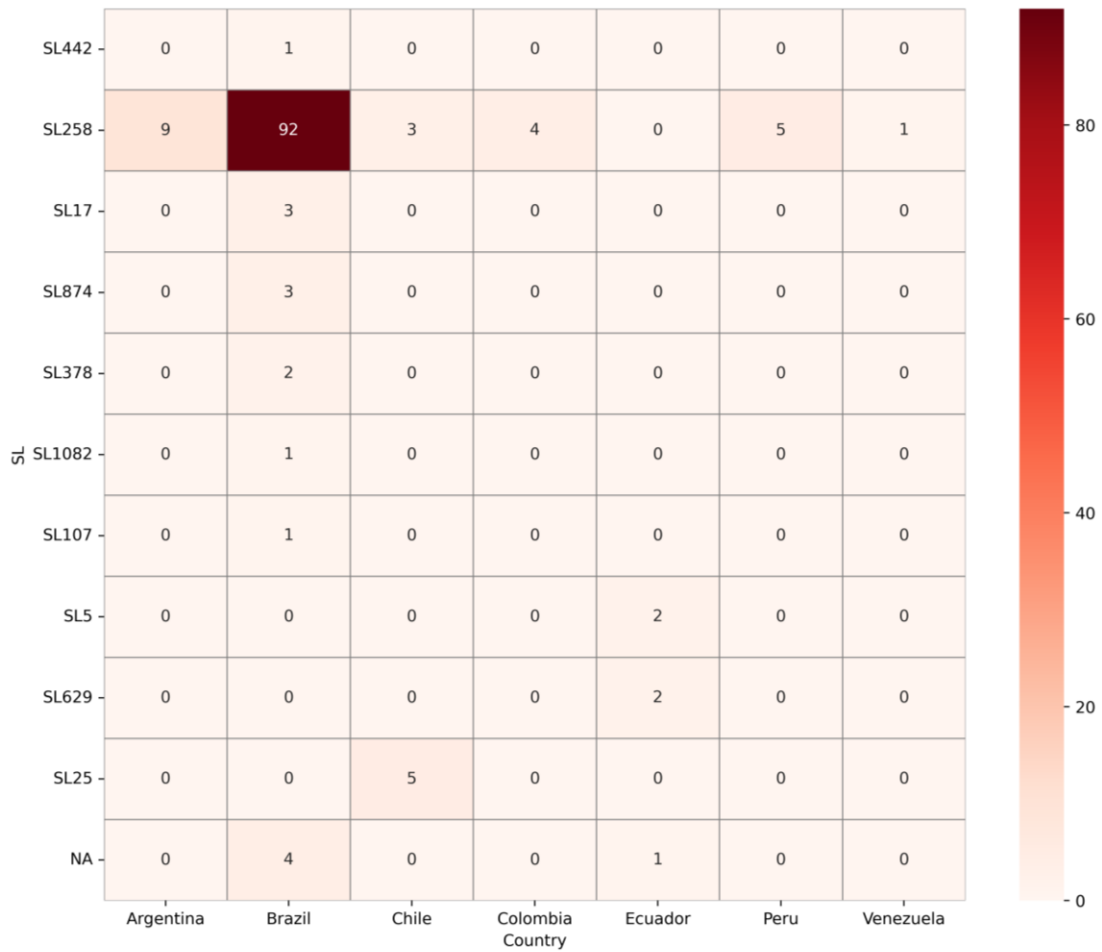


Figura 9. *Heatmap* de distribución de sublinajes (SL) basado en esquema cgMLST de 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (133 genomas obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis); NA | No asignado.

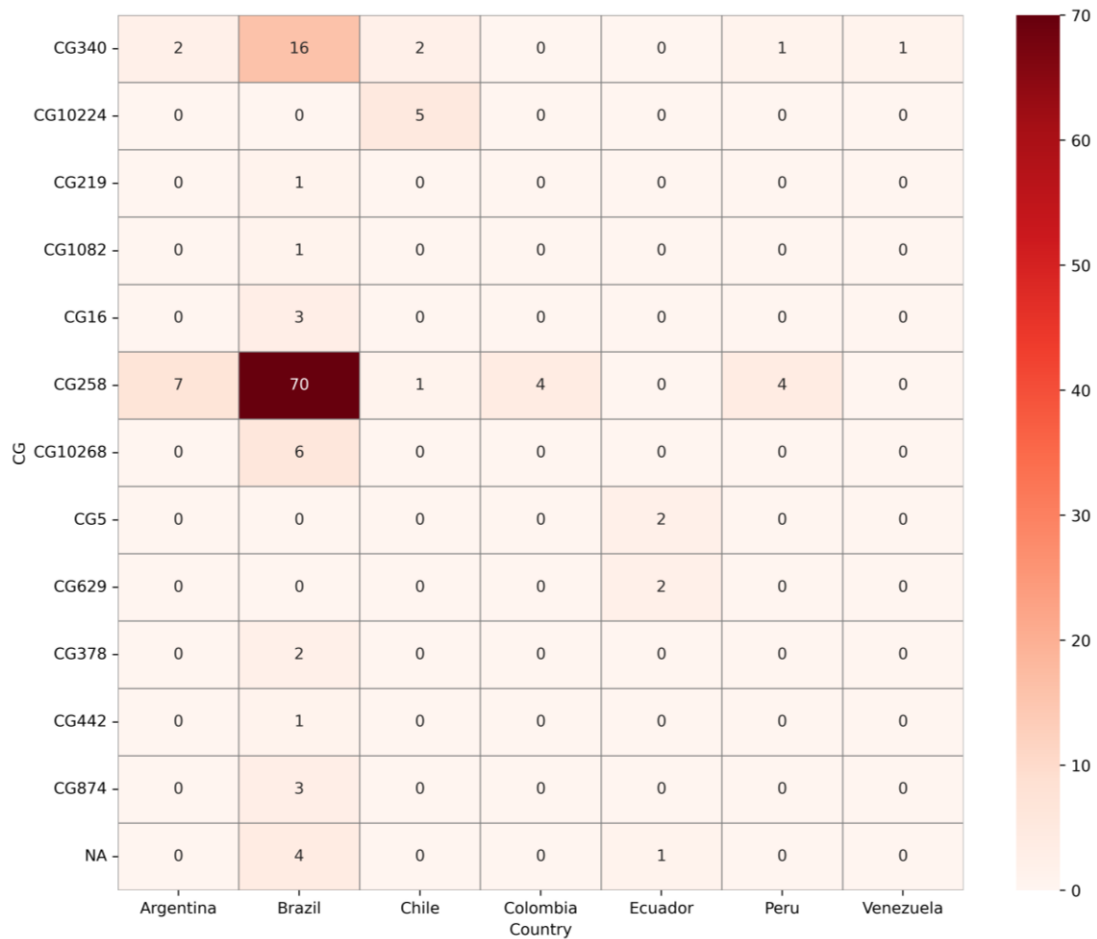


Figura 10. Heatmap de distribución de clonal groups (CG) basado en esquema cgMLST de 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (133 genomas obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis; NA | No asignado).

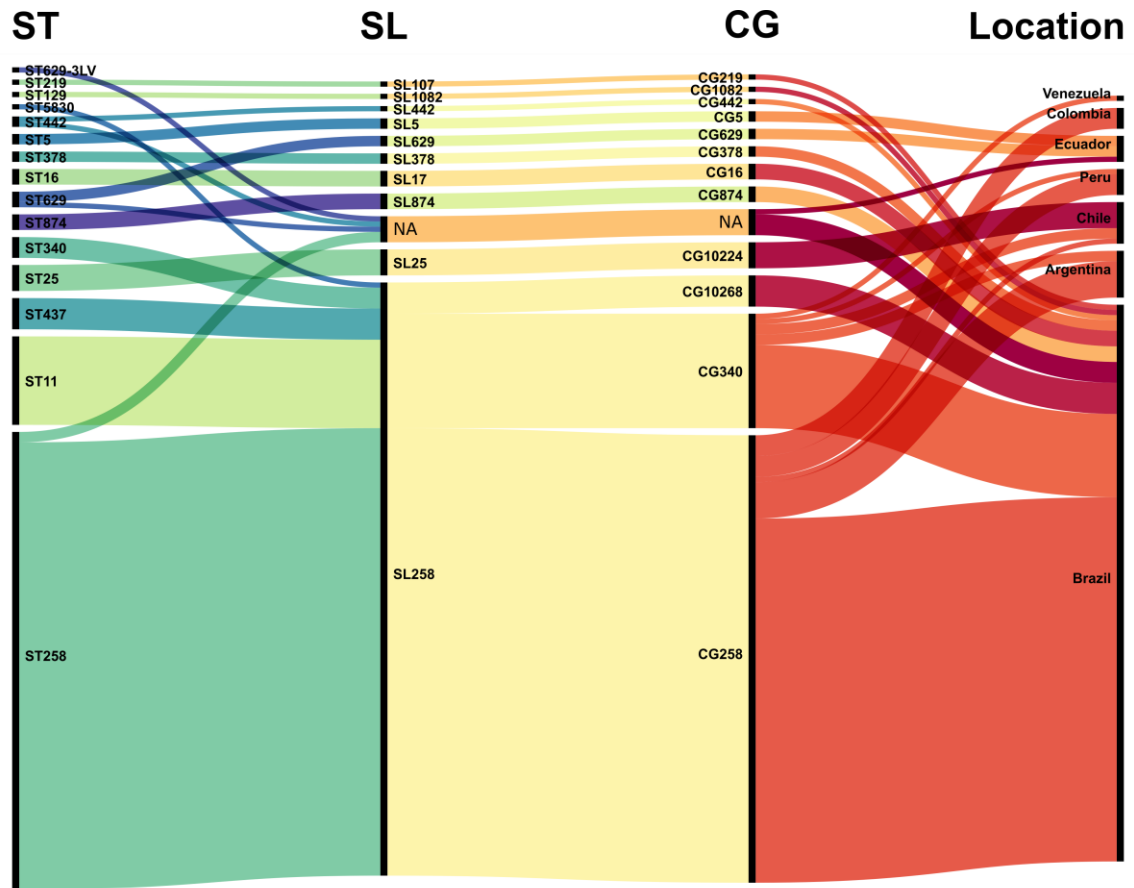


Figura 11. Diagrama aluvial de distribución de linajes de 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) basado en esquema MLST Pasteur (ST), cgMLST (Sublinage y Clonal Group) y la región geográfica de origen (Location). Los 139 genomas (133 obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis) provienen de América del Sur, todos co-portadores de genes codificantes 16S-RMTasas y carbapenemasas; NA | No asignado.

Análisis del resistoma de cepas co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas, carbapenemasas.

En las 6 cepas secuenciadas en esta tesis se determinó que, respecto a las variantes de genes codificantes de 16S-RMTasas las cepas 17U, 28U, 40U, 41U y K2070 portaban el gen *rmtC* y la cepa P88, *rmtD2*. En relación con los genes codificantes de carbapenemasas, el análisis reveló en tres cepas la presencia del gen *bla_{NDM-1}* (40U, 41U y P88), en una cepa el gen *bla_{VIM-2}* (K2070), mientras que dos cepas co-portaron *bla_{KPC-2}* + *bla_{NDM-1}* (17U y 28U).

En lo que respecta a los 133 genomas de la base de datos Ω DB, el principal gen codificante de 16S-RMTasa fue *rmtB1* (n=96), encontrándolo en Brasil (n=81), Argentina (n=9) y Perú (n=4). Adicionalmente, 3 genomas de Brasil portaban los genes *rmtB* a los cuales no fue posible asignar un linaje por el esquema cgMLST. En segundo lugar, se encontró en 18 genomas el gen *rmtG*, Brasil (n=9), Ecuador (n=5), Colombia (n=3) y Perú (n=1). En tercer lugar, el gen *rmtC* se detectó en 10 genomas, obtenidos desde cepas aisladas en Chile (n=6, 5 de las cuales corresponden a cepas secuenciadas en esta tesis) y Brasil (n=4). Por otra parte, *armA*, se detectó en genomas de Brasil (n=4) y Chile (n=1). Los genes que se detectaron con menor frecuencia correspondieron a *rmtE*, encontrándolos en genomas provenientes desde cepas aisladas en Colombia (n=1) y Venezuela (n=1); *rmtF*, Brasil (n=2); *rmtD1*, Brasil (n=2) y *rmtD2*, proveniente de Chile (n=1, proveniente de este trabajo). La distribución geográfica de los genes codificantes de metiltransferasas en 139 genomas se muestra en la **Figura 12**. Respecto a los genes codificantes de carbapenemasas, el principal gen encontrado fue *bla_{KPC}* (n=114), con 10 variantes: *bla_{KPC-2}*, *bla_{KPC-3}*, *bla_{KPC-33}*, *bla_{KPC-35}*, *bla_{KPC-44}*, *bla_{KPC-81}*, *bla_{KPC-103}*, *bla_{KPC-108}*, *bla_{KPC-142}* y *bla_{KPC-18}*. El segundo lugar, correspondió a *bla_{NDM}* (n=17), con 2 variantes: *bla_{NDM-1}* y *bla_{NDM-5}*. Solo un

genoma presentó *bla*_{VIM-2}. Respecto a los genomas de cepas co-portadoras de genes codificantes de carbapenemasas, *bla*_{KPC-2}+*bla*_{NDM-1} (n=3), *bla*_{KPC-2} + *bla*_{NDM-5} (n=1), *bla*_{KPC-2}+*bla*_{NDM-44} (n=1) y *bla*_{NDM-1}+*bla*_{OXA-360} (n=1). En la **Figura 13** puede observarse la distribución geográfica de éstos. En la **Tabla 8** se muestra información referente a cada una de las secuencias genómicas utilizadas en este estudio como país de origen, año, ST, y el tipo 16S-RMTasas y carbapenemasa detectada.

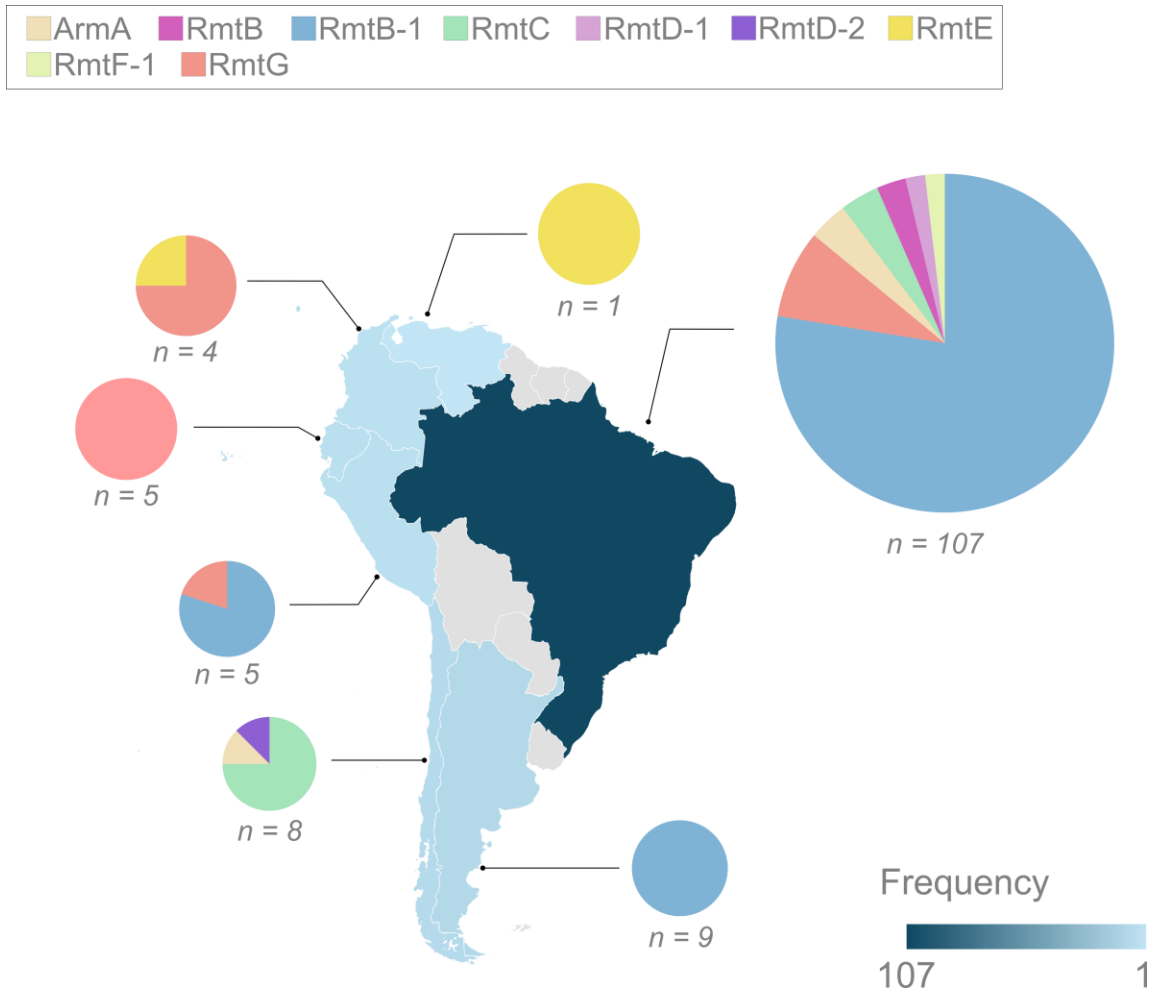


Figura 12. Distribución geográfica de genes codificantes de metiltransferasas en 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (133 genomas obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis).

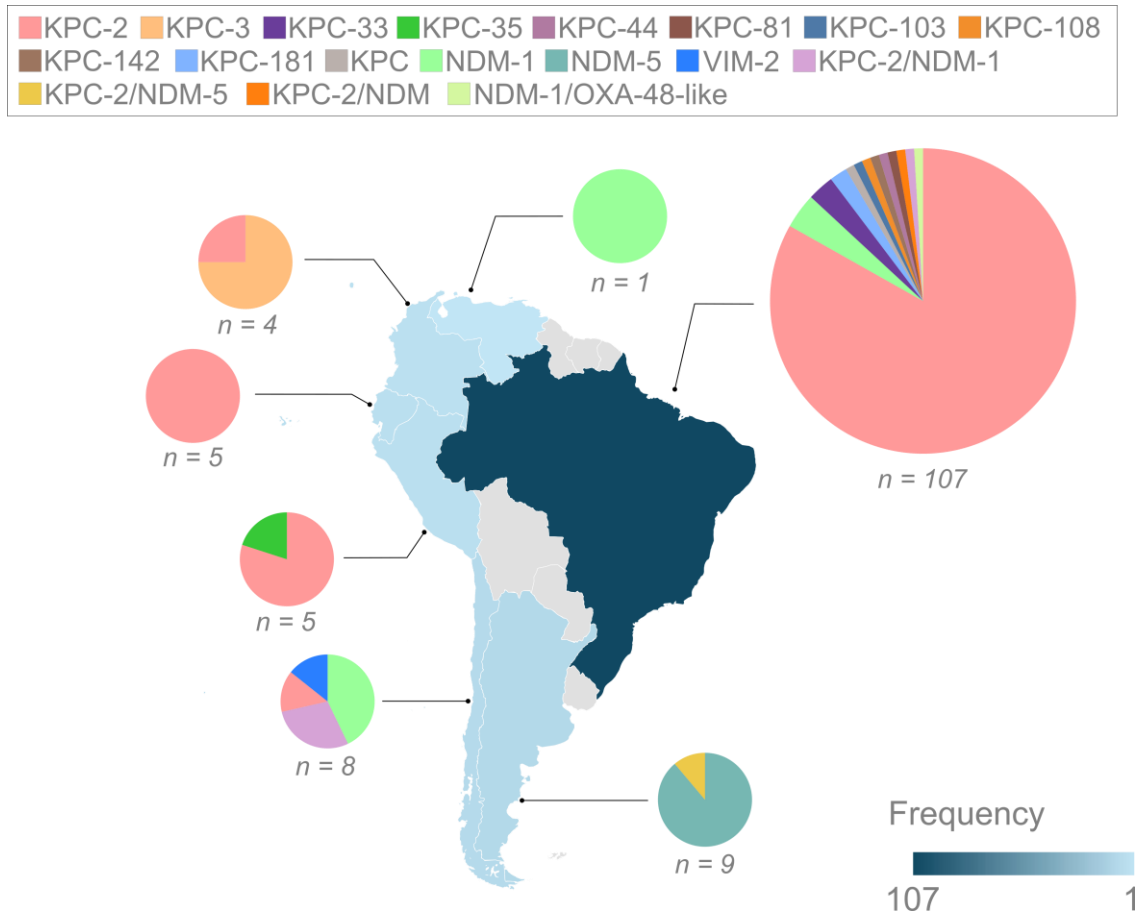


Figura 13. Distribución geográfica de genes codificantes de carbapenemasas en 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (133 genomas obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis).

Tabla 8. Descripción de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas de genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur. Incluidas las 6 cepas secuenciadas en este trabajo (17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070).

Secuencia	ID- ΩDB	Año	ST	16S- RMTase	CBP
Brasil					
Kp13	1	2009	ST442	<i>rmtG</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
1194	3	2011	ST340	<i>rmtG</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
LIM964	14	2011	ST442	<i>rmtG</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
ONE259	74	2011	ST340	<i>rmtG</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
LIM1375	12	2012	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
LIM1372	13	2012	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
1849	5	2013	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
CCBH17440	2	2014	ST437	<i>armA</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
P39	34	2014	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
Kp177	38	2014	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
kp180	39	2014	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
7861H	105	2014	ST340	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
4448	6	2015	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
P63	22	2015	ST11	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
P88	28	2015	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
P72	30	2015	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
P43	32	2015	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
P27	36	2015	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
P05	37	2015	ST16	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
CCBH17428	49	2015	ST437	<i>armA</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
CCBH19867	50	2015	ST437	<i>armA</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
4490	4	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
B30	7	2016	ST437	<i>rmtG</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>
BC_5000	15	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla_{KPC-2}</i>

BC_4993	16	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
BC_4987	18	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
BC_4990	19	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
P77	23	2016	ST11	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
HSP31	24	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
HSP16	25	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
HSP08	26	2016	ST258	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
HSP15	27	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
P71	29	2016	ST258	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
P73	31	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
P48	33	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
P38	35	2016	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
UEB_24	51	2016	ST129	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
BC_5003	17	2017	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
UEB_18	52	2017	ST219	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
ICBKPS7	123	2017	ST258	<i>rmtB</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
CCBH27588	42	2019	ST378	<i>rmtF1</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
CCBH27462	48	2019	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
5916	73	2019	ST16	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
CCBH26794	77	2019	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
Kp65R	81	2019	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
HA40Kpn	82	2019	ST11	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
L2304797	131	2019	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-103}
CCBH28206	40	2020	ST874	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{KPC-2} / <i>bla</i> _{NDM-1}
CCBH27949	41	2020	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
CCBH28217	43	2020	ST874	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
CCBH28026	44	2020	ST874	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{KPC-2} / <i>bla</i> _{NDM-44}
CCBH27867	45	2020	ST378	<i>rmtF1</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
CCBH27695	46	2020	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
CCBH27584	47	2020	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
L15	53	2020	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
L2	54	2020	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
L1	55	2020	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
L30	56	2020	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}

L28	57	2020	ST11	rmtB1	bla _{KPC-2}
L12	58	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L18	59	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L3	60	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L6	61	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L5	62	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L24	63	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L16	64	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L33	65	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L31	66	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L9	67	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L14	68	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L27	69	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L11	70	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L20	71	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
L10	72	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
CCBH29261	75	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
CCBH29128	76	2020	ST16	rmtC	bla _{NDM-1} /bla _{OXA-370}
ECLORG10	108	2020	ST629 -3LV	rmtG	bla _{KPC-2}
M7233093	130	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-81}
LEMB_UFF_482	132	2020	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
1039_21	83	2021	ST11	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_1201_21	84	2021	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_1094_21	85	2021	ST11	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_0989_21	86	2021	ST11	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_1383_21	87	2021	ST258	rmtB1	bla _{KPC-181}
ID_1042_21	88	2021	ST11	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_0981_21	89	2021	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_1369A_21	90	2021	ST437	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_0959_21	91	2021	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_0384_21	92	2021	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_0302_21	93	2021	ST11	rmtB1	bla _{KPC-2}
ID_0108_21	95	2021	ST258	rmtB1	bla _{KPC-2}

ID_0662_21	96	2021	ST11	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
ID_0727_21	97	2021	ST11	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
ID_0516_21	99	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-44}
ID_0893_21	100	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
ID_0900_21	101	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
N5062754	124	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC*}
N4293546	125	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-33}
N4292977	126	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-33}
N4213107	127	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-33}
N3182918	128	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-142}
M9171130	129	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-108}
ID_0016_22	94	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
ID_0698_22	98	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-181}
P19	106	2022	ST340	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
S942	107	2022	ST11	<i>rmtD1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
Kp77RR	80	SI	ST437	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}

Argentina

HA30	78	2019	ST11	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}
HA31	79	2019	ST11	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}
M28413	112	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}
M28162	113	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}
M28206	114	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}
M28195	115	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}
M28196	116	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2/bla} _{NDM-5}
Kp-NDM-5	119	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}
Kp-NDM-5	120	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}

Chile

UCO-490	21	2018	ST258	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
KpVA833	133	2019	ST25	<i>armA</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
P88	P88	2021	ST11	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
K2070	K2070	2021	ST5830	<i>rmtD2</i>	<i>bla</i> _{VIM-2}
17U	17U	2023	ST25	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{KPC-2/ bla} _{NDM-1}
28U	28U	2023	ST25	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{KPC-2/bla} _{NDM-1}
40U	40U	2023	ST25	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}

41U	41U	2023	ST25	<i>rmtC</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}
Colombia					
COL-Kpn66	11	2009	ST258	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
COL-Kpn79	10	2010	ST258	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-3}
COL-Kpn88	9	2011	ST258	<i>rmtE</i>	<i>bla</i> _{KPC-3}
COL-Kpn96	8	2012	ST258	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-3}
Ecuador					
ECLORG28-kpc	110	2020	ST629	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
ECLORG29-kpc	111	2020	ST629	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
ECLORG37-kpc	109	2021	ST629	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
HEE45_1	102	2022	ST5	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
HEE38_1	103	2022	ST5	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
Perú					
KpCR01	104	2018	ST11	<i>rmtG</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
IIH-371	117	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
IIH-375	118	2022	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
K2KPC	121	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-35} / <i>bla</i> _{KPC-35}
K1KPC	122	2021	ST258	<i>rmtB1</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}
Venezuela					
12904	20	2015	ST11	<i>rmtE</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}

Secuencia | nombre de la secuencia de RefSeq; ID-ΩDB | número correlativo de la base de datos ΩDB, Año | Año de aislamiento; ST | secuencia tipo; 16S-RMTasa | metiltransferasas de ARNr 16S; CBP | carbapenemasa; * | gen truncado; SI | Sin información.

En la **Tabla 9** se describen otros genes de resistencia a antimicrobianos, diferentes a 16S-RMTasas y carbapenemasas, en los 6 genomas analizados en este trabajo. Se identificaron los genes asociados a resistencia a antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, bleomicina, fosfomicina, lincosamidas/macrólidos y estreptograminas, macrólidos, fenicoles, quinolonas, rifamicinas, sulfonamidas y trimetoprima, tetraciclinas y compuestos de amonio cuaternario.

Tabla 9. Resistoma de las seis cepas secuenciados en este trabajo (17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070).

	17U	28U	40U	41U	P88	K2070
β-lactámicos	<i>bla</i> _{SHV-11}	<i>bla</i> _{SHV-11}	<i>bla</i> _{SHV-11}	<i>bla</i> _{SHV-11}	<i>bla</i> _{SHV-11}	<i>bla</i> _{SHV-11}
	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>bla</i> _{TEM*}	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{TEM-1}	<i>bla</i> _{TEM-1}
			<i>bla</i> _{OXA-10}	<i>bla</i> _{OXA-10}	<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>bla</i> _{OXA-1}
			<i>bla</i> _{CMY-6}	<i>bla</i> _{CMY-6}		<i>bla</i> _{OXA-101}
			<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-2}		<i>bla</i> _{CTX-M-15}
Aminoglucósidos	<i>aadA2</i>	<i>aac (6')-Ib</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA1</i>	<i>aadA5</i>	<i>aadA5</i>
	<i>aph (3')-Ia</i>		<i>aadA2</i>	<i>aph (3'')-Ib</i>	<i>aac (3)-IId</i>	<i>aac (6')-Ib-cr</i>
	<i>aac (6')-Ib</i>		<i>aph (6)-Id</i>	<i>aph (6)-Id</i>	<i>aac (6')-Ib</i>	
			<i>aph (3'')-Ib</i>	<i>aac (6')-Ib</i>		
		<i>aac (6')-Ib3</i>				
Bleomicina	<i>ble</i> _{MBL}	<i>ble</i> _{MBL}	<i>ble</i> _{MBL}	<i>ble</i> _{MBL}	<i>ble</i> _{MBL}	-
Fosfomicina	<i>fosA-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>fosA-like</i>	<i>fosA-like</i>
LME	-	-	-	-	-	<i>erm(B)</i>
Macrólidos	<i>mph(A)</i>	-	<i>mph(A)</i>	-	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>
Fenicoles	-	-	-	-	-	<i>catB3</i>
Quinolonas	<i>qnrB19</i>	<i>qnrB19</i>	<i>qnrB19</i>	<i>qnrB19</i>	-	-
Rifamicinas	-	-	<i>arr-2</i>	<i>arr-2</i>	-	-

Sulfonamidas/ trimetoprima	<i>sul1</i> <i>dfrA12</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i> <i>dfrA12</i>	<i>sul1</i> <i>sul2</i>	<i>sul1</i> <i>dfrA17</i>	<i>sul1</i>
Tetraciclinas	-	-	-	-	-	<i>tet(G)</i> -like
QACs	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacEΔ1</i>	<i>qacE</i>	<i>qacEΔ1</i>
GRMP	<i>fieF</i>	<i>fieF</i>	<i>fieF</i>	<i>fieF</i>	<i>fieF</i>	<i>arsBCDR</i> ^a <i>pcoAR</i> ^a <i>silAR</i> ^a <i>silP</i> ^a <i>merADETR</i> ^a <i>fieF</i>

* | gen truncado; ^a | gen <100% homología; - | gen ausente; QACs | *Quaternary ammonium compounds*; LME | lincosamidas, macrólidos y estreptograminas; GRMP | Genes de resistencia a metales pesados; *ars* | Arsénico; *pco* | Cobre; *sil* (A y R) | Cobre y Plata; *sil* | Plata; *mer* | Mercurio; *fieF* | otros.

Mediante la extensión *plus* disponible en la herramienta AMRFinder se determinó la presencia de genes de resistencia a metales pesados. Del total de genomas analizados (138 genomas) pertenecientes a la base de datos Ω DB, se identificó una alta prevalencia de genes de resistencia a Arsénico (109 genomas) mediado por los genes *arsABCDR*; a cobre (107 genomas) mediado por los genes *pcoABCDERS*; a cobre y plata (98 genomas) mediado por los genes *silABCFRS*; a plata (96 genomas) mediado por los genes *silEP*, y en menor medida se encontraron genes de resistencia a mercurio (29 genomas) mediado por los genes *merACDERT*; telurio (12 genomas) mediado por los genes *terBCDE*; a níquel (3 genomas) mediado por los genes *ncrABY*; y a cobre y níquel (3 genomas) mediado por el gen *ncrC*. En la **Figura 14** se muestra el valor porcentual de la portación de genes de resistencia a metales pesados, el valor se encuentra normalizado por el número total de genomas del mismo ST.

Cabe destacar que, en el linaje representado por el ST25 se encontró únicamente la presencia del gen *fieF*. FieF pertenece a la familia de proteínas transmembrana facilitadoras de difusión de cationes, que son capaces de transportar zinc y otros iones de metales pesados a través de la membrana citoplasmática. Por el contrario, en los genomas pertenecientes al ST258 se encontró la presencia de genes de resistencia a arsénico (*arsABCDR*), cobre (*pcoABCDERS*), cobre y plata (*silABCEFPFRS*), telurio (*terEBCD*), mercurio (*merC*), compuestos de amonio cuaternario (*qacEL*), *fieF*, *hsp20* y *clpK*. A su vez, los genomas pertenecientes al ST11 presentaron genes de resistencia a arsénico, cobre, cobre y plata, telurio y una mayor cantidad de genes de resistencia a mercurio (*merACDEPRT*) y compuestos de amonio cuaternario, *fieF*, *hsp20*, *clpK* y *pcoE*.

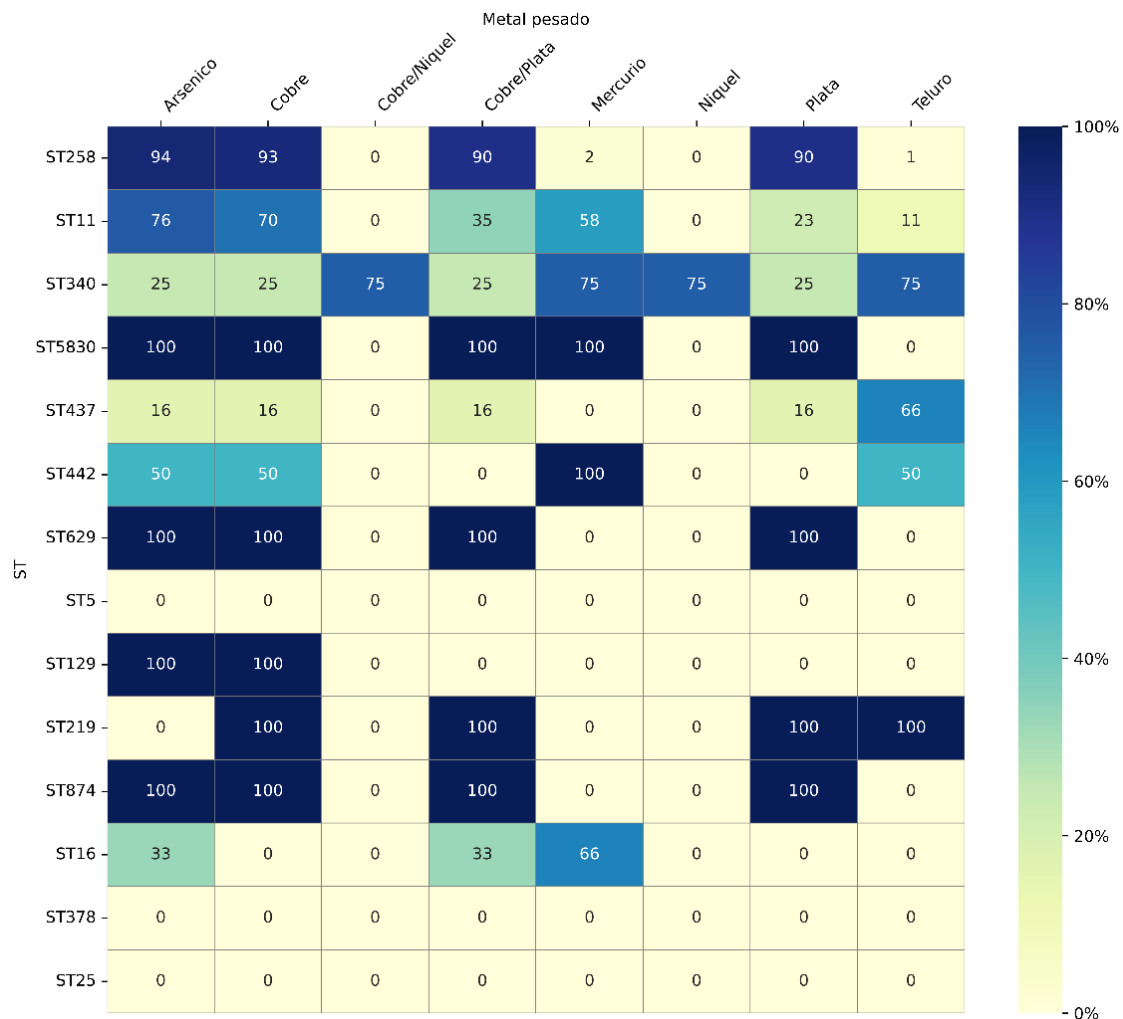


Figura 14. Heatmap de distribución de frecuencia de genes de resistencia a metales pesados encontrados en diferentes STs de 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas (133 genomas obtenidos de base de datos ΩDB y 6 descritos en esta tesis).

Fenómeno de co-portación de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas

Como se mencionó anteriormente, los datos referentes a los linajes, el año de aislamiento y lugar de aislamiento de las cepas co-portadoras de 16S-RMTasas y carbapenemasas pueden ser revisados en la **Tabla 8**. En relación con la co-portación de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas, como se observa en la **Figura 15** la más frecuente fue *rmtB1+bla_{KPC-2}* (n=78), y el mayor número de genomas estuvo representado, principalmente, por Brasil (n=75). Luego, se encontró *rmtG+bla_{KPC-2}* (n=15), *rmtB1+bla_{NDM-5}* (n=8), *armA+bla_{KPC-2}* (n=5), *rmtC+bla_{NDM-1}* (n=5), *rmtB+bla_{KPC-2}* (n=3), *rmtB1+bla_{KPC-33}* (n=3), *rmtC+bla_{KPC-2/bla_{NDM-1}}* (n=3), *rmtB1+bla_{KPC-181}* (n=2), *rmtB1+bla_{KPC-108}* (n=2), *rmtD1+bla_{KPC-2}* (n=2), *rmtF1+bla_{NDM-1}* (n=2), *rmtG+bla_{KPC-3}* (n=2), *rmtB1+bla_{KPC-142}* (n=1), *rmtB1+bla_{KPC-44}* (n=1), *rmtB1+bla_{KPC-2/bla_{NDM-5}}* (n=1), *rmtB1+bla_{KPC-81}* (n=1), *rmtC+bla_{KPC-2/bla_{NDM-44}}* (n=1), *rmtC+bla_{NDM-1+bla_{OXA-360}}* (n=1), *rmtD2+bla_{VIM-2}* (n=1), *rmtE+bla_{KPC-3}* (n=1), *rmtE+bla_{NDM-1}* (n=1), y *rmtG+bla_{NDM-1}* (n=1).

En Argentina, los dos primeros genomas fueron obtenidos de cepas aisladas el 2019 (ST11) que co-portaron *rmtB1+bla_{NDM-5}*. El 2022, de siete genomas (ST258), seis co-portaron *rmtB1+bla_{NDM-5}* y un genoma co-portó *rmtB1* junto a *bla_{KPC-2+bla_{NDM-5}}*.

En cuanto a Brasil, el 2009, un genoma (ST442) fue co-portador de *rmtG+bla_{KPC-2}*, siendo el primero a nivel de América del Sur en co-portar una serino carbapenemasa según la base de datos Ω DB. El 2011, tres genomas (co-portaron *rmtG+bla_{KPC-2}* (ST340(2) y ST442 (1)). El 2012, dos genomas (ST258) co-portaron *rmtB1+bla_{KPC-2}*. El 2013, un genoma (ST258) co-portó *rmtB1+bla_{KPC-2}*. El 2014, de 5 genomas cuatro (tres ST258 y un ST340) co-portaron

rmtB1+bla_{KPC-2} y un genoma (ST436) co-portó *armA* & *bla_{KPC-2}*. El 2015, de 9 genomas, siete co-portaron *rmtB1+bla_{KPC-2}* (ST258 (5), ST11 (1) y ST16 (1)) mientras que dos genomas (ST436) co-portaron *armA+bla_{KPC-2}*. El 2016, de 16 genomas, 14 co-portaron (trece ST258 y un ST11) *rmtB+bla_{KPC-2}*, respecto al gen *rmtB*, 12 genomas presentaron la variante *rmtB1* y en dos genomas no fue posible designar la variante para *rmtB*. De los dos genomas pendientes, uno co-portó *rmtG+bla_{KPC-2}* (ST436) y, el otro co-portó *rmtG+bla_{NDM-1}* (ST129). El 2017, de 3 genomas, 2 (ST258) co-portaron *rmtB+bla_{KPC-2}*, respecto al gen *rmtB*, de los 2 genomas estudiados, uno presentó la variante *rmtB1*, mientras que para el otro no fue posible designar la variante. El tercer genoma (ST219) co-portó *rmtG+bla_{KPC-2}*. El 2019, de 7 genomas, 4 co-portaron *rmtB1+bla_{KPC-2}* (ST258 (3) y ST16 (1)). Un genoma (ST258) co-portó *rmtB1+bla_{KPC-103}*. Adicionalmente, un genoma (ST11) co-portó *rmtD1+bla_{KPC-2}*, mientras que el séptimo genoma (ST368) co-portó *rmtF1+bla_{NDM-1}*. El 2020, de los 32 genomas, 25 co-portaron *rmtB1+bla_{KPC-2}* (ST258 (24) y ST11 (1)). Un genoma (ST258) co-portó *rmtB1+bla_{KPC-81}*. Respecto a los 6 genomas restantes, presentaron las siguientes co-portaciones, *rmtG+bla_{KPC-2}* (ST629-3LV), *rmtF1+bla_{NDM-1}* (ST368), *rmtC+bla_{NDM-1}+bla_{OXA-360}* (ST16), además, 3 genomas (ST874) co-portaron *rmtC* junto con diferentes carbapenemasas como *bla_{NDM-1}*, *bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1}* y *bla_{KPC-2}+bla_{NDM-44}*. El 2021, de 23 genomas, 15 genomas co-portaron *rmtB1+bla_{KPC-2}* (ST11(7), ST258 (7) y ST436 (8)). De los 8 genomas restantes (ST258) todos co-portaron *rmtB1* junto a variantes de *bla_{KPC}*, tales como, tres variantes de tipo *bla_{KPC-33}* y una variante de tipo *bla_{KPC-44}*, *bla_{KPC-108}*, *bla_{KPC-142}*, *bla_{KPC-181}* y *bla_{KPC}*. Finalmente, el 2022, de 4 genomas, dos (ST258) co-portaron *rmtB1* junto a *bla_{KPC-2}* y *bla_{KPC-181}* por separado. Además, un genoma (ST11) co-portó *rmtD1+bla_{KPC-2}*. El cuarto genoma (ST340) co-portó *rmtG + bla_{KPC-2}*.

En el caso de los genomas obtenidos desde cepas aisladas en Chile, el 2018, un genoma (ST258) co-portó *rmtC+bla_{NDM-1}*. El 2019, un genoma (ST25) co-portó *armA+bla_{KPC-2}*. Respecto al periodo 2021-2023, los genomas analizados

corresponden a aquellos secuenciados en este trabajo. En el 2021, de dos genomas, uno co-portó *rmtC+bla_{NDM-1}* (ST11) y el otro co-portó *rmtD2+bla_{VIM-2}* (ST5830). El año 2023, en cuatro genomas, todos ST25, se detectó que dos co-portaron *rmtC+bla_{NDM-1}* y, los otros 2 *rmtC+bla_{KPC-2}+bla_{NDM-1}*.

En el caso de Colombia, 4 genomas (ST258) obtenidos desde cepas aisladas los años 2009, 2010, 2011 y 2012, co-portaron respectivamente *rmtG+bla_{KPC-2}*; *rmtG+bla_{KPC-3}*; *rmtE+bla_{KPC-2}*; y *rmtG* junto a *bla_{KPC-3}*.

Respecto a Ecuador, el año 2020, dos genomas (ST629) co-portaron *rmtG+bla_{KPC-2}*. El año 2021 un genoma (ST629) portó *rmtG+bla_{KPC-2}*. Finalmente, el año 2022, dos genomas (ST5) co-portaron *rmtG+bla_{KPC-2}*.

En cuanto a Perú, el año 2018, un genoma (ST11) co-portó *rmtG+bla_{KPC-2}*. El año 2021, 3 genomas (ST258) co-portaron *rmtB1*, de estos 2 co-portaron *bla_{KPC-2}* y uno *bla_{KPC-35}*. Finalmente, el año 2022, un genoma (ST258) co-portó *rmtB1+bla_{KPC-2}*.

Respecto a Venezuela, se encontró solo un genoma (ST11), correspondiente al año 2015 que co-portó *rmtE+bla_{NDM-1}*, siendo este, la primera descripción de un genoma portador de un gen codificante de metiltransferasa junto a uno de metalo-β-lactamasa (MBL) en América del Sur según la base de datos ΩDB.

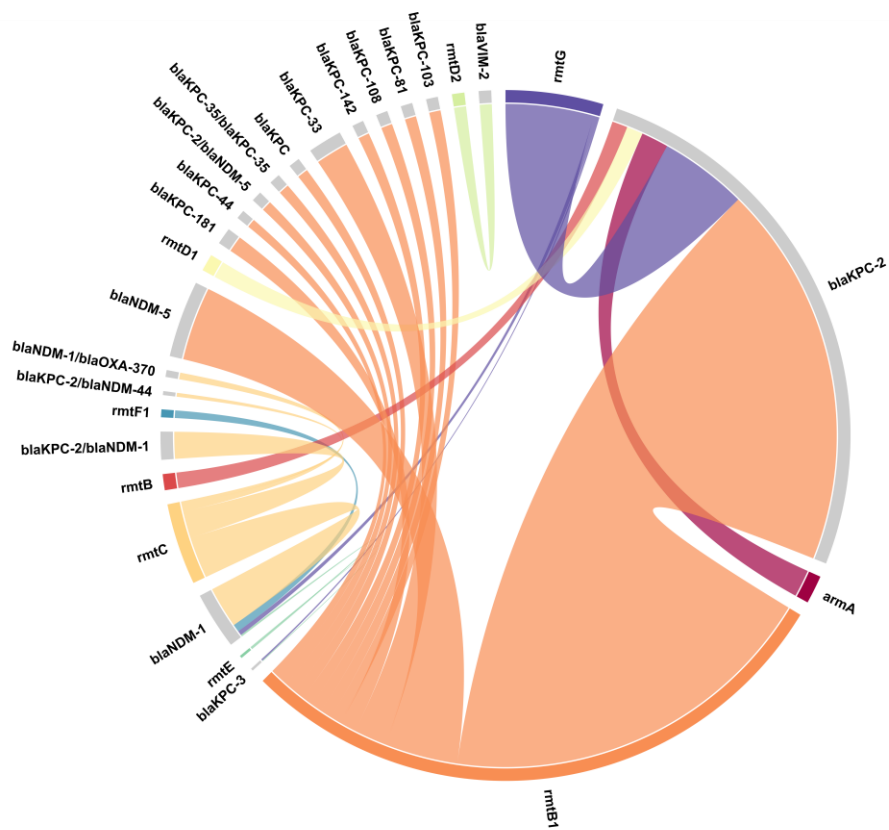


Figura 15. Correlación de diferentes genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas en 139 genomas de *K. pneumoniae* (KP1) provenientes de América del Sur co-portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas. (133 genomas obtenidos de base de datos Ω DB y 6 descritos en esta tesis).

Análisis filogenético

En la **Figura 16** se presenta la reconstrucción filogenética de los 139 genomas (6 secuenciados en esta tesis y 133 obtenidos de base de datos Ω DB). Se observa que las cepas 17U, 28U, 40U y 41U estuvieron estrechamente relacionadas con la cepa KpVA833 aislada en Santiago de Chile el año 2019. En cuanto a las cepas K2070 y P88, estas se encontraron relacionadas entre sí junto a la cepa 12904 aislada en Venezuela el 2015.

Se observó que el principal linaje estuvo formado por los genomas pertenecientes al ST258, SL258 y CG258. Los linajes que se encontraron mayormente relacionados al ST258 fueron respectivamente ST340, SL258 y CG258; ST11, SL258 y CG258; ST11, SL258 y CG340; ST5830, SL258 y CG340; finalmente, ST437, SL258 y CG258.

A su vez, los siguientes linajes se encontraron distantes de ST258, ST11 y entre ellos, estos fueron los ST629, ST5, ST129, ST219, ST874, ST16, ST378 y ST25.

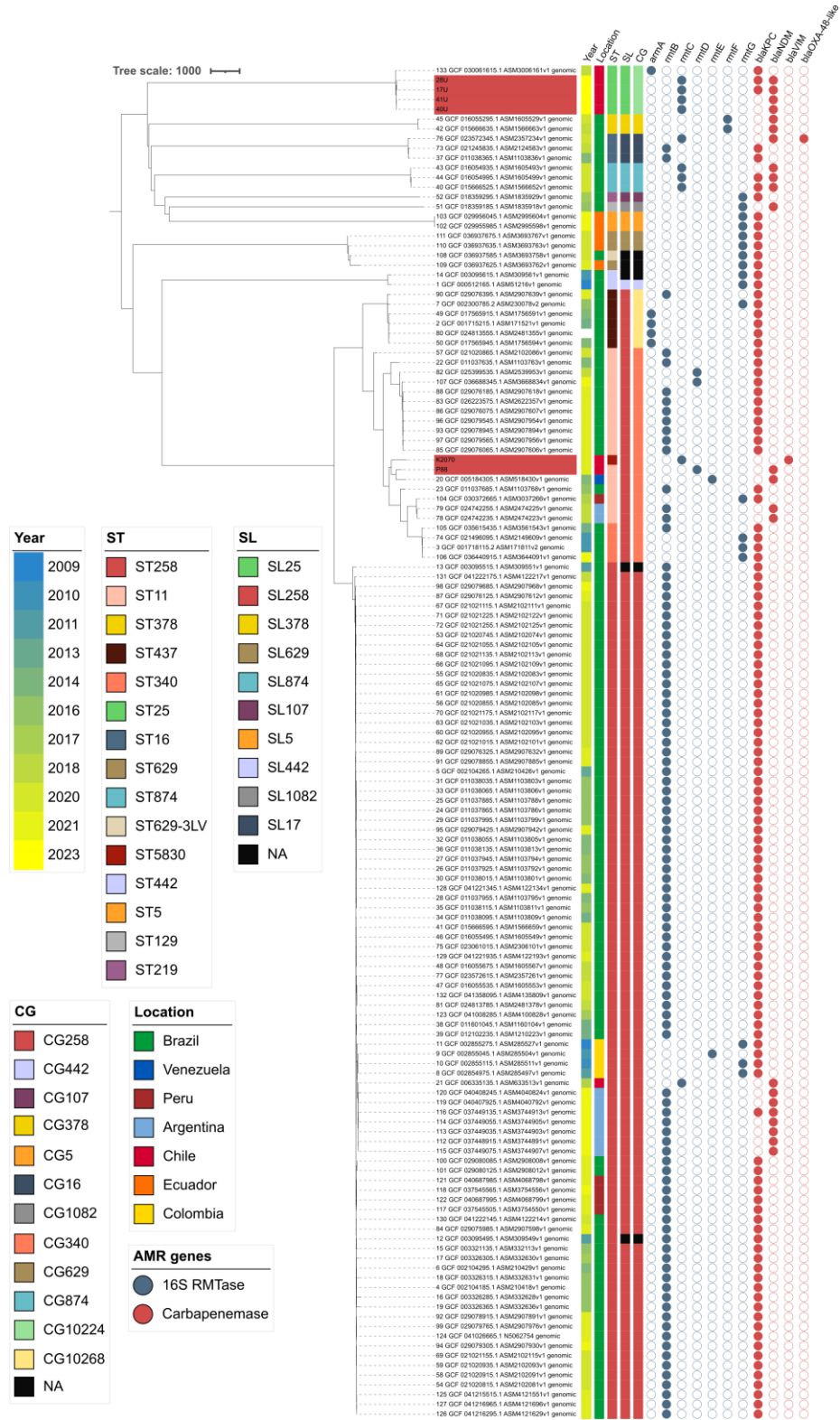


Figura 16. Árbol filogenético basado en esquema de cgMLST de *K. pneumoniae* para 139 genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur co-portadores de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas. (133 obtenido de base de datos Ω DB y 6 genomas descritos en esta tesis).

Locus capsulare (KL), antígeno O (OL) y marcadores de virulencia relevantes

Para las 6 cepas secuenciadas en este trabajo, se determinó que los *locus* capsulares (*K locus*) y de antígeno O (*O locus*) para las cepas 17U, 28U, 40U y 41U correspondieron a KL2 y O1/O2v2, mientras que para las cepas P88 y K2070 fueron KL39 y O3b. Respecto a los factores de virulencia investigados como yersiniabactina (*ybt*), colibactina (*clb*), aerobactina (*iuc*), salmochelina (*iro*), regulador de la biosíntesis de polisacárido capsular (*rmpADC*), solo se encontró *ybt-14* codificado en el elemento ICEKp5 y detectados en los genomas de las cepas 17U, 28U, 40U y 41U (**Tabla 10**).

Por otra parte, en los 133 genomas de la base de datos Ω DB; los *K locus* y *O locus* más abundantes (**Tabla 10**) fueron KL107/O1/O2v2; seguidos de KL64/O1/O2v2; KL15/O4; KL36/O4; KL2/O1/O2v2; KL39/O1/O2v1 y KL39/O3b; KL51/ O3b; KL24/ O1/O2v1; KL125/ O5; KL10/ O3/O3a; KL20/ O3/O3a; KL62/ O1/O2v1; KL108/ O1/O2v2; KL114/ O1/O2v1 y KL105/ O1/O2v2.

Ahora bien, 56 genomas portaron diferentes variantes del gen *ybt*, inserto en diferentes variantes el elemento integrativo conjugativo (ICE) de *K. pneumoniae* denominado comúnmente como ICEKp, la distribución de las variantes de *ybt* junto a los elementos ICEKp fueron las siguientes, diecisiete genomas portaron *ybt-17* en ICEKp10; siete *ybt-9* en ICEKp3; un *ybt-0* en ICEKp10; un *ybt-10* en ICEKp4; tres *ybt-17* en ICEKp10 (truncado); un *ybt-0* en ICEKp2; dos *ybt-0* en

ICEKp5; un *ybt-0* en ICEKp10 (truncado); un *ybt-2* en ICEKp1; un *ybt-14* en ICEKp5; un *ybt-0* en ICEKp5 (truncado), un *ybt-10* en ICEKp4 (truncado) y un *ybt-16* en ICEKp12.

En relación con el gen *clb*, éste se detectó en 31 genomas siendo específicamente *clb-3*. Finalmente, 2 genomas portaron *iuc*, todos correspondientes a la variante *iuc-3*.

Respecto a otros marcadores de virulencia como *iro* y *rmpADC*, se encontró *iro-3* (truncado), y *rmp-3* en la plataforma ICEKp1, ambos en las secuencias HEE45_1 y HEE38_1 aisladas en Ecuador el 2022. Adicionalmente, estos genomas portaban *iuc-3*.

Los genomas pertenecientes al ST258 (n=88), presentaron solo un variante locus K (KL107) y dos variantes de locus O (O1/O2v2 y OL13). Brasil fue el país con la mayor cantidad de genomas (n=72), presentando las dos variantes de locus O mencionadas anteriormente. Las cepas fueron aisladas desde 2012-2022, cinco genomas presentaron OL13, estos cinco genomas correspondían a cepas aisladas el 2019 (n=2) y el 2020 (n=3). Además, solo dos genomas, aislados el 2020, portaron *ybt-17* en ICEKp10 junto a *clb-3*. De los otros genomas O1/O2v2 (n=67), se observó que a partir del 2020 comienzan a aparecer genomas portadores de *ybt* específicamente *ybt-17* en ICEKp10 sumado a *clb-3* y *ybt-10* en ICEKp4. El 2022 se observó la aparición de dos nuevas variantes de *ybt*, encontrando *ybt-14* en ICEKp5 e *ybt-16* en ICEKp12 sumado a *clb-3*. Cabe destacar que todas las cepas pertenecían al SL258 y CG258.

Al igual que los genomas de Brasil, el resto de los genomas ST258 (n=16) pertenecieron al SL258 y CG258. De estos, los más antiguos provenían de cepas aisladas en Colombia (n=4), entre 2009-2012. Tres genomas (2010-2012) fueron portadores de *ybt-17* en ICEKp10 junto a *clb-3* al igual que los genomas de Brasil. Luego, el genoma de la cepa aislada en Chile el 2018 (UCO-490) presentó una variante de *ybt* no vista previamente, *ybt-0* en ICEKp2. De manera consiguiente, de los 3 genomas obtenidos desde cepas aisladas en Perú el año 2021, dos

portaban *ybt-17* en ICEKp10 sumado a *clb-3* similar a los genomas de Brasil y Colombia, mientras que el tercer genoma no presentó los genes mencionados previamente. Los últimos genomas de este linaje en nuestra base de datos corresponden a los obtenidos desde cepas aisladas en Argentina (n=7), Brasil (n=2) y Perú (n=1) en los años 2022. Dos genomas de cepas argentinas portaban *ybt-0* en ICEKp2 como los encontrados en Chile, mientras que los dos genomas provenientes de cepas brasileras presentaron *ybt-10* en ICEKp4 e *ybt-16* en ICEKp12 sumado a *clb-3*.

Las cepas pertenecientes al ST11 (n=17 genomas) presentaron una diversidad de cinco *locus* K (KL15, 39, 62, 64 y 105) y tres *locus* O (O1/O2v1, O1/O2v2, O3b y O4). De estos, Brasil contó con 12 genomas, el primero obtenido desde una cepa aislada el 2015 que presentaba KL64, O1/O2v2 con *ybt-0* en ICEKp10 sumado a *clb-3*. Posteriormente, el 2016, el segundo genoma presentaba KL15, O1/O2v2 con *ybt-9* en ICEKp3. El tercer genoma, correspondiente a una cepa del 2019 presentaba el mismo perfil del primer genoma, con la diferencia que no portaba *ybt*. Ahora bien, el cuarto genoma correspondiente al año 2020 presentaba KL105 y O1/O2v2 con *ybt-10* en ICEKp4 que se encontraba truncado. Los 8 genomas restantes fueron obtenidos de cepas aisladas entre 2021-2022 y fueron KL64 y O1/O2v1 portando *ybt-0* en ICEKp10 sumado a *clb-3*. Dos genomas (ID_1094_21 y S942) presentaron el elemento ICEKp10 truncado.

El resto de los genomas pertenecientes al ST11 (n=5) provenían de Argentina (n=2), Chile (n=1), Perú (n=1) y Venezuela (n=1). Las cepas argentinas fueron aisladas el 2019, presentando KL15 y O4, sumado a *ybt-9* en ICEKp3. La cepa aislada en Chile correspondió a P88, siendo aislada el 2021, presentando KL39 y O3b, este genoma no portó ningún gen de virulencia mencionado anteriormente. La cepa aislada en Perú el 2018 presentó el mismo perfil que los genomas de las cepas argentinas, siendo todas SL258 y CG258, la diferencia entre estas fue la portación de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas, portando, las cepas de Argentina *rmtB1+bla_{NDM-5}*, mientras

que las cepas de Perú portaban *rmtG+bla*_{KPC-2}. Finalmente, la cepa aislada en Venezuela el 2015 presentaba KL62 y O1/O2v1 y no portaba genes de virulencia descritos previamente.

Seis cepas pertenecieron al ST437, pero fueron parte del SL258 y CG258, por lo que estaban estrechamente relacionadas con cepas de los linajes ST11 y ST258 que fueron comentados previamente. Todas las cepas ST437 pertenecieron a Brasil y fueron aisladas entre 2014-2021, sólo no se dispuso la información de la fecha de aislamiento de la cepa Kp77RR. Así mismo, todas las cepas presentaron KL36 y O4, y ninguna presentó alguno de los genes de virulencia mencionados previamente. Cabe destacar que, esta combinación de *locus* solo fue observada en este ST.

El ST25 solo fue encontrado en Chile, siendo KpVA833 la primera cepa, aislada el 2019 y las otras cuatro el 2023. Todas las cepas presentaron KL2, O1/O2v2 sumado a *ybt-14* en ICEKp5. De manera interesante, la cepa KpVA833 perteneció al CG25, mientras que las otras a CG102224.

Todas las cepas ST340 (n=4) pertenecieron a Brasil, al igual que el ST437, el ST340 pertenece al SL258, de estas cepas, dos fueron aisladas el 2011, una el 2014 y 2022, presentando KL15 y O4, tres cepas portaron *ybt-9* en ICEKp3 y una aislada el 2014 portó *ybt-0* en ICEKp5.

Similar a los casos anteriores, todas las cepas pertenecientes al ST16 (n=3) fueron aisladas en Brasil entre los años 2015-2020, presentando KL51 y O3b sin genes de virulencia adicionales. El ST16 pertenece al SL17, el cual se encuentra distante evolutivamente hablando del SL258.

Todas las cepas pertenecientes al ST629 fueron aisladas en Ecuador entre 2020-2021 y presentaron KL20 y KL10 con O3/O3a. El KL20 solo se encontró en Ecuador, mientras que el KL10 también fue encontrado en una cepa aislada en Brasil el 2020 que perteneció al ST629-3LV. De manera similar a lo mencionado en el párrafo anterior, el linaje ST629 se encuentra distante al SL258.

Tres cepas aisladas en Brasil el 2020 fueron ST874, presentando KL24 y O1/O2v1. Dos cepas aisladas en Brasil los años 2019 y 2020 fueron ST378, presentando KL125 y O5. Dos cepas aisladas en Brasil el 2009 y 2011 fueron ST442, presentando KL107 y O1/O2v2, sumado a *ybt-0* en ICEKp5, la cepa del 2011 portaba truncado. Dos cepas aisladas en Ecuador el 2022 fueron ST5, presentando KL39 y O1/O2v1, sumado a *ybt-2* en ICEKp1. Es de suma importancia destacar que estas cepas, además portaron *iuc-3*, *iro-3* truncado y *rmp-3* en ICEKp1.

En Brasil, se aislaron dos cepas, una el 2016 perteneciente al ST129 presentando KL108 y O1/O2v2, sumado a *ybt-10* en ICEKp4; la segunda el 2017, ST219 presentando KL114 y O1/O2v1.

Finalmente, la cepa K2070, aislada en Chile el 2021, ST5830, este linaje pertenece al SL258, CG340. A su vez, presentó KL39 y O3b.

Tabla 10. Descripción del viruloma de genomas de *K. pneumoniae* (Kp1) provenientes de América del Sur. Incluidas las 6 cepas secuenciadas en este trabajo (17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070).

Secuencia	ID- ΩDB	Año	ST	K locus	O locus	ybt	ICEKp	clb	iuc
Brasil									
Kp13	1	2009	ST442	KL107	O1/ O2v2	0	5	-	-
1194	3	2011	ST340	KL15	O4	9	3	-	-
LIM964	14	2011	ST442	KL107	O1/ O2v2	0	5	-	-
ONE259	74	2011	ST340	KL15	O4	9	3	-	-
LIM1375	12	2012	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
LIM1372	13	2012	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
1849	5	2013	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
CCBH 17440	2	2014	ST437	KL36	O4	-	-	-	-
P39	34	2014	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
Kp177	38	2014	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
kp180	39	2014	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
7861H	105	2014	ST340	KL15	O4	0	5	-	-
4448	6	2015	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
P63	22	2015	ST11	KL64	O1/ O2v2	0	10	3	-
P88	28	2015	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-

						O2v2				
P72	30	2015	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
P43	32	2015	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
P27	36	2015	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
P05	37	2015	ST16	KL51	O3b	-	-	-	-	
CCBH	49	2015	ST437	KL36	O4	-	-	-	-	
17428										
CCBH	50	2015	ST437	KL36	O4	-	-	-	-	
19867										
4490	4	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
B30	7	2016	ST437	KL36	O4	-	-	-	-	
BC_5000	15	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
BC_4993	16	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
BC_4987	18	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
BC_4990	19	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
P77	23	2016	ST11	KL15	O1/	9	3	-	-	
						O2v2				
HSP31	24	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
HSP16	25	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
HSP08	26	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
HSP15	27	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
P71	29	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	

					O2v2				
P73	31	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
P48	33	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
P38	35	2016	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
UEB_24	51	2016	ST129	KL108	O1/	10	4	-	-
					O2v2				
BC_5003	17	2017	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
UEB_18	52	2017	ST219	KL114	O1/	-	-	-	-
					O2v1				
ICB KPS7	123	2017	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
CCBH 27588	42	2019	ST378	KL125	O5	-	-	-	-
CCBH 27462	48	2019	ST258	KL107	OL13	-	-	-	-
5916	73	2019	ST16	KL51	O3b	-	-	-	-
CCBH 26794	77	2019	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
Kp65R	81	2019	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
HA40 Kpn	82	2019	ST11	KL64	O1/	-	-	-	-
					O2v1				
L2304797	131	2019	ST258	KL107	OL13	-	-	-	-
CCBH 28206	40	2020	ST874	KL24	O1/	-	-	-	-
					O2v1				
CCBH 27949	41	2020	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
CCBH 28217	43	2020	ST874	KL24	O1/	-	-	-	-
					O2v1				
CCBH	44	2020	ST874	KL24	O1/	-	-	-	-

28026					O2v1				
CCBH	45	2020	ST378	KL125	O5	-	-	-	-
27867									
CCBH	46	2020	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
27695					O2v2				
CCBH	47	2020	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
27584					O2v2				
L15	53	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L2	54	2020	ST258	KL107	O1/	10	4	-	-
					O2v2				
L1	55	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L30	56	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L28	57	2020	ST11	KL105	O1/	10	4*	-	-
					O2v2				
L12	58	2020	ST258	KL107	O1/	10	4	-	-
					O2v2				
L18	59	2020	ST258	KL107	O1/	10	4	-	-
					O2v2				
L3	60	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L6	61	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L5	62	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L24	63	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L16	64	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L33	65	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-
					O2v2				
L31	66	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-

						O2v2				
L9	67	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-	
						O2v2				
L14	68	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-	
						O2v2				
L27	69	2020	ST258	KL107	O1/	10	4	-	-	
						O2v2				
L11	70	2020	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-	
						O2v2				
L20	71	2020	ST258	KL107	OL13	17	10	3	-	
L10	72	2020	ST258	KL107	OL13	17	10	3	-	
CCBH	75	2020	ST258	KL107	OL13	-	-	-	-	
29261										
CCBH	76	2020	ST16	KL51	O3b	-	-	-	-	
29128										
ECLORG	108	2020	ST629	KL10	O3/	-	-	-	-	
10			-3LV		O3a					
M7233093	130	2020	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
						O2v2				
LEMB_	132	2020	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	
UFF_482						O2v2				
1039_21	83	2021	ST11	KL64	O1/	0	10	3	-	
						O2v1				
ID_1201	84	2021	ST258	KL107	O1/	17	10	3	-	
_21						O2v2				
ID_1094	85	2021	ST11	KL64	O1/	0	10*	3	-	
_21						O2v1				
ID_0989	86	2021	ST11	KL64	O1/	0	10	3	-	
_21						O2v1				
ID_1383	87	2021	ST258	KL107	O1/	10	4	-	-	
_21						O2v2				
ID_1042	88	2021	ST11	KL64	O1/	0	10	3	-	
_21						O2v1				
ID_0981	89	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-	

_21					O2v2				
ID_1369A	90	2021	ST437	KL36	O4	-	-	-	-
_21									
ID_0959	91	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
_21					O2v2				
ID_0384	92	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
_21					O2v2				
ID_0302	93	2021	ST11	KL64	O1/	0	10	3	-
_21					O2v1				
ID_0108	95	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
_21					O2v2				
ID_0662	96	2021	ST11	KL64	O1/	0	10	3	-
_21					O2v1				
ID_0727	97	2021	ST11	KL64	O1/	0	10	3	-
_21					O2v1				
ID_0516	99	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
_21					O2v2				
ID_0893	100	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
_21					O2v2				
ID_0900	101	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
_21					O2v2				
N5062754	124	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
N4293546	125	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
N4292977	126	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
N4213107	127	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
N3182918	128	2021	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
M9171130	129	2021	ST258	KL107	O1/	14	5	-	-
					O2v2				
ID_0016	94	2022	ST258	KL107	O1/	16	12	3	-

_22					O2v2				
ID_0698	98	2022	ST258	KL107	O1/	10	4	-	-
_22					O2v2				
P19	106	2022	ST340	KL15	O4	9	3	-	-
S942	107	2022	ST11	KL64	O1/	0	10*	3	-
					O2v1				
Kp77RR	80	SI	ST437	KL36	O4	-	-	-	-
Argentina									
HA30	78	2019	ST11	KL15	O4	9	3	-	-
HA31	79	2019	ST11	KL15	O4	9	3	-	-
M28413	112	2022	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
M28162	113	2022	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
M28206	114	2022	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
M28195	115	2022	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
M28196	116	2022	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
Kp-NDM-5	119	2022	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
Kp-NDM-5	120	2022	ST258	KL107	O1/	-	-	-	-
					O2v2				
Chile									
UCO-490	21	2018	ST258	KL107	O1/	0	2	-	-
					O2v2				
KpVA833	133	2019	ST25	KL2	O1/	14	5	-	-
					O2v2				
P88	P88	2021	ST11	KL39	O3b	-	-	-	-
K2070	K207	2021	ST5830	KL39	O3b	-	-	-	-
	0								
17U	17U	2023	ST25	KL2	O1/	14	5	-	-
					O2v2				

28U	28U	2023	ST25	KL2	O1/ O2v2	14	5	-	-
40U	40U	2023	ST25	KL2	O1/ O2v2	14	5	-	-
41U	41U	2023	ST25	KL2	O1/ O2v2	14	5	-	-
Colombia									
COL-Kpn66	11	2009	ST258	KL107	O1/O2v2	-	-	-	-
COL-Kpn79	10	2010	ST258	KL107	O1/ O2v2	17	10*	3	-
COL-Kpn88	9	2011	ST258	KL107	O1/ O2v2	17	10*	3	-
COL-Kpn96	8	2012	ST258	KL107	O1/ O2v2	17	10*	3	-
Ecuador									
ECLORG28- kpc	110	2020	ST629	KL20	O3/ O3a	-	-	-	-
ECLORG29- kpc	111	2020	ST629	KL10	O3/ O3a	-	-	-	-
ECLORG37- kpc	109	2021	ST629	KL20	O3/ O3a	-	-	-	-
HEE45_1	102	2022	ST5	KL39	O1/ O2v1	2	1	-	3
HEE38_1	103	2022	ST5	KL39	O1/ O2v1	2	1	-	3
Perú									
KpCR01	104	2018	ST11	KL15	O4	9	3	-	-
IIH-371	117	2021	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
K2KPC	121	2021	ST258	KL107	O1/ O2v2	17	10	3	-
K1KPC	122	2021	ST258	KL107	O1/ O2v2	17	10	3	-

IIH-375	118	2022	ST258	KL107	O1/ O2v2	-	-	-	-
Venezuela									
12904	20	2015	ST11	KL62	O1/O2v1	-	-	-	-

Secuencia | nombre de la secuencia de RefSeq; ID-ΩDB | número correlativo de la base de datos ΩDB, Año | Año de aislamiento; *ybt* | variante de yersiniabactina; ICEKp | variante de elemento integrativo conjugativo ICEKp; *clb* | variante de colibactina; *iuc* | variante de aerobactina; * | gen truncado; - | gen ausente; SI | Sin información.

Análisis de plásmidos putativos portadores de genes de 16S-RMTasas y carbapenemasas

Se logró reconstruir un total de 29 plásmidos putativos a partir de las 6 secuencias trabajadas en esta tesis (17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070). Los datos son presentados en la **Tabla 11**. De estos 29 plásmidos putativos, el plásmido pAA860 fue reconstruido en los genomas de las cepas 17U, 28U, 40U, 41U y P88 y, corresponde a un plásmido con potencial capacidad conjugativa, perteneciente al grupo de incompatibilidad tipo IncC, portador de los genes *rmtC* y *bla*_{NDM-1}. Cabe destacar que en el plásmido pAA860 reconstruido desde el genoma 28U, se identificaron, además del grupo de incompatibilidad IncC los grupos de incompatibilidad IncFIB, IncFII, rc-2183.

En cuanto a los genomas de las cepas 17U y 28U co-portadoras de *bla*_{NDM-1} y *bla*_{KPC-2}, en el genoma de 17U el gen *bla*_{KPC-2} se encontró en el plásmido con potencial capacidad conjugativa denominado pAA018. En el plásmido pAA018 se identificaron los grupos de incompatibilidad IncFIB, IncFII, rc-2183. Mientras que, en el genoma de 28U el gen *bla*_{KPC-2} fue encontrado en el plásmido pAA356

posiblemente no movilizable, para el cual no fue posible asignar un grupo de incompatibilidad. Estos resultados sugieren que la portación del gen *bla*_{KPC-2} estaría mediada por plásmidos diferentes a los que median la movilización de los genes *bla*_{NDM-1} y *rmtC*. Además, los dos plásmidos que portaron el gen *bla*_{KPC-2} fueron diferentes según el análisis. Cabe destacar que en el plásmido pAA356 se reconstruyó la plataforma Tn4401-*bla*_{KPC-2} sumado a un par de genes codificantes implicados en la conjugación, proteínas hipotéticas y secuencias de inserción, por lo que, considerando que la asignación al plásmido más cercano pRYCKPC3.1 corresponde solo a una plataforma Tn4401-like, la reconstrucción del plásmido pAA356 podría no corresponder al plásmido donde realmente se encuentre el gen *bla*_{KPC-2}.

En cuanto a el genoma de la cepa K2070, se determinó que *bla*_{VIM-2} se encontró en el plásmido conjugativo pAA336 que presentaba los grupos de incompatibilidad IncFIA, IncFIC y rc-2232.

Tabla 11. Descripción de plásmidos putativos reconstruidos utilizando los genomas de cepas 17U, 28U, 40U, 41U, P88 y K2070.

Cepa	NPP	TRP	Tamaño (pb)	TR	PM	SMC	GRAMMPs
17U	AA860 ^a	IncC	143,543	MOBH MOBH	C	MH995506.1	<i>bla</i> _{NDM-1} <i>ble</i> -MBL <i>aadA2</i> <i>dfrA12</i> <i>sul1</i> <i>bla</i> _{CMY-6} <i>rmtC</i>
	AA018 ^a	IncFIB, IncFII, rc-2183	99,870	MOBF MOBF	C	KU665642.1	<i>bla</i> _{KPC-2} <i>aph(3')-Ia</i>
	AA170 ^a	rc-2232	81,436	MOBF	C	MH454107.1	-
	AA966 ^a	IncFII	54,543	MOBP	C	CP035205.1	<i>qnrB19</i>
	AC249 ^a	-	6,028	-	NM	KU254581.1	<i>mph(A)</i>
28U	AA860 ^a	IncC, IncFIB, IncFII, rc-2183	213,755	MOBF MOBF MOBH MOBH	C	MH995506.1	<i>bla</i> _{NDM-1} <i>ble</i> -MBL <i>aac(6')-Ib</i> <i>sul1</i> <i>rmtC</i>
	AA966 ^a	IncFII, IncR	70,812	MOBP	C	CP035205.1	<i>qnrB19</i>
	AA356 ^a	-	21,367	-	NM	NC_019151. 1	<i>bla</i> _{KPC-2}
	AA583 ^a	-	4,796	-	NM	CP021135.1	-
40U	AA860 ^a	IncC	139,048	MOBH MOBH	C	MH995506.1	<i>bla</i> _{NDM-1} <i>ble</i> -MBL <i>aadA2</i> <i>rmtC</i> <i>bla</i> _{CMY-6}

							<i>dfrA12</i>
	AA966 ^a	IncFII, IncR	74,121	MOBP	C	CP035205.1	<i>qnrB19</i> <i>bla</i> _{TEM}
	AA045 ^a	IncFIB	41,291	-	NM	CP011654.1	-
	AC249 ^a	-	6,270	-	NM	KU254581.1	<i>mph(A)</i>
	AB595 ^a	-	4,827	-	NM	CP001386.1	<i>aph(6)-I_d</i> <i>aph(3'')-I_b</i> <i>sul2</i>
41U	AA860 ^a	IncC	150,010	MOBH MOBH	C	MH995506.1	<i>bla</i> _{NDM-1} <i>ble-MBL</i> <i>bla</i> _{CMY-6} <i>bla</i> _{CTX-M-2} <i>bla</i> _{OXA-10} <i>aadA1</i> <i>arr-2</i> <i>cmlA5</i> <i>rmtC</i>
	AA966 ^a	IncFII, IncR	74,952	MOBP	C	MH341574.1	<i>bla</i> _{TEM-1} <i>aph(6)-I_d</i> <i>aph(3'')-I_b</i> <i>sul2</i>
	AE971 ^a	-	1,982	-	NM	KX756454.1	<i>qnrB19</i>
P88	AA860 ^a	IncC	159,930	MOBH MOBH	C	MH995506.1	<i>bla</i> _{NDM-1} <i>ble-MBL</i> <i>dfrA17</i> <i>aadA5</i> <i>aac(3)-II_d</i> <i>bla</i> _{CMY-6} <i>sul1</i> <i>rmtC</i>
	AA434 ^a	IncFII	72,455	MOBF	C	CP025040.1	-
	AA173 ^a	IncFIA, IncFIA, IncFIC,	42,480	-	NM	LS998786.1	<i>bla</i> _{TEM-1}

		IncFIA, IncFIC					
	AA942 ^a	rc-2350	8,459	MOBP	M	NC_022083. 1 ^b	-
	AC249 ^a	-	6,968	-	NM	KU254581.1	<i>mph(A)</i>
	AA236 ^a	-	17,492	-	NM	NC_004632. 1	-
	AG799 ^a	IncFIB	2,540	-	NM	AY230888.1	-
K2070	AC741 ^a	rc-435	38,289	MOBP	M	CP014764.1	<i>bla_{VIM-2}</i> <i>erm(B)</i>
	AA336 ^a	IncFIA, IncFIC, rc-2232	75,364	MOBF	C	CP035479.1	<i>bla_{TEM-1}</i>
	AA173 ^a	IncFIA, IncFIA, IncFIC, IncFIB	39,329	-	NM	CP032425.1	-
	AA942 ^a	rc-2350	8,743	MOBP	M	NC_022083. 1 ^b	-
	AA710 ^a	IncFIC, IncFII	103,491	MOBF	C	CP019187.1	<i>arsCBDR</i> <i>pcoAR</i> <i>silAPR</i> <i>merAEDRT</i>

NPP | Nombre del plásmido putativo; TRP | tipo de replicón; SMC | número de acceso GenBank de la secuencia más cercana; GRAMMPs | genes de resistencia a antimicrobianos y metales pesados; TR | tipo de relaxasa; PM | predicción de movilidad; C | conjugativo; M | movilizable NM | no movilizable; a | Secuencias incompletas; b | Archivo eliminado de RefSeq; rc | rep-*cluster*; - | gen ausente.

Respecto a las estructuras de los plásmidos pAA860 (*rmtC*, *bla*_{NDM-1}), pAA018 (*bla*_{KPC-2}), pAA356 (*bla*_{KPC-2}) y pAA336 (*bla*_{VIM-2}), todos fueron comparados con las secuencias más cercanas obtenidas mediante el análisis bioinformático. Para pAA860, la secuencia más cercana correspondió al plásmido pCFR17394 (MH995506.1) (**Figura 17**) perteneciente a una cepa de *Citrobacter freundii* (M17394) aislada en Argentina el 2014 desde un paciente de una muestra de hisopado rectal. El plásmido pAA860 presentó valores de ANI (*Average Nucleotide Identity*) entre 99,82-99,95% y *coverage* entre 97-100% respecto a la secuencia del plásmido pCFR17394. En el plásmido pAA860 se asociaron 3 *contigs* adicionales, lo cuales no presentaron homologías respecto a la secuencia de pCFR17394 u otras secuencias de los otros pAA860. Cabe destacar que en la secuencia de pAA860 encontrado en la cepa 40U se observó una diferencia en la arquitectura genética. En general, río arriba de la secuencia de inserción IS1380-like ISEcp1 se encuentra el gen *bla*_{CMY-6}; sin embargo, en esta secuencia, río arriba se encontró *rmtC*, seguido de genes codificantes de endonucleasas, metiltransferasas de ADN, *copG*, genes codificantes de proteínas hipotéticas. Adicionalmente, el plásmido pAA860 presentó relaxasas tipo MOBH y MO.

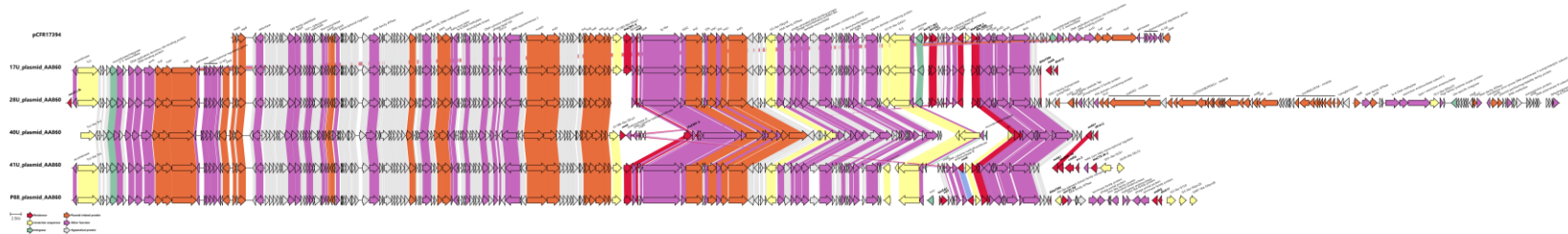


Figura 17. Análisis comparativo del plásmido pAA860 mediante MOB-recon contra el plásmido más cercano (*mash nearest neighbor*) pCFR17394 (número de acceso Genbank: MH995506.1) de la base de datos proporcionada por MOB-cluster.

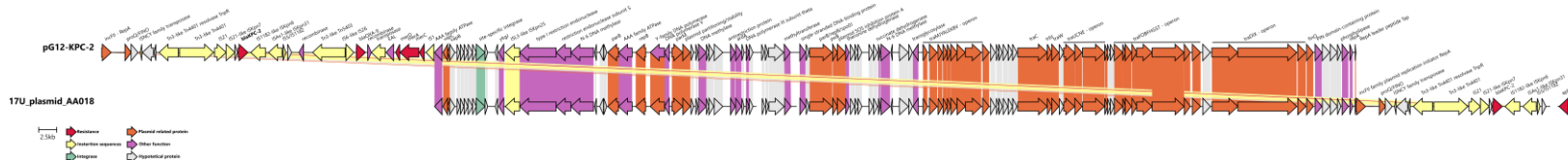


Figura 18. Análisis comparativo del plásmido pAA018 portador del gen *bla*_{KPC-2}, reconstruido de la secuencia 17U mediante la herramienta MOB-recon contra el plásmido más cercano (*mash nearest neighbor*) pG12-KPC-2 (número de acceso GenBank: KU665642.1) de la base de datos proporcionada por MOB-cluster.

Por otra parte, en la **Figura 18** se puede observar que para el plásmido pAA018 (*bla*_{KPC-2}), la secuencia más cercana correspondió al plásmido pG12-KPC-2 (KU665642.1) portado por una cepa de *K. pneumoniae* (K47-25) aislada en Noruega el 2007 desde una muestra clínica de expectoración. El plásmido pAA018 presentó valores de ANI de 99,99% y *coverage* de 91% respecto a la secuencia pG12-KPC-2. La diferencia entre ambos plásmidos consistió en que pAA018 no presentó los genes río arriba de IS5/IS1182, siendo estos, el segmento dado entre los genes codificante de la enzima recombinasa, seguido de Tn3-like IS26, hasta el gen de IS1 precedido del operón *merACD*.

En la **Figura 19** se presenta el análisis para el plásmido pAA356 (*bla*_{KPC-2}), detectándose que la secuencia más cercana correspondió al plásmido pRYCKPC3.1 (NC_019151.1) encontrado en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en España entre 2009-2010. El plásmido pAA356 presentó valores de ANI de 99,93% y *coverage* del 100% respecto a la secuencia pRYCKPC3.1. Por otro lado, para el plásmido pAA356 se asociaron 4 *contigs* más en la estructura putativa.

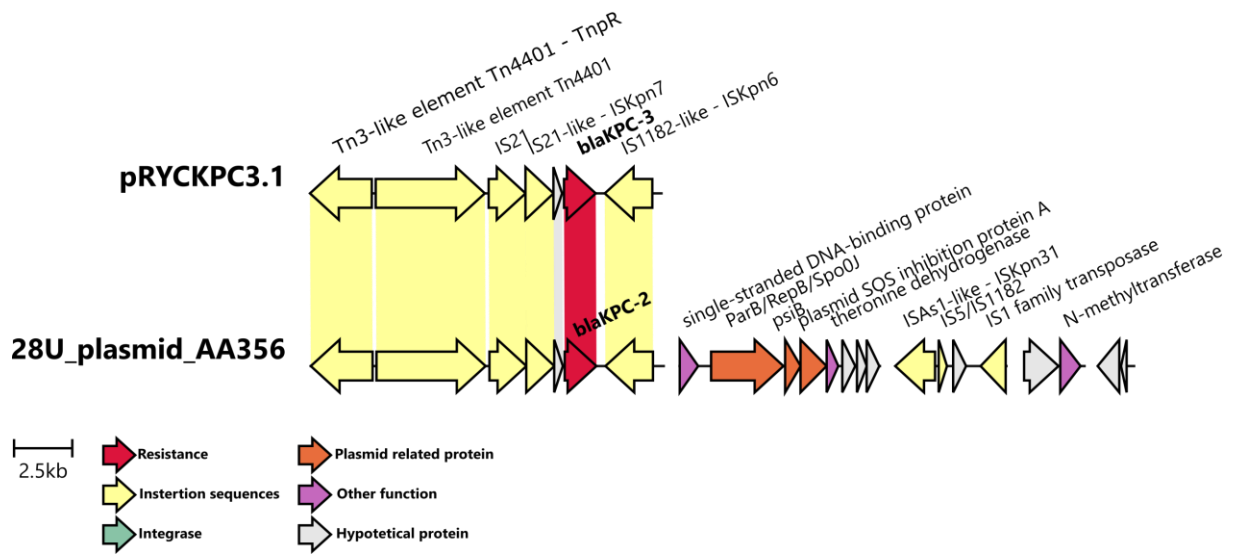


Figura 19. Análisis comparativo del plásmido pAA356 portador del gen *bla*_{KPC-2}, inferido en el genoma de 28U mediante la herramienta MOB-recon contra el plásmido más cercano (mash nearest neighbor) pRYCKPC3.1 (número de acceso Genbank: NC_019151.1) de la base de datos proporcionada por MOB-cluster.

El análisis para el plásmido pAC741 (*bla*_{VIM-2}), indicó que la secuencia más cercana correspondió al plásmido pKPN-704 (CP014764.1) detectado en una cepa de *K. pneumoniae* (KPNIH39) aislada en USA el 2014 (**Figura 20**) El plásmido pAC741 presentó valores de ANI de 99,34% y *coverage* de 79% respecto a la secuencia pKPN-704. Cabe destacar que ambas secuencias tuvieron diferencias de 25 genes entre sí. Entre estas diferencias, pAC741 no portó el módulo genético desde *kfrB* hasta la duplicación de topoisomerasas que se encontraron río arriba. Por contraparte, pKPN-704 no compartió el módulo genético desde el gen codificante de *MLS leader peptide* hasta el gen de *intI1* río arriba del gen *bla*_{VIM-2}

encontró que *rmtC* y *bla_{NDM-1}* estaban en contigs diferentes, pero seguían la misma estructura que la descrita previamente, pero sin IS1. La secuencia de 40U fue diferente a las anteriores, tal como se describió en el apartado “Análisis de plásmidos putativos portadores de genes de 16S-RMTasas y carbapenemasas” *rmtC* se encontró flanqueado río arriba por IS1380-like, seguido de genes *traA*, *traV*, etc. Mientras que, en otro contig, se encontró *bla_{NDM-1}* flanqueado río abajo por IS1 y río arriba por la estructura ya descrita para este gen.

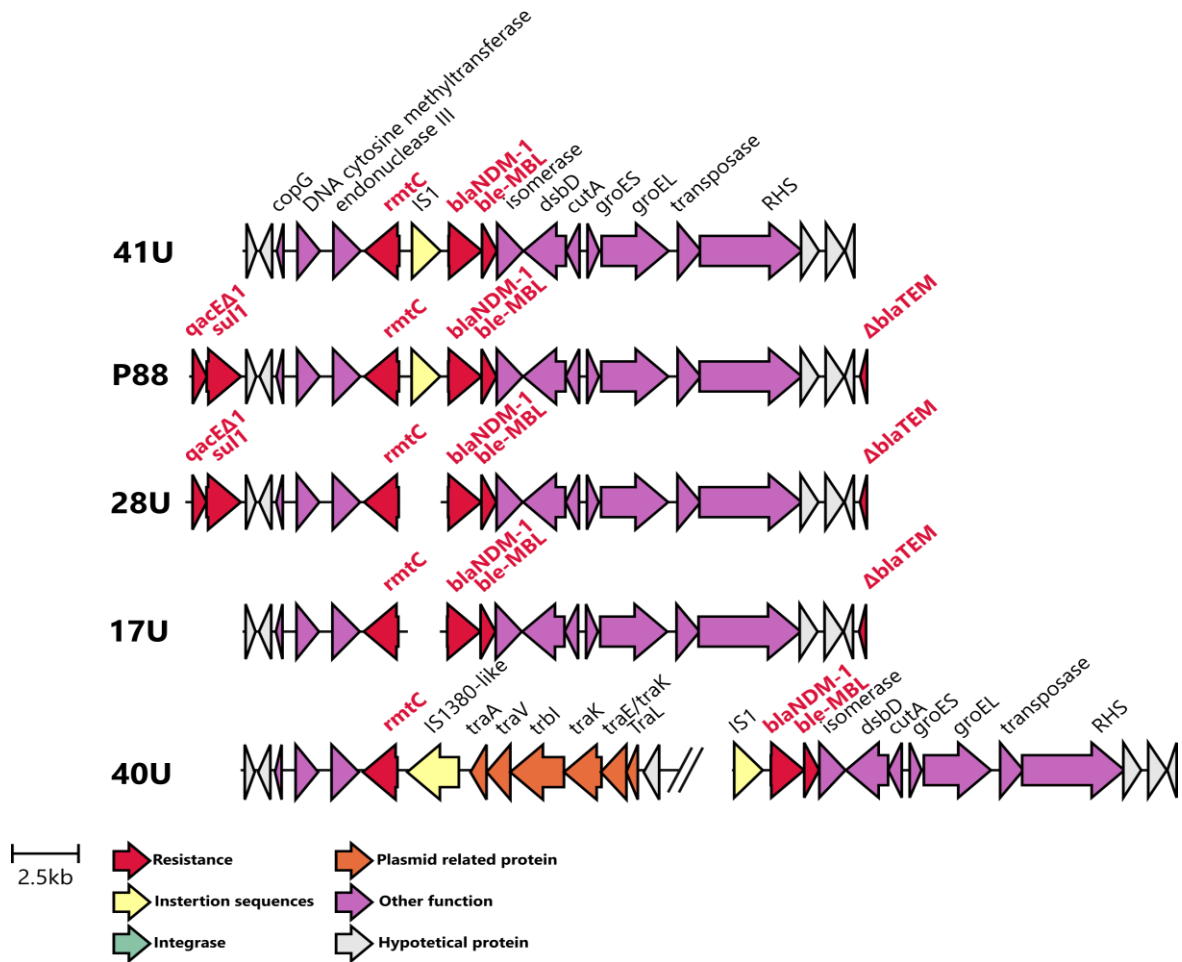


Figura 21. Entorno genético de *rmtC* y *bla_{NDM-1}* detectados en los genomas de las cepas 17U, 28U, 40U, 41U y P88.

En las secuencias 28U y 17U se encontró el gen *bla*_{KPC-2} portado en el transposón Tn4401 (Figura 22). Adicionalmente, el contig de 17U presentó dos secuencias de inserción ISAs 1-like e IS5 rio abajo de IS1182-like.

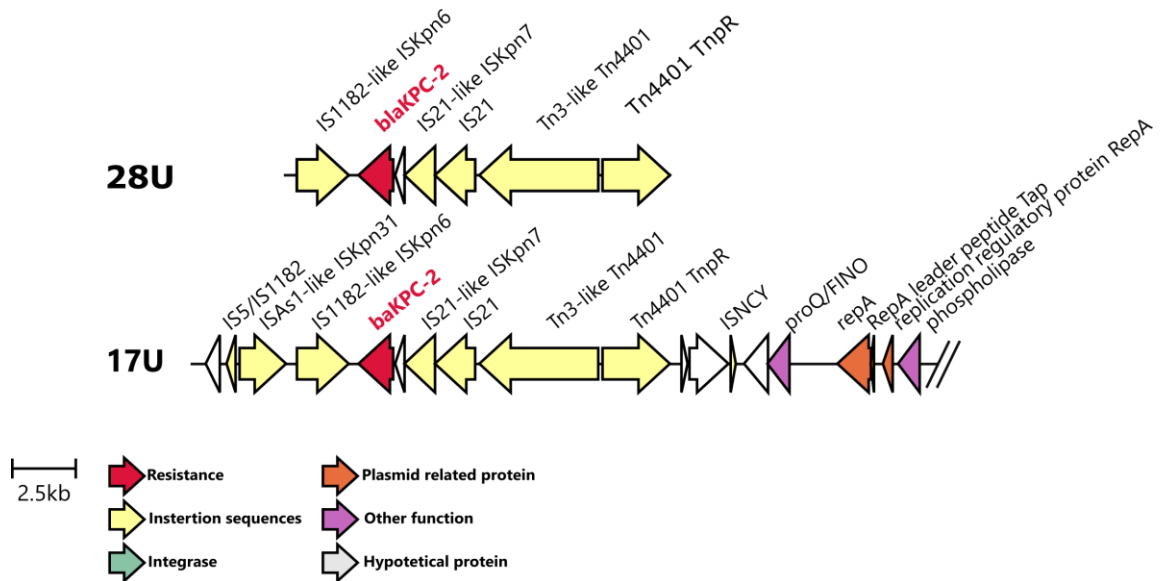


Figura 22. Entorno genético de *bla*_{KPC-2} de genomas 17U y 28U.

Lamentablemente *rmtD2* se encontró en un contig fragmentado (Figura 23), por lo que no fue posible asociarlo a algún plásmido, sin embargo, aparentemente, rio arriba de *rmtD2* se encuentra una secuencia de inserción.

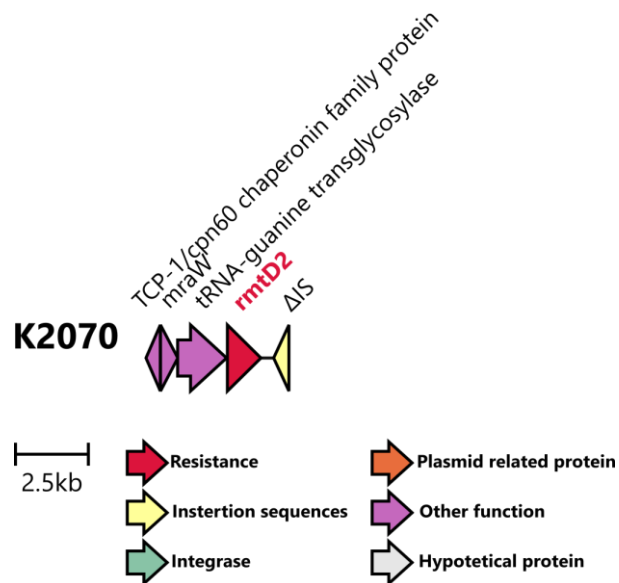


Figura 23. Entorno genético de *rmtD2* de genoma K2070.

En la secuencia K2070, el gen *bla_{VIM-2}* se encontró en la zona variable de un integrón de clase 1 (**Figura 24**). Sin embargo, solo se observó la secuencia del gen de *intI1*, no encontrando la región 3' conservada, dada por los genes *qacEΔ1*, *sul1* y el marco de lectura abierto *orf5*.

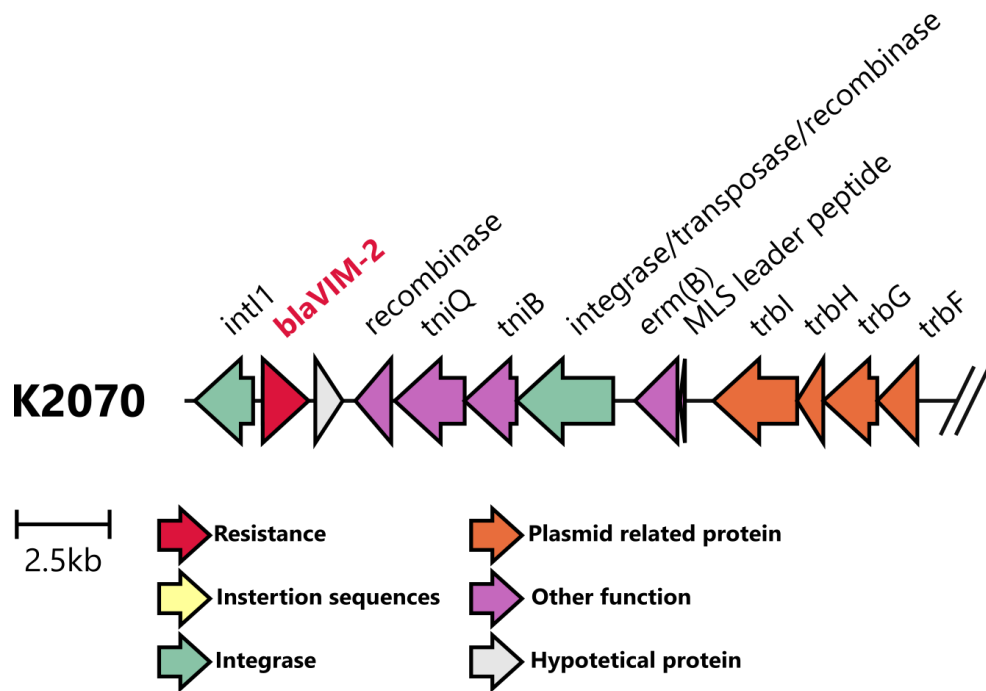


Figura 24. Entorno genético de *bla*_{VIM-2} en el genoma K2070.

DISCUSIÓN

La co-diseminación de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas representa un desafío y un riesgo significativo para el manejo terapéutico de infecciones causadas por patógenos multirresistentes, particularmente aquellos resistentes a antimicrobianos de última línea como los carbapenémicos. Actualmente, el mayor uso de carbapenémicos en el ambiente clínico, tanto a nivel mundial como en Chile, ha generado una alta presión de selección sobre las poblaciones bacterianas, favoreciendo la emergencia y expansión de clones resistentes, especialmente entre bacilos Gram negativos. En este escenario, *K. pneumoniae* ha destacado por su notable capacidad de adquisición, mantenimiento y expresión de mecanismos de resistencia a carbapenémicos, siendo las carbapenemasas del tipo KPC y NDM los principales mecanismos implicados en esta resistencia.

Ante este escenario, la eventual incorporación al arsenal clínico de nuevas moléculas diseñadas para el tratamiento de Enterobacterales productores de carbapenemasas, como aztreonam/avibactam, cefepime/taniborbactam y cefiderocol aun parece lejana para su implementación en nuestro país. Además, el elevado costo asociado a estas terapias representa un desafío importante para el sistema de salud, particularmente en contextos de recursos limitados. En este aspecto, los aminoglucósidos continúan siendo considerados una alternativa terapéutica valiosa frente a infecciones causadas por *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos. Sin embargo, diversos estudios han reportado la presencia de cepas co-portadoras de genes codificantes de carbapenemasas junto a 16S-RMTasas, situación que compromete aún más las opciones terapéuticas disponibles.

En Chile, el estado actual respecto a la co-portación de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas en cepas clínicas de *K. pneumoniae* continúa siendo escasamente explorado. Por ello, la presente tesis abordó esta problemática mediante el empleo de herramientas fenotípicas, moleculares y genómicas, permitiendo identificar co-portaciones no reportadas hasta la fecha a nivel nacional.

Co-portación de *armA* junto a carbapenemasas

La co-portación del gen *armA* junto a diferentes genes codificantes de carbapenemasas ha sido ampliamente reportada a nivel mundial, es decir en todos los continentes, con excepción de la Antártida. El primer hallazgo en Chile corresponde a la cepa UCO318 estudiada en esta tesis, la cual es co-portadora de *armA+bla_{KPC-2}*. Es relevante mencionar que esta cepa corresponde al primer aislado portador de *bla_{KPC-2}* en ingresar a Chile, proveniente de un paciente italiano. Si bien, este hallazgo fue publicado el año 2012 por Cifuentes *et al.* En dicho estudio no pesquisaron la presencia del gen *armA*. Además, UCO318 no estuvo relacionada de manera clonal con ninguna otra cepa en el estudio de ERIC-PCR. La co-portación de *armA+bla_{KPC-2}* fue reportada por primera vez en China el año 2006 en una cepa de *K. pneumoniae* (KP048) en donde se encontró que ambos genes estaban localizados en un mismo plásmido, denominado pKP048, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncF (Jiang *et al.*, 2010).

Respecto a las otras cinco cepas *armA+bla_{KPC}* pesquisadas en esta tesis, todas fueron aisladas el año 2019 en el Hospital Sótero del Río en Santiago. Cuatro de estas cinco cepas se agruparon en dos *clusters*, lo que sugiere que la co-

portación de *armA+bla_{KPC}* no estaría asociada a cepas relacionadas genéticamente, si no que al menos a dos posibles linajes.

Lamentablemente ninguno de los genomas secuenciados en esta tesis presentó la co-portación de *armA+bla_{KPC-2}*; sin embargo, de los genomas de Latinoamérica presentes en la Ω DB se encontró que cinco genomas portaban *armA* y *bla_{KPC-2}*, cuatro provenientes de Brasil pertenecientes al ST437 aislados entre los años 2014 y 2015 y un genoma perteneciente a Chile publicado por Veloso *et al.* (2023), perteneciente al ST25 aislado el año 2019. Sumado a esto, la reciente publicación realizada por Quesille-Villalobos *et al.* (2025), reportó una cepa de *K. pneumoniae* aislada en Chile, ST25 co-portadora de *armA+bla_{KPC-2}+bla_{NDM-7}*. Es así como, la evidencia presentada previamente, contrasta respecto a diferentes regiones del mundo, debido a que los linajes mencionados no han sido reportados co-portando *armA+bla_{KPC-2}* en otras regiones, lo que sugiere un fenómeno de adquisición de estos genes mediado posiblemente por elementos genéticos móviles en linajes propios de cada país. Cabe destacar que, en Asia, se han encontrado cepas de *K. pneumoniae* que pertenecen a los ST10, ST11, ST15, ST37, ST263, ST314, ST392, ST395, ST494 y ST2237 co-portando *armA+bla_{KPC-2}* (Cheng *et al.*, 2016; Y. Liu *et al.*, 2015; Shen *et al.*, 2020; T. Zhou *et al.*, 2015; Y. Zhou *et al.*, 2022). Incluso, *armA* se ha encontrado co-portada junto a *rmtB* (*armA+rmtB*) (Wang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2015) y *bla_{KPC-2}+bla_{VIM-2}* o *bla_{KPC-2}+bla_{IMP-4}* (Liu *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2015).

En esta misma línea, en Europa, el primer reporte de una cepa de *K. pneumoniae* co-portadora de *armA+bla_{KPC-2}* fue realizado en Polonia el año 2009, esta cepa perteneció al ST258. Luego, dos reportes de Italia y uno de Suiza revelaron la circulación de cepas co-portadoras pertenecientes a los ST512, ST147, ST101 y ST2502 (Arena *et al.*, 2020; Frasson *et al.*, 2012; Mezzatesta *et al.*, 2013; Zacharczuk *et al.*, 2011). Es importante señalar que en la presente tesis se encontró una cepa doble co-portadora de 16S-RMTasa (7U) *armA+rmtC+bla_{KPC}*,

esta cepa no presentó relación genética con ninguna otra cepa, lo que es sugerente de un posible linaje diferente a los demás.

Respecto a la co-portación de *armA+bla_{NDM}*, solo una cepa (K2044) presentó esta combinación, la cual fue aislada el año 2019 y no presentó relación genética con ninguna otra. Cabe destacar que, de los genomas de Latinoamérica presentes en la Ω DB, ninguno co-portaba *armA+bla_{NDM-1}* por lo que la cepa K2044 es la segunda cepa de *K. pneumoniae* en presentar esta co-portación, siendo antecedida por el reporte previamente mencionado de Quesille-Villalobos *et al.* (2025). Sin embargo, K2044 fue aislada el 2019 a diferencia de la cepa de Quesille que fue aislada el 2022, por lo que K2044 podría aportar información relevante respecto a las plataformas implicadas en un fenómeno de diseminación inicial de *armA* junto con *bla_{NDM}* a nivel nacional y latinoamericano.

Ahora bien, el primer reporte de la co-portación *armA+bla_{NDM}* a nivel mundial fue realizado en el año 2008 en Asia, particularmente en Bangladesh en cepas de *K. pneumoniae* (Islam *et al.*, 2012, 2013). Luego se reportó el mismo fenómeno en cepas de la misma especie aisladas en Omán pertenecientes al ST14 y ST340 (Poirel, Al Maskari, *et al.*, 2011), en China pertenecientes al ST1031 (Hu *et al.*, 2013), Pakistán y Nepal (sin información de ST), Líbano (ST15) e Irán (ST147) (Bahramian *et al.*, 2019; Day *et al.*, 2013; Salloum *et al.*, 2017; Tada *et al.*, 2013). En el caso de Nepal además de *armA+bla_{NDM-1}* las cepas co-portaban *bla_{OXA-72}*, este último gen solo había sido reportado previamente en cepas de *Acinetobacter species* (Tada *et al.*, 2013). Cabe destacar que, según la base de datos Ω DB, el ST340 fue reportado en Brasil, co-portando los genes *bla_{KPC-2}* junto con *rmtG* o *rmtB1*. Lo cual indica un posible fenómeno de adquisición de elementos genéticos móviles con determinantes de resistencia propios de cada territorio por parte de linajes de distribución mundial.

Por otro lado, en Europa, la introducción de *bla_{NDM-1}* fue mediada por una cepa de *K. pneumoniae* perteneciente al ST231 el año 2010, la cual, adicionalmente

co-portaba *armA* (Oteo *et al.*, 2012). Caso similar a la introducción de *bla*_{KPC-2} en Chile (Cifuentes *et al.*, 2012), la llegada del gen *bla*_{KPC-2} fue mediado por una cepa de *K. pneumoniae* que co-portaba *armA*. Además, se han encontrado cepas de *K. pneumoniae* co-portadoras de *armA* y *bla*_{NDM-1} en Suiza pertenecientes al ST101 (Seiffert *et al.*, 2014), Ucrania pertenecientes al ST395 (Gann *et al.*, 2023) y Bulgaria (Takei *et al.*, 2024) pertenecientes a los ST1068 y ST147.

Es importante destacar que, para el caso de América, los primeros reportes de co-portación de *armA* y *bla*_{NDM-1} fueron realizados el año 2013 en USA (Doi *et al.*, 2014) y Brasil (Bail *et al.*, 2021; Quiles *et al.*, 2015).

Debido a la limitada información disponible sobre el continente africano, el trabajo de Poirel *et al.* (2018) aporta datos relevantes sobre una cepa de *K. pneumoniae* co-portadora de *armA+bla*_{NDM-5}, aislada en Angola el año 2015 la cual perteneció al ST307, linaje con amplia diseminación a nivel mundial (Peirano *et al.*, 2020).

Estos hallazgos vuelven a poner de manifiesto la limitada información disponible tanto en esta tesis como en la literatura científica, siendo el ST25, hasta la fecha, el único linaje co-portador de los genes *armA* y *bla*_{NDM-1} reportado en Chile.

Co-portación de *rmtC* junto a carbapenemasas

La co-portación de *rmtC* junto a diferentes genes codificantes de carbapenemasas ha sido reportada con menor frecuencia que *armA*. No obstante, se han identificado cepas de *K. pneumoniae* co-portadoras en todos los continentes, con excepción de la Antártida. En la presente tesis, la primera cepa encontrada en esta tesis que presentó la co-portación de *rmtC* y una carbapenemasa fue la cepa K2067, aislada en 2019, la cual presentaba los genes

rmtC y *bla*_{NDM}. Esta cepa formó parte de un *cluster* junto con las cepas P88 y UCO333.

Aunque estas cepas fueron agrupadas en un mismo *cluster* mediante la técnica ERIC-PCR, el análisis de tipificación por MLST reveló que pertenecen a linajes genéticamente distintos. La cepa P88, aislada en 2021 en Concepción, correspondía al ST11, *gapA*(3), *infB*(3), *mdh*(1), *pgi*(1), *phoE*(1), *rpoB*(1) y *tonB*(4). En contraste, UCO333, aislada en 2013 en Santiago, pertenece al ST1161 el cual se estructura considerando las variantes alélicas *gapA*(2), *infB*(3), *mdh*(2), *pgi*(2), *phoE*(6), *rpoB*(4) y *tonB*(111). Las diferencias observadas en seis de los siete loci del esquema MLST evidencian una posible divergencia genética significativa entre ambas cepas. Este hallazgo pone de manifiesto una limitación importante de la técnica ERIC-PCR, ya que puede agrupar erróneamente cepas no relacionadas filogenéticamente, lo que podría conducir a interpretaciones incorrectas en estudios de vigilancia epidemiológica.

Acorde a los genomas de Latinoamérica presentes en la Ω DB, la primera cepa en presentar co-portación de los genes *rmtC* junto a carbapenemasas fue UCO490 perteneciente al ST258 y aislada en Chile el año 2018, mientras que los otros genomas fueron aislados el año 2020 en Brasil y pertenecieron al ST874 (3) y ST16 (1). Esto indicaría que K2067 sería la segunda cepa reportada a nivel de Latinoamérica en presentar esta co-portación. Sin embargo, el trabajo publicado por Bail *et al.* (2021) en donde se determinó la portación de genes codificantes de 16S-RMTasa en cepas de Enterobacterales en Brasil aisladas entre los años 2013 y 2015, reporta la presencia de cepas de *K. pneumoniae* portadoras de *rmtC* y *bla*_{NDM-1}, por lo que nuestro hallazgo sería el tercer reporte en Latinoamérica respecto a la co-portación de *rmtC* y carbapenemasas.

Las veinticuatro cepas portadoras de *rmtC* fueron aisladas entre los años 2019 y 2023 y co-portaron *bla*_{NDM} (22) y *bla*_{KPC} & *bla*_{NDM} (2). Las cuatro cepas co-

portadoras de *rmtC* junto a carbapenemasas que fueron secuenciadas en esta tesis pertenecieron al ST25 y fueron aisladas en Concepción.

Un estudio publicado recientemente por Papa-Ezdra *et al.* (2024) reporta una cepa de *K. pneumoniae* perteneciente al ST258 aislada en Uruguay el año 2017 co-portadora de *rmtC* y *bla*_{NDM-1}.

Considerando los antecedentes previamente expuestos, la co-portación de *rmtC* y carbapenemasas ha sido identificada en tres linajes diferentes en Latinoamérica, ST25 en Chile, ST874 en Brasil y ST258 en Uruguay.

En el contexto latinoamericano, se evidencia nuevamente, discrepancias con respecto a la información disponible en la literatura internacional. Las primeras cepas co-portadoras de *rmtC+bla*_{NDM-1} fueron aisladas en Asia, específicamente en Bangladesh entre los años 2008 y 2010. A diferencia de lo observado con *armA*, no se encontraron estudios provenientes de China que reporten la asociación de *rmtC* con alguna carbapenemasa en cepas de *K. pneumoniae*. Sin embargo, estudios realizados en países como Nepal, India, Vietnam, Arabia Saudita, Turquía, Irán y Pakistán, han reportado la co-portación de *rmtC* junto a *bla*_{NDM-1}, *bla*_{NDM-6}, *bla*_{NDM-7} y *bla*_{NDM-1+bla}_{KPC-2} en cepas pertenecientes a los ST15, ST35, ST147, ST152, ST268, ST340, ST395 (Agamy *et al.*, 2019; Day *et al.*, 2013; Kiaei *et al.*, 2018, 2019; Pajand *et al.*, 2020; Rahman *et al.*, 2014; Shankar *et al.*, 2019; Tada *et al.*, 2013, 2017; Takei *et al.*, 2024; Tekeli *et al.*, 2020). En este mismo sentido, se ha reportado un caso particular de co-portación de *rmtC+armA+bla*_{NDM-1} (Day *et al.*, 2013).

Respecto a otros continentes, los reportes son escasos, por ejempló, en África dos trabajos describen cepas de *K. pneumoniae* co-portadoras de *rmtC+bla*_{NDM-1}, el primero el año 2009 en cepas aisladas en Kenia (Poirel *et al.*, 2011) y, el segundo, es en cepas obtenidas de Egipto el 2014 (Soliman *et al.*, 2020). Solo las cepas de Egipto contaban con la información de tipificación mediante MLST, la cual indicó que pertenecían al ST35 y un nuevo ST, aún no definido, que

presentaba dos variantes de locus respecto a ST161. En Australia se reportaron cepas aisladas entre 2010 y 2012 co-portadoras de *rmtC*+*bla*_{NDM-1} pertenecientes al ST147 (Shoma *et al.*, 2014). Mientras que en Europa los reportes fueron realizados en España, Albania e Italia, todas las cepas portaron *rmtC*+*bla*_{NDM-1}, las cepas españolas pertenecieron al ST147 mientras que las cepas de Italia y Albania pertenecían al ST15 (Arca-Suárez *et al.*, 2022; Sacco *et al.*, 2022; Tafaj *et al.*, 2019).

Cabe destacar que, en la base de datos Ω DB, se identificó la presencia de genomas pertenecientes al ST340, correspondientes a cepas aisladas en Brasil entre los años 2011 y 2022. En estos casos, las cepas pertenecientes al ST340 también co-portaba *rmtG*+*bla*_{KPC-2} o *rmtB1*+*bla*_{KPC-2}. Además, este linaje había sido descrito en Nepal como co-portador de *rmtC*+*bla*_{NDM-1} (Takei *et al.*, 2024)

Co-portación de *rmtD* junto a carbapenemasas

La presencia de *rmtD* había sido previamente reportada en Chile; sin embargo, hasta la fecha, no se había asociado a genes codificantes de carbapenemasas. En este contexto, en la presente tesis se logró determinar, por primera vez en Chile, la co-portación de *rmtD* junto a carbapenemasas en dos cepas de *K. pneumoniae*. La primera corresponde a la cepa UCO384, aislada en 2014 y proporcionada por el Instituto de Salud Pública (ISP), la cual co-portaba *rmtD*+*bla*_{KPC}. La segunda cepa, K2070, fue aislada el año 2021 desde un centro de salud en la ciudad de Concepción, y co-portó *rmtD*+*bla*_{VIM}, constituyendo este hallazgo el primer reporte a nivel mundial de dicha asociación. Es importante destacar que ninguna de estas cepas mostró relación genética con las otras 36 cepas incluidas en esta tesis.

En relación con hallazgos similares en la región, los datos presentados en la base de datos Ω DB indican que dos genomas provenientes de Brasil co-portaban *rmtD1+bla_{KPC-2}*. Ambos correspondían al ST11 y presentaban el locus capsular KL64 y el locus O-antigénico O1/O2v1; además, una de estas cepas provenía de una muestra de suelo agrícola. Sin embargo, aunque la cepa chilena K2070, secuenciada en esta tesis, también corresponde al ST11, co-portaba la variante alélica *rmtD2+bla_{NDM-1}* y compartía los *locus* KL64 y O1/O2v1.

De manera interesante, la co-portación de *rmtD* junto a carbapenemasas ha sido escasamente reportada en la literatura internacional, especialmente en comparación con *armA* y *rmtC*. Hasta la fecha, solo se ha reportado un caso en cepas de *K. pneumoniae*, específicamente en Brasil, en el estado de São Paulo, donde se describieron cepas aisladas entre 2010 y 2011. Además, en ese mismo país, la co-portación de *rmtD* y genes codificantes de carbapenemasas ha sido descrita en otras especies bacterianas, como *Serratia marcescens* co-portadora de *rmtD2+bla_{KPC-2}* y *Pseudomonas aeruginosa* pertenecientes al ST277 co-portadora de *rmtD+bla_{SPM}*. También se han informado otras co-portaciones en cepas de *P. aeruginosa* tales como *rmtD1+bla_{KPC}+bla_{VIM-2}*, *rmtD1+bla_{KPC}*, *rmtD1+bla_{VIM-2}*, aunque en estos casos no se dispone de información de linaje, evaluado por esquema MLST (Bail *et al.*, 2021; Costa-Júnior *et al.*, 2021; de Oliveira Santos *et al.*, 2019; Galetti *et al.*, 2019). Este fenómeno también ha sido documentado en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en Pakistán (Gondal *et al.*, 2024); donde se identificaron diversas co-portaciones en distintos linajes. Entre ellas se encuentran ST277 (*rmtD+bla_{OXA-48}*), ST235 (*rmtD+bla_{NDM-1}*) y (*rmtD+bla_{NDM-1}+bla_{IMP}*) y ST170 (*rmtD+bla_{NDM-1}*). Asimismo, en el noreste de India se reportaron cepas de *Escherichia coli* pertenecientes al ST3906 que presentaron múltiples co-portaciones, tales como *rmtD+bla_{NDM}*, *rmtD+bla_{OXA-48}*, *rmtD+rmtC+bla_{OXA-48}*, y combinaciones inusuales como

armA+rmtF+rmtC+rmtD+bla_{NDM} y *armA+rmtF+rmtC+rmtD+bla_{OXA-48}*. (Wangkheimayum *et al.*, 2020).

En conjunto, la información disponible sugiere que la co-portación de *rmtD* junto a carbapenemasas constituye un fenómeno con distribución geográfica limitada, reportado principalmente en Brasil, seguido por Pakistán, el noreste de India y, de manera más reciente en Chile, según lo evidenciado en la presente tesis.

Co-portación de *rmtG* junto a carbapenemasas

Respecto a la co-portación de *rmtG* y carbapenemasas, en la muestra analizada en la presente tesis, se identificaron únicamente tres cepas (UCO340, UCO341 y UCO333), todas pertenecientes al ST1161 y aisladas en el año 2013, que co-portaban *rmtG+bla_{KPC}*. Sin embargo, el análisis de relación genética mediante ERIC-PCR agrupó a las cepas UCO340 y UCO341 en un mismo *cluster*, mientras que UCO333 se ubicó en un *cluster* diferente, junto con las cepas K2067 (también ST1161) y P88 (ST11), patrón que coincide con lo observado previamente en el caso de *rmtC*. Cabe recordar que entre los ST11 y ST1161 existen diferencias en seis de los siete loci del esquema MLST, lo que respalda su clasificación como linajes genéticamente distantes, a pesar de haber sido agrupados por ERIC-PCR. Este hallazgo refuerza la limitación ya discutida de dicha técnica, que puede conducir a agrupaciones filogenéticamente incorrectas y, por ende, a interpretaciones erróneas en estudios de vigilancia epidemiológica.

En la base de datos Ω DB, no se identificaron genomas pertenecientes al ST1161 provenientes de Latinoamérica, lo que plantea dos posibles escenarios: en primer lugar, la introducción de un linaje previamente no reportado en el país; y, en segundo lugar, la adquisición de genes codificantes de 16S-RMTasas junto a

carbapenemasas por parte de un linaje endémico aun no caracterizado. Por otra parte, fue posible analizar 18 genomas co-portadores de *rmtG* junto a carbapenemasas en la base de datos Ω DB, los cuales correspondían a genomas provenientes de Brasil, Ecuador, Colombia y Perú. En la mayoría de estos casos, *rmtG* se encontró asociado a *bla*_{KPC-2}; sin embargo, en dos genomas provenientes de Colombia se observó su asociación con *bla*_{KPC-3}, y en un único genoma proveniente de Brasil, con *bla*_{NDM-1}.

Los linajes identificados mediante el esquema de tipificación MLST evidenciaron una notable diversidad, asociada principalmente al país de origen de las cepas analizadas. En el caso de Brasil, las cepas pertenecían a los ST340, ST437, ambos pertenecientes al SL258, reconocido por su relevancia como un linaje de alto riesgo. También se identificaron cepas pertenecientes a los ST442, ST219, ST629-3LV y, de manera particular, una cepa co-portadora de *bla*_{NDM-1} perteneciente al ST129. Cabe señalar que, a excepción de los linajes pertenecientes al SL258, los otros ST mencionados se encuentran representados por un número limitado de aislamientos, por lo que su relevancia epidemiológica aún no ha sido establecida.

Las cepas provenientes de Ecuador pertenecían a dos linajes, ST5 y ST629. De manera importante, las cepas pertenecientes al ST5 presentaban el KL39 junto con O1/O2v1 y fueron aisladas el 2022. Estas cepas pueden ser clasificadas como hipervirulentas ya que portaban los genes *ybt-2* e *iuc-3* en ausencia de *clb*, además del regulador de mucoviscosidad *rmp-3*.

Por su parte, Colombia y Perú presentaron 4 y 5 cepas, respectivamente, pertenecientes al SL258, compuesto por ST258 (8 cepas) y ST11 (1 cepa). Cabe destacar que las cepas de Colombia ST258 presentaban el KL107 y O1/O2v2 al igual que dos cepas de Brasil pertenecientes al ST442 (KL107 y O4) co-portadoras de *rmtG+bla*_{KPC-2}. El KL107 ha sido propuesto como uno de los serotipos capsulares más prevalente en América continental (datos no

publicados, Maximiliano Matus-Köhler); sin embargo, esta estimación podría estar sesgada debido a la sobre representación de genomas provenientes de Brasil en Sudamérica y de USA en el continente americano. En el caso de Chile, la evidencia disponible sugiere que el serotipo capsular más prevalente sería K2. Aunque esta afirmación debe interpretarse con cautela, dado que no existen estudios genómicos con un número representativo de aislamientos de *K. pneumoniae* en el país.

Datos publicados en literatura reportan la aparición de cepas de *K. pneumoniae* co-portadoras de *rmtG*+*bla*_{KPC-2} en dos continentes, América y Europa (Bueno *et al.*, 2013; Mancini *et al.*, 2018; Ramos *et al.*, 2014). En América, las cepas fueron aisladas en Brasil en el año 2009 y 2011, encontrando el año 2009 una cepa perteneciente al linaje ST442, en este caso se determinó que río abajo de *rmtG* se encontraba la secuencia IS91, mediando potencialmente, su movilización (Ramos *et al.*, 2014). Lamentablemente, en la presente tesis no se contó con genomas chilenos portadores de *rmtG* por lo que no es posible comparar los entornos genéticos. Por otro lado, cepas aisladas el 2011 en Brasil, pertenecían al ST442 y se describieron dos linajes adicionales, dados por los ST1046 y ST340 (Bueno *et al.*, 2013).

Por otra parte, la única cepa reportada en Europa fue aislada el año 2017 y pertenecía al ST11 (Mancini *et al.*, 2018). Basado en los esquemas de tipificación MLST, ninguno de los linajes mencionados presenta una diferencia menor a seis alelos respecto al ST1161, al cual pertenecen las cepas UCO333, UCO340 y UCO341. Esto sugiere que la diseminación de *rmtG* asociada a *bla*_{KPC-2} ha ocurrido en linajes genéticamente distantes tanto en América como en Europa, particularmente en Suiza.

Linajes, locus capsulare (KL), antígeno O (OL) y marcadores de virulencia relevantes

De las seis cepas secuenciadas en esta tesis, cuatro correspondieron al ST25, perteneciente al SL25 y al CG10224, mientras que las dos restantes fueron clasificadas como ST11 y ST5830, ambas pertenecientes al SL258 y al CG340. Las cepas ST25 presentaron KL2 y O1/O2v2, además de portar el sistema de sideróforos *ybt-15* inserto en el elemento genético móvil ICEKp5. En cambio, las cepas ST11 y ST5830 presentaron KL39 y O3b.

El linaje ST25 co-portador de 16S-RMTasas y carbapenemasa no fue identificado en los genomas de la base de datos Ω DB; sin embargo, fue detectado en las cepas de Chile secuenciadas en la presente tesis. Adicionalmente, se cuenta con el estudio realizado por Veloso *et al.* (2023), en el cual se describe la cepa de *K. pneumoniae* VA833, co-portadora de *armA+bla_{KPC-2}* en un plásmido de tipo IncM2 y *bla_{NDM-1}* en uno de tipo IncC. Cabe destacar que, a diferencia de lo observado en el plásmido pAA860 descrito en esta tesis, el plásmido IncC de la cepa VA833 no presentaba el gen *rmtC*.

Por otro lado, el serotipo capsular K2, inferido a partir del locus capsular KL2, se encontró únicamente en las cepas de *K. pneumoniae* ST25. En contraste, el antígeno O1ab, determinado por la predicción del locus O1/O2v2, se identificó tanto en los genomas pertenecientes al ST25 como en un genoma proveniente de una cepa de Brasil, clasificado como ST129, SL1082 y CG1080, con un locus capsular KL108.

Los primeros reportes de cepas de *K. pneumoniae* ST25 provienen de Brasil en 2008, con una cepa aislada desde una infección urinaria en un paciente hospitalizado. Además, esta cepa fue portadora de *bla_{KPC-2}* (Seki *et al.*, 2011), lamentablemente los autores no realizaron pesquisas de genes codificantes de

16S-RMTasas. Luego de este reporte, la literatura divide a *K. pneumoniae* ST25 en dos grupos, aquellas cepas que fueron aisladas desde infecciones en humanos y en animales.

En cuanto a *K. pneumoniae* ST25 aisladas desde infecciones en animales, la literatura destaca de manera consistente una estrecha asociación entre este linaje y cuadros infecciosos en cerdos. El primer reporte de este tipo se realizó en Australia, donde entre 2014 y 2016 se aislaron cepas ST25 a partir de casos de septicemia en cerdos (Bowring *et al.*, 2017). Posteriormente, en 2018, se publicó en un estudio realizado en East Anglia, Inglaterra. En este se documentó la presencia de cepas ST25, SL25 y CG25, aisladas entre los años 2011 y 2014 a partir de casos de septicemia porcina. Estas cepas portaban los genes de virulencia *ybt-2* en el elemento ICEKp1 además de *iro* y *rmpA*, pudiendo ser consideradas como hipervirulentas (Bidewell *et al.*, 2018).

En esta misma línea, en Malaysia se reportaron cepas ST25, SL25 y CG25 aisladas de cerdos que portaban los genes *iuc* y *mcr-1* junto a genes de resistencia a β -lactámicos como *bla*_{TEM-176}, *bla*_{CTX-M-15} (Mobasserri *et al.*, 2021). Cabe destacar que, en este último trabajo, se informa que la cepa aislada en cerdos KP2013Z28 porta la betalactamasa *bla*_{OXY-1}, de manera inusual, este gen es un marcador molecular para estudiar el complejo *Klebsiella oxytoca*. Sin embargo, este gen no es detectado por las herramientas utilizadas para definir los genes de resistencia utilizados en esta tesis por lo que *bla*_{OXY-1} posiblemente fue informado de manera errónea por Mobasserri *et al.* (2021), en oposición, las herramientas anotan el gen *bla*_{LAP-2} (Kocsis *et al.*, 2013), *bla*_{LAP-2} es una betalactamasa de espectro reducido, por lo que posiblemente, el predictor de genes de resistencia utilizado por Mobasserri determinó *bla*_{OXY-1} de manera equivocada mientras realmente correspondía al gen *bla*_{LAP-2}.

Por otro lado, en Brasil se identificaron cepas ST25 provenientes de cerdos, portadoras también de *iuc* y *mcr-1* (Rosa *et al.*, 2025).

Ahora bien, el segundo grupo, correspondiente a las cepas ST25 causantes de infecciones en humanos presenta una distribución global. Fuera de América, este linaje ha sido reportado en diversos países, entre ellos China, donde se han estudiado cepas aisladas en 2010, entre 2014-2017, 2013-2018, 2019-2020 y 2021 (Du *et al.*, 2022; J. Li *et al.*, 2019; Lin *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2022). En general, estas cepas fueron clasificadas como virulentas o hipervirulentas debido a la presencia de al menos un gen de virulencia como *iro*, *iuc* y *rmpA* o *rmpA2*. Es importante destacar que la mayoría de ellas portaban *bla*_{KPC} o *bla*_{NDM}, siendo más frecuente *bla*_{NDM}.

No obstante, no todas las cepas portaban *ybt*. Incluso, la cepa estudiada por Zhao *et al.*, aislada de un neonato en 2021, perteneciente al ST25, SL25 y CG25 portaba *bla*_{NDM-1} sin ninguno de los genes de virulencia previamente mencionados. Además, es importante destacar que la cepa reportada por Xia *et al.* perteneció al ST11 y co-portó *rmtB* y *bla*_{KPC-2}, junto a *bla*_{CTX-M-65} y *bla*_{TEM-1} en un mismo plásmido de tipo IncFII/IncR denominado pCY814036-KPC-2. En ningún otro estudio mencionado previamente se pesquisó la presencia de 16S-RMTasas.

En esta línea, una dinámica genómica similar se ha observado en cepas de *K. pneumoniae* ST25 aisladas en Japón que no portadoras de genes codificantes de 16S-RMTasas (Harada *et al.*, 2018; Kakuta *et al.*, 2020). Sin embargo, de manera particular en el Norte de India se encontró una cepa co-portadora de *bla*_{NDM} y *rmtC* sin la presencia de un plásmido de tipo IncC (Kaza *et al.*, 2024), lamentablemente los genomas de este estudio no fueron publicados por lo que obtener más información de estas cepas resulta complejo. Tanto en Sudáfrica, (Hetsa *et al.*, 2025), Vietnam (Thuy *et al.*, 2021), Madagascar (Rakotondrasoa *et al.*, 2020) y Países Europeos como España (Cubero *et al.*, 2016), Suiza (Hallbäck *et al.*, 2023; Poirel, *et al.*, 2011) e Italia (Arena *et al.*, 2022), las cepas estudiadas fueron susceptibles a AMG y CBP Cabe destacar que la cepa GMR151 aislada

en Italia (código de acceso: GCF_018907255.1) pertenecía al ST25, SL3804 y CG3804, siendo la única cepa con dicho linaje registrada hasta la fecha.

En América, y posterior al primer caso reportado en Brasil (Seki *et al.*, 2011) se ha documentado de forma relevante la persistencia del ST25 portador de *bla*_{KPC-2} en Argentina desde el 2014 (Cejas *et al.*, 2019; Vargas *et al.*, 2019). También se han identificado cepas portadoras de *bla*_{KPC-2} en Ecuador (aisladas en 2012) (Prado-Vivar *et al.*, 2019; Reyes *et al.*, 2021), México (2013-2015) (Córdova-Espinoza *et al.*, 2023) y Colombia (2015) (Cienfuegos-Gallet *et al.*, 2019). Lamentablemente, ninguno de los estudios que reportan la presencia del linaje ST25 en América cuenta con información del perfil de susceptibilidad a AMG, por lo que no se puede descartar la presencia de 16S-RMTasas en dicho linaje. En Chile, el ST25 ya había sido reportado anteriormente, la publicación de Morales-León *et al.* (2020) detalla que cepas ST25, SL25 y CG10224 portadoras de BLEEs circulaban desde el año 2012 en hospitales de distintas ciudades como Los Ángeles, Valparaíso y Santiago. Ninguna de estas cepas portaba genes codificantes de 16S-RMTasas. Posteriormente, el estudio de Veloso *et al.* (2023) reportó cepas del mismo linaje, portadoras de *bla*_{KPC} y *bla*_{NDM}, aisladas en Santiago y en las regiones del Maule y Los Lagos. De manera particular, la cepa VA833 perteneciente al ST25 fue co-portadora de *armA*+*bla*_{KPC-2} junto a *bla*_{CTX-M-3} y Δ *bla*_{TEM} en un mismo plásmido de tipo IncM2

Esta diversidad de datos genómicos sugeriría que el ST25 podría poseer una notable capacidad para adquirir elementos genéticos capaces de conferir resistencia a antimicrobianos de última línea, como los carbapenémicos, así como fenotipos hipervirulentos.

En cuanto a las otras dos cepas secuenciadas en esta tesis, pertenecientes a los ST11 y ST5830, ambos linajes convergen en los SL258 y CG340. En el caso del ST11 también fue detectado en genomas de la base de datos Ω DB, siendo identificado en Argentina, Brasil, Perú y Venezuela. En cambio, el ST5830 se

encontró únicamente en Chile representado por la cepa K2070 secuenciada la cual fue secuenciada en esta tesis. Por otra parte, respecto a algunos de los grupos clonales pertenecientes al SL258, en este caso, CG10268, CG258 y CG340 encontrados, se evidenció que, cepas pertenecientes al CG10268 presentaban los locus KL36 y O4, encontrando esta combinación de manera única en Brasil, lo que sugiere que las cepas pertenecientes al CG10268 podrían ser un clon endémico y persistente en Brasil. Las cepas pertenecientes al CG258, presente en Argentina, Brasil, Colombia, Perú y Chile, presentaban un único locus KL107 y dos variantes de locus como O1/O2v2 y OL13. Finalmente, el CG340 se encontró en Argentina, Brasil, Perú, Venezuela y Chile, con mayor variabilidad, con locus K como KL105, KL15, KL39, KL62 y KL64, y locus O como O1/O2v1, O1/O2v2, O3b y O4.

Aparentemente, el ST258 y el ST11 están ampliamente diseminados en América del Sur. Sin embargo, cada país parece tener linajes endémicos con una notable capacidad de adquirir elementos genéticos y de mantenerse de manera exitosa en el tiempo. Esta situación ha contribuido a una diversidad de linajes en perjuicio del dominio de linajes internacionales (ST258 y ST11). Incluso, los linajes endémicos parecen mostrar una mayor estabilidad en sus *loci* capsulares y de antígenos O, en comparación con el linaje internacional ST11. No obstante, las cepas pertenecientes al linaje internacional ST258 presentan una baja variabilidad en dichos *loci*.

Plataformas genéticas de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas

En los genomas secuenciados en esta tesis, los genes *rmtC* y *bla_{NDM-1}*, fueron asignados al mismo plásmido putativo, denominado pAA860, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncC. Este plásmido contaba con valores óptimos de cobertura y homología respecto a otro plásmido, tal como el plásmido pCFR17394, aislado previamente desde una cepa de *C. freundii* en Argentina. El entorno genético de *bla_{NDM-1}* fue similar al descrito por Li *et al.*, 2023, donde río arriba del gen *bla_{NDM-1}* se encontraba la secuencia de inserción ISKpn14, y río abajo una estructura conservada compuesta por los genes *ble_{MBL}*, *trpF*, *dsdB*, *cutA*, *groES* y *groEL*. Sin embargo, se observa una diferencia entre ambos plásmidos, en el pCFR17394 se identificó el gen *armA* adyacente a ISKpn14 y en el pAA860 (descrito en esta tesis) se encontró *rmtC*. Esta estructura genética, asociada a ISKpn14, ha sido previamente descrita en especies del orden Enterobacterales, tales como de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Klebsiella*, *Serratia* y *Escherichia* (Ikuta *et al.*, 2022). Además, se ha encontrado en distintos grupos de incompatibilidad como IncFII e IncC y, ha sido reportada en diversas regiones del mundo, incluyendo Asia, Europa, América del Norte y Sur América (Li *et al.*, 2023).

Cabe destacar que plásmidos encontrados en China (Huang *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2019) compartían el mismo repertorio genómico, lo que sugiere que podrían ser el mismo plásmido (Huang *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2019). La principal diferencia observada entre estos plásmidos aislados en China, específicamente en la cepa de *Klebsiella aerogenes* 1564 (sin año de aislamiento) y *Salmonella enterica* LS001 (aislada en 2012) y los encontrados en los genomas trabajados en la presente tesis, radica en la ausencia de la secuencia de inserción ISKpn8

(IS3-like), secuencia que sí estuvo presente en el plásmido pCFR17394 y en los plásmidos inferidos pAA860 de las cepas de *K. pneumoniae*. Estos hallazgos respaldan la hipótesis de que dicho plásmido ha estado circulando al menos desde el año 2012, portando los genes *rmtC* y *bla_{NDM-1}*, en un entorno genético conservado a nivel global, con un rango hospedero asociado a bacterias pertenecientes al orden Enterobacterales.

En nuestro caso, los plásmidos pAA860 de las cepas 17U, 28U, 41U y P88 presentaron el elemento ISEcp1 ubicado a más de 20 CDS del gen *rmtC*. En cambio, en el plásmido pAA860, detectado en la cepa 40U, la estructura ISEcp1 se localizó río arriba de *rmtC*, lo que sugiere que el mismo plásmido puede presentar diferentes organizaciones en la región donde se localiza el gen *rmtC*. Sin embargo, esta diferencia estructural, no se asoció a un aumento de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a aminoglucósidos, resultado que ha sido mencionado en la literatura (Yang & Hu, 2022), lo cual sugiere que esta organización no se traduce necesariamente en una mayor expresión del gen *rmtC* (Yang & Hu, 2022).

Por otro lado, los genes *bla_{KPC-2}* se encontraron en la plataforma clásica Tn4401 (L. Chen *et al.*, 2014). De los dos plásmidos que portaban este gen, solo uno pudo ser tipificado basado en su grupo de incompatibilidad, identificándose como perteneciente a IncFIB, IncFII y al *replicon cluster-2183*. Es importante considerar que la herramienta MOB-suite puede presentar limitaciones al reconstruir plásmidos híbridos, por lo que no es posible confirmar con certeza que se trate de un plásmido multirreplicón sin datos provenientes de lecturas genómicas largas. No obstante, de manera independiente, los plásmidos de tipo IncFIB e IncFII han sido ampliamente reportados alrededor del mundo como portadores del gen *bla_{KPC-2}* (L. Chen *et al.*, 2014; Ding *et al.*, 2023).

Los genes de *rmtD* se han encontrado con frecuencia en asociación con genes del tipo *bla_{OXA-48-like}*, mientras que los genes *bla_{VIM}* se han descrito comúnmente

junto a *rmtB*, especialmente, en cepas de *P. aeruginosa* aisladas en Brasil y Pakistán (Costa-Júnior *et al.*, 2021; Gondal *et al.*, 2024). Sin embargo, varios otros estudios que reportan la presencia de estos genes no especifican si ambos genes se encuentran codificados en la misma cepa. En nuestro caso, la detección conjunta de *rmtD2* y *bla*_{VIM-2} en una misma cepa constituye un hallazgo importante, ya que hasta la fecha no existen registros en la literatura que documenten este fenómeno en *K. pneumoniae*.

Cabe destacar que la plataforma genética donde se identificó *rmtD2* en la cepa K2070 no pudo ser reconstruida, ya que se encontraba en un *contig* con solo cinco secuencias codificantes. Por otro lado, el gen *bla*_{VIM-2} fue hallado río abajo de una secuencia codificante de una integrasa de integrón clase I, en un plásmido definido únicamente por un tipo de replicón y no un grupo de incompatibilidad. Además, únicamente se detectó la secuencia de *IntI1*, sin identificarse la estructura completa del integrón clase 1, ya que faltaba la región 3' conservada, compuesta por los genes *qacEΔ1*, *sul1* y *orf5*, lo cual representa un evento inusual.

El gen *bla*_{VIM} ha sido descrito tradicionalmente asociado a integrones de clase 1, presente en diversos transposones, localizados tanto en el cromosoma como en plásmidos. Este gen ha sido hallado en plásmidos con distintos tipos de replicones, incluyendo *IncC*, *IncF*, *IncA/C* e *IncL/M*, y en múltiples géneros bacterianos alrededor del mundo (Biedrzycka *et al.*, 2023; Fortunato *et al.*, 2023; Heiden *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). En Chile, ya existe el antecedente de la asociación de *intI1* y *bla*_{VIM} en cepas de *P. aeruginosa* de infecciones clínicas aisladas en Temuco el año 2019 y Talca el año 2021 (Opazo-Capurro *et al.*, 2024).

Conclusiones

- En cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a aminoglucósidos y carbapenémicos se detecta la presencia de genes codificantes de 16S-RMTasas y carbapenemasas. Los genes más frecuentes son *rmtC* (n=24) y *bla_{NDM}* (n=23), siendo la combinación *rmtC+bla_{NDM-1}* la más común (n=22).
- Las cepas chilenas co-portadoras de genes de 16S-RMTasas y carbapenemasas pertenecen a diversos linajes, la mayoría con distribución geográfica limitada. Esto sugiere una adquisición local de determinantes de resistencia, seguida de una expansión clonal intrahospitalaria. En Chile, el linaje predominante es ST25, mientras que en América del Sur destacan ST258 y ST11.
- Los genes *rmtC* y *bla_{NDM-1}* potencialmente se localizan en un mismo plásmido conjugativo tipo IncC, mientras que *bla_{KPC-2}* se encuentra en plásmidos movilizables multireplicón. El gen *bla_{VIM-2}* se detecta en un plásmido del rep-cluster 435, sin poder determinar su grupo de incompatibilidad. Estos hallazgos indican que la diseminación de estos genes puede estar mediada por múltiples plásmidos, algunos con potencial de transferencia horizontal.

Con base en el análisis de los datos obtenidos en esta tesis, junto a la evidencia disponible en la literatura, se acepta parcialmente la hipótesis “En cepas de *K. pneumoniae* de origen clínico los genes codificantes de metiltransferasa de ARNr 16S y carbapenemasas se encuentran en la misma plataforma genética móvil y, a su vez, estas cepas comparten un mismo linaje”.

Bibliografía

- Aguayo Reyes, A., Mella Montecinos, S., Riedel Molina, G., Quezada Siles, M., Quezada Aguiluz, M., Rodríguez Ortiz, N., Opazo Capurro, A., Morales León, F., González Rocha, G., Bello Toledo, H., Castro Moraga, M., Altamirano Rosso, L., Hernaiz Astorga, C., Esparza Sánchez, G., Muñoz Quijada, M., & Villar Montecino, E. (2023). *Principios de terapia antimicrobiana* (2nd ed., Vol. 1).
- Al-Agamy, M. H., El-Mahdy, T. S., Radwan, H. H., & Poirel, L. (2019). Cooccurrence of NDM-1, ESBL, RmtC, AAC(6')-Ib, and QnrB in Clonally Related *Klebsiella pneumoniae* Isolates Together with Coexistence of CMY-4 and AAC(6')-Ib in *Enterobacter cloacae* Isolates from Saudi Arabia. *BioMed Research International*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/6736897>.
- Allel, K., Peters, A., Conejeros, J., Martínez, J. R. W., Spencer-Sandino, M., Riquelme-Neira, R., Rivas, L., Rojas, P., Orellana Chea, C., García, P., Araos, R., MCGovern, O., Patel, T. S., Arias, C. A., Lessa, F. C., Undurraga, E. A., & Munita, J. M. (2023). Antibiotic Consumption During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Emergence of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Lineages Among Inpatients in a Chilean Hospital: A Time-Series Study and Phylogenomic Analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 77, S20–S28. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad151>
- Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*.
- Arca-Suárez, J., Rodiño-Janeiro, B. K., Pérez, A., Guijarro-Sánchez, P., Vázquez-Ucha, J. C., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Alioto, T. S., Álvarez-Tejado, M., Gut, M., Gut, I., Oviaño, M., Beceiro, A., Bou, G., Merino, I., Cercenado, E., Gómez, R., Soler, T., Gracia-Ahufinger, I., ... Fernández, J. (2022). Emergence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing Enterobacterales in Spain studied by whole-genome sequencing. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 59(1), 106456. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106456>
- Arena, F., Di Pilato, V., Vannetti, F., Fabbri, L., Antonelli, A., Coppi, M., Pupillo, R., Macchi, C., & Rossolini, G. M. (2020). Population structure

of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute-care rehabilitation facility: identification of a new lineage of clonal group 101, associated with local hyperendemicity. *Microbial Genomics*, 6(1). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000308>

Arena, F., Menchinelli, G., Di Pilato, V., Torelli, R., Antonelli, A., Henrici De Angelis, L., Coppi, M., Sanguinetti, M., & Rossolini, G. M. (2022). Resistance and virulence features of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections: Results of a nationwide Italian surveillance study. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.983294>

Avent, M. L., Rogers, B. A., Cheng, A. C., & Paterson, D. L. (2011). Current use of aminoglycosides: Indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. In *Internal Medicine Journal* (Vol. 41, Issue 6, pp. 441–449). <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2011.02452.x>

Bahramian, A., Shariati, A., Azimi, T., Sharahi, J. Y., Bostanghadiri, N., Gachkar, L., Ghalavand, Z., Chirani, A. S., Erfanimanesh, S., & Hashemi, A. (2019). First report of New Delhi metallo- β -lactamase-6 (NDM-6) among *K. pneumoniae* ST147 strains isolated from dialysis patients in Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, 69, 142–145. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.01.030>

Bail, L., Ito, C. A. S., Arend, L. N. V. S., Pilonetto, M., Nogueira, K. da S., & Tuon, F. F. (2021). Distribution of genes encoding 16S rRNA methyltransferase in plazomicin-nonsusceptible carbapenemase-producing Enterobacterales in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 99(2), 115239. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115239>

Baquero, F., Martínez, J. L., F. Lanza, V., Rodríguez-Beltrán, J., Galán, J. C., San Millán, A., Cantón, R., & Coque, T. M. (2021). Evolutionary Pathways and Trajectories in Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00050-19>

Barría-Loaiza, C., Pincheira, A., Quezada, M., Vera, A., Valenzuela, P., Domínguez, M., Lima, C. A., Araya, I., Araya, P., Prat, S., Aguayo, C., Fernández, J., Hormazábal, J. C., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2016). Molecular typing and genetic environment of the *bla*_{KPC} gene in Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global*

- Bidewell, C. A., Williamson, S. M., Rogers, J., Tang, Y., Ellis, R. J., Petrovska, L., & AbuOun, M. (2018). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* as a cause of septicaemia in pigs in England. *PLOS ONE*, 13(2), e0191958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191958>
- Biedrzycka, M., Urbanowicz, P., Żabicka, D., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., & Izdebski, R. (2023). Country-wide expansion of a VIM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella oxytoca* ST145 lineage in Poland, 2009–2019. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42(12), 1449–1457. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04682-x>
- Bowring, B. G., Fahy, V. A., Morris, A., & Collins, A. M. (2017). An unusual culprit: *Klebsiella pneumoniae* causing septicaemia outbreaks in neonatal pigs. *Veterinary Microbiology*, 203, 267–270. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.018>
- Boyd, S. E., Holmes, A., Peck, R., Livermore, D. M., & Hope, W. (2022). OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(8). <https://doi.org/10.1128/aac.00216-22>
- Bueno, M. F. C., Francisco, G. R., O'Hara, J. A., De Oliveira Garcia, D., & Doi, Y. (2013). Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2397–2400. <https://doi.org/10.1128/AAC.02108-12>
- Bush, K. (2013). Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 84–90. <https://doi.org/10.1111/nyas.12023>
- Cejas, D., Elena, A., Guevara Nuñez, D., Sevillano Platero, P., De Paulis, A., Magariños, F., Alfonso, C., Berger, M. A., Fernández-Canigia, L., Gutkind, G., & Radice, M. (2019). Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. *Journal of Global*

- Chen, L., Mathema, B., Chavda, K. D., DeLeo, F. R., Bonomo, R. A., & Kreiswirth, B. N. (2014). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in Microbiology*, 22(12), 686–696. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.003>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Cheng, L., Cao, X.-L., Zhang, Z.-F., Ning, M., Xu, X.-J., Zhou, W., Chen, J.-H., Zhang, J., Shen, H., & Zhang, K. (2016). Clonal dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone with high prevalence of *oqxAB* and *rmtB* in a tertiary hospital in China: results from a 3-year period. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0109-x>
- Chittapragada, M., Roberts, S., & Ham, Y. W. (2009). Aminoglycosides: Molecular Insights on the Recognition of RNA and Aminoglycoside Mimics. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 3, PMC.S2381. <https://doi.org/10.4137/PMC.S2381>
- Cienfuegos-Gallet, A. V., Ocampo de Los Ríos, A. M., Sierra Viana, P., Ramirez Brinez, F., Restrepo Castro, C., Roncancio Villamil, G., del Corral Londoño, H., & Jiménez, J. N. (2019). Risk factors and survival of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a KPC endemic setting: a case-control and cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 830. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4461-x>
- Cifuentes, M., García, P., San Martín, P., Silva, F., Zúñiga, J., Reyes, S., Rojas, R., Ponce, R., Quintanilla, R., Delpiano, L., & Wolff, M. (2012). Primer caso de detección de *bla*_{KPC} en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Revista Chilena de Infectología*, 29(2), 224–228. www.sochinf.cl
- Clifton, L. A., Skoda, M. W. A., Le Brun, A. P., Ciesielski, F., Kuzmenko, I., Holt, S. A., & Lakey, J. H. (2015). Effect of Divalent Cation Removal on the Structure of Gram-Negative Bacterial Outer Membrane Models. *Langmuir*, 31(1), 404–412. <https://doi.org/10.1021/la504407v>

- Córdova-Espinoza, M. G., Giono-Cerezo, S., Sierra-Atanacio, E. G., Escamilla-Gutiérrez, A., Carrillo-Tapia, E., Carrillo-Vázquez, L. I., Mendoza-Pérez, F., Leyte-Lugo, M., González-Vázquez, R., Mayorga-Reyes, L., & González-Vázquez, R. (2023). Isolation and Identification of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clones from the Hospital Environment. *Pathogens*, 12(5), 634. <https://doi.org/10.3390/pathogens12050634>
- Costa-Júnior, S. D., da Silva, A. M. C. M., Niedja da Paz Pereira, J., da Costa Lima, J. L., Cavalcanti, I. M. F., & Maciel, M. A. V. (2021). Emergence of *rmtD1* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying *bla_{KPC}* and/or *bla_{VIM-2}* genes in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1959–1965. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00576-2>
- Cox, G., Ejim, L., Stogios, P. J., Koteva, K., Bordeleau, E., Evdokimova, E., Sieron, A. O., Savchenko, A., Serio, A. W., Krause, K. M., & Wright, G. D. (2018). Plazomicin Retains Antibiotic Activity against Most Aminoglycoside Modifying Enzymes. *ACS Infectious Diseases*, 4(6), 980–987. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00001>
- Cubero, M., Grau, I., Tubau, F., Pallarés, R., Dominguez, M. A., Liñares, J., & Ardanuy, C. (2016). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007–2013). *Clinical Microbiology and Infection*, 22(2), 154–160. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.09.025>
- Day, K. M., Ali, S., Mirza, I. A., Sidjabat, H. E., Silvey, A., Lanyon, C. V., Cummings, S. P., Abbasi, S. A., Raza, M. W., Paterson, D. L., & Perry, J. D. (2013). Prevalence and molecular characterization of Enterobacteriaceae producing NDM-1 carbapenemase at a military hospital in Pakistan and evaluation of two chromogenic media. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(2), 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.006>
- de Oliveira Santos, I. C., Pereira de Andrade, N. F., da Conceição Neto, O. C., da Costa, B. S., de Andrade Marques, E., Rocha-de-Souza, C. M., Asensi, M. D., & D’Alincourt Carvalho-Assef, A. P. (2019). Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995–2015). *Infection, Genetics and Evolution*, 73, 411–415. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.015>

- Ding, L., Shen, S., Chen, J., Tian, Z., Shi, Q., Han, R., Guo, Y., & Hu, F. (2023). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase variants: the new threat to global public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 36(4). <https://doi.org/10.1128/cmr.00008-23>
- Doi, Y., Hazen, T. H., Boitano, M., Tsai, Y.-C., Clark, T. A., Korlach, J., & Rasko, D. A. (2014). Whole-Genome Assembly of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing NDM-1 and OXA-232 Carbapenemases Using Single-Molecule, Real-Time Sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5947–5953. <https://doi.org/10.1128/AAC.03180-14>
- Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., del Carmen Conejo, M., Pascual, A., Tomás, J. M., Albertí, S., & Benedí, V. J. (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10), 3332–3335. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3332-3335.2003>
- Dong, N., Yang, X., Wai-Chi Chan, E., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*, 79, 103998. <https://doi.org/10.1016/j>
- Du, Q., Pan, F., Wang, C., Yu, F., Shi, Y., Liu, W., Li, Z., He, P., Han, D., & Zhang, H. (2022). Nosocomial dissemination of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with high-risk clones among children in Shanghai. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.984180>
- El-Gamal, M. I., Brahim, I., Hisham, N., Aladdin, R., Mohammed, H., & Bahaaeldin, A. (2017). Recent updates of carbapenem antibiotics. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 131, 185–195. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>
- Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., & Klimke, W. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, 11(1), 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>

- Fortunato, G., Vaz-Moreira, I., Gajic, I., & Manaia, C. M. (2023). Insight into phylogenomic bias of *bla*_{VIM-2} or *bla*_{NDM-1} dissemination amongst carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 61(5), 106788. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106788>
- Frasson, I., Lavezzo, E., Franchin, E., Toppo, S., Barzon, L., Cavallaro, A., Richter, S. N., & Palù, G. (2012). Antimicrobial Treatment and Containment Measures for an Extremely Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 Isolate Carrying pKPN101-IT, a Novel Fully Sequenced *bla*_{KPC-2} Plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(11), 3768–3772. <https://doi.org/10.1128/JCM.01892-12>
- Fritsche, T. R., Castanheira, M., Miller, G. H., Jones, R. N., & Armstrong, E. S. (2008). Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1843–1845. <https://doi.org/10.1128/AAC.01477-07>
- Galetti, R., Andrade, L. N., Varani, A. M., & Darini, A. L. C. (2019). SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 carries a chromosomal pack of acquired resistance genes: An example of high-risk clone associated with 'intrinsic resistome.' *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.009>
- Gálvez-Silva, M., Hormazábal, J. C., Bohle, C., San, H., Chen, J. Y., Gan, Y.-H., Chávez, F. P., & Marcoleta, A. E. (2023). Carbapenem-resistant hypervirulent ST23 *Klebsiella pneumoniae* with a highly transmissible dual-carbapenemase plasmid in Chile. *Biological Research*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3399142/v1>
- Geneva: World Health Organization. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*.
- Gondal, A. J., Choudhry, N., Niaz, A., & Yasmin, N. (2024). Molecular Analysis of Carbapenem and Aminoglycoside Resistance Genes in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Strains: A Challenge for Tertiary Care Hospitals. *Antibiotics*, 13(2), 191. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13020191>

- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUASt: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Hallbäck, E. T., Johnning, A., Myhrman, S., Studahl, M., Hentz, E., Elfvin, A., & Adlerberth, I. (2023). Outbreak of OXA-48-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Western Sweden. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 42(5), 597–605. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04584-y>
- Harada, S., Ishii, Y., Saga, T., Aoki, K., & Tateda, K. (2018). Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 isolates in Japan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 91(4), 354–359. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.010>
- Harris, H., Tao, L., Jacobs, E. B., Bergman, Y., Adebayo, A., Tekle, T., Lewis, S., Dahlquist, A., Abbey, T. C., Wenzler, E., Humphries, R., & Simner, P. J. (2023). Multicenter Evaluation of an MIC-Based Aztreonam and Ceftazidime-Avibactam Broth Disk Elution Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(5). <https://doi.org/10.1128/jcm.01647-22>
- Heiden, S. E., Sydow, K., Schaefer, S., Klempien, I., Balau, V., Bauer, P., Hübner, N.-O., & Schaufler, K. (2021). Nearly Identical Plasmids Encoding VIM-1 and Mercury Resistance in Enterobacteriaceae from North-Eastern Germany. *Microorganisms*, 9(7), 1345. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9071345>
- Hennart, M., Guglielmini, J., Bridel, S., Maiden, M. C. J., Jolley, K. A., Criscuolo, A., & Brisse, S. (2022). A Dual Barcoding Approach to Bacterial Strain Nomenclature: Genomic Taxonomy of *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Molecular Biology and Evolution*, 39(7). <https://doi.org/10.1093/molbev/msac135>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, 16(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Hetsa, B. A., Asante, J., Mbangi, J., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Ismail, A., & Essack, S. Y. (2025). Genomic analysis of virulent, multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* from

bloodstream infections, South Africa. *Microbial Pathogenesis*, 200, 107272. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107272>

Hu, L., Zhong, Q., Tu, J., Xu, Y., Qin, Z., Parsons, C., Zhang, B., Hu, X., Wang, L., Yu, F., & Pan, J. (2013). Emergence of *bla*_{NDM-1} among *Klebsiella pneumoniae* ST15 and novel ST1031 clinical isolates in China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(4), 373–376. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.01.006>

Huang, J., Deng, S., Ren, J., Tu, J., Ye, M., & Wang, M. (2017). Characterization of a *bla*_{NDM-1}-harboring plasmid from a *Salmonella enterica* clinical isolate in China. *Molecular Medicine Reports*, 16(2), 1087–1092. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6733>

Huh, K., Chung, D. R., Ha, Y. E., Ko, J.-H., Kim, S.-H., Kim, M.-J., Huh, H. J., Lee, N. Y., Cho, S. Y., Kang, C.-I., Peck, K. R., & Song, J.-H. (2020). Impact of Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative Bacteremia on Mortality: Retrospective Analysis of Nationwide Surveillance Data. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9), e487–e496. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa084>

Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Aguilar, G. R., Sharara, F., Mestrovic, T., Gray, A. P., Weaver, N. D., Wool, E. E., Han, C., Hayoon, A. G., Aali, A., Abate, S. M., Abbasi-Kangevari, M., Abbasi-Kangevari, Z., Abd-El Salam, S., Abebe, G., Abedi, A., Abhari, A. P., Abidi, H., ... Naghavi, M. (2022). Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 400(10369), 2221–2248. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)02185-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)02185-7)

Instituto de Salud Pública de Chile. (2022). *Boletín de resistencia antimicrobiana*.

Isaksson, B., Nilsson, L., Maller, R., & Sörén, L. (1988). Postantibiotic effect of aminoglycosides on Gram-negative bacteria evaluated by a new method. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(1), 23–33. <https://doi.org/10.1093/jac/22.1.23>

Islam, M. A., Huq, M., Nabi, A., Talukdar, P. K., Ahmed, D., Talukder, K. A., Cravioto, A., & Endtz, H. P. (2013). Occurrence and characterization of multidrug-resistant New Delhi metallo-β-lactamase-1-producing bacteria

isolated between 2003 and 2010 in Bangladesh. *Journal of Medical Microbiology*, 62(1), 62–68. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.048066-0>

Islam, M. A., Talukdar, P. K., Hoque, A., Huq, M., Nabi, A., Ahmed, D., Talukder, K. A., Pietroni, M. A. C., Hays, J. P., Cravioto, A., & Endtz, H. P. (2012). Emergence of multidrug-resistant NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Bangladesh. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(10), 2593–2600. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1601-2>

Jana, S., & Deb, J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 70(2), 140–150. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0>

Jiang, Y., Yu, D., Wei, Z., Shen, P., Zhou, Z., & Yu, Y. (2010). Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Multidrug Resistance Plasmid pKP048, Carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9), 3967–3969. <https://doi.org/10.1128/AAC.00137-10>

Kadri, S. S., Adjemian, J., Lai, Y. L., Spaulding, A. B., Ricotta, E., Prevots, D. R., Palmore, T. N., Rhee, C., Klompas, M., Dekker, J. P., Powers, J. H., Suffredini, A. F., Hooper, D. C., Fridkin, S., & Danner, R. L. (2018). Difficult-to-Treat Resistance in Gram-negative Bacteremia at 173 US Hospitals: Retrospective Cohort Analysis of Prevalence, Predictors, and Outcome of Resistance to All First-line Agents. *Clinical Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/cid/ciy378>

Kakuta, N., Nakano, R., Nakano, A., Suzuki, Y., Masui, T., Horiuchi, S., Kakuta, R., Tsubaki, K., Ogawa, M., & Yano, H. (2020). Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Japan: Predominance of CTX-M-15 and emergence of hypervirulent clones. *International Journal of Infectious Diseases*, 98, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.06.083>

Kawai, A., Suzuki, M., Tsukamoto, K., Minato, Y., & Doi, Y. (2021). Functional and Structural Characterization of Acquired 16S rRNA Methyltransferase NpmB1 Conferring Pan-Aminoglycoside Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. <https://journals.asm.org/journal/aac>

Kaza, P., Xavier, B. B., Mahindroo, J., Singh, N., Baker, S., Nguyen, T. N. T., Mavuduru, R. S., Mohan, B., & Taneja, N. (2024). Extensively Drug-

Resistant *Klebsiella pneumoniae* Associated with Complicated Urinary Tract Infection in Northern India. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 77(1), JJID.2023.009. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2023.009>

- Kiaei, S., Moradi, M., Hosseini Nave, H., Hashemizadeh, Z., Taati-Moghadam, M., & Kalantar-Neyestanaki, D. (2019). Emergence of co-existence of *bla*_{NDM} with *rmtC* and *qnrB* genes in clinical carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in burning center from southeast of Iran. *Folia Microbiologica*, 64(1), 55–62. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0630-3>
- Kiaei, S., Moradi, M., hosseini-nave, H., Ziasistani, M., & Kalantar-Neyestanaki, D. (2018). Endemic dissemination of different sequence types of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains harboring *bla*_{NDM} and 16S rRNA methylase genes in Kerman hospitals, Iran, from 2015 to 2017. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 45–54. <https://doi.org/10.2147/IDR.S186994>
- Kocsis, B., Kocsis, E., Fontana, R., Cornaglia, G., & Mazzariol, A. (2013). Identification of *bla* LAP-2 and *qnrS1* genes in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST147 clone. *Journal of Medical Microbiology*, 62(2), 269–273. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.050542-0>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Kučerka, N., Papp-Szabo, E., Nieh, M.-P., Harroun, T. A., Schooling, S. R., Pencer, J., Nicholson, E. A., Beveridge, T. J., & Katsaras, J. (2008). Effect of Cations on the Structure of Bilayers Formed by Lipopolysaccharides Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(27), 8057–8062. <https://doi.org/10.1021/jp8027963>
- Lam, M. M. C., Wick, R. R., Watts, S. C., Cerdeira, L. T., Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2021). A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24448-3>
- Lang, M., Carvalho, A., Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2023). Aminoglycoside uptake, stress, and potentiation in Gram-negative bacteria: new

therapies with old molecules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 87(4). <https://doi.org/10.1128/mubr.00036-22>

- Li, J., Huang, Z.-Y., Yu, T., Tao, X.-Y., Hu, Y.-M., Wang, H.-C., & Zou, M.-X. (2019). Isolation and characterization of a sequence type 25 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from the mid-south region of China. *BMC Microbiology*, 19(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1593-5>
- Li, Y., Yang, Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Wang, S., & Cai, C. (2023). Molecular characterization of *bla*_{NDM}-harboring plasmids reveal its rapid adaptation and evolution in the Enterobacteriaceae. *One Health Advances*, 1(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s44280-023-00033-9>
- Lin, J., Huang, Y., Qian, L., Pan, X., & Song, Y. (2022). Liver Abscess Combined with Endogenous Endophthalmitis Caused by Genotype ST25 Serotype K2 Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: A Case Report. *Infection and Drug Resistance*, Volume 15, 4557–4561. <https://doi.org/10.2147/IDR.S376443>
- Liu, S., Xu, H., Guo, X., Li, S., Wang, Q., Li, Y., Liu, R., & Gou, J. (2021). Emergence and Genetic Characterization of Plasmid-Encoded VIM-2-Producing *Pseudomonas stutzeri* with Novel Integron In1998 Isolated from Cerebrospinal Fluid. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 3415–3424. <https://doi.org/10.2147/IDR.S320294>
- Liu, Y., Wan, L. G., Deng, Q., Cao, X. W., Yu, Y., & Xu, Q. F. (2015). First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiology and Infection*, 143(2), 376–384. <https://doi.org/10.1017/S0950268814000995>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>

- Mancini, S., Poirel, L., Corthesy, M., Greub, G., & Nordmann, P. (2018). *Klebsiella pneumoniae* co-producing KPC and RmtG, finally targeting Switzerland. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(2), 151–152. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.10.019>
- Martínez, J. L., & Baquero, F. (2002). Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 647–679. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.647-679.2002>
- Mayers, D. L., Sobel, J. D., Ouellette, M., Kaye, K. S., & Marchaim, D. (Eds.). (2017). *Antimicrobial Drug Resistance*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-46718-4>
- Mc Gann, P. T., Lebreton, F., Jones, B. T., Dao, H. D., Martin, M. J., Nelson, M. J., Luo, T., Wyatt, A. C., Smedberg, J. R., Kettlewell, J. M., Cohee, B. M., Hawley-Molloy, J. S., & Bennett, J. W. (2023). Six Extensively Drug-Resistant Bacteria in an Injured Soldier, Ukraine. *Emerging Infectious Diseases*, 29(8). <https://doi.org/10.3201/eid2908.230567>
- McLawn, R. W. (2012). Guidelines for the Monitoring of Vancomycin, Aminoglycosides and Certain Antibiotics. In *Therapeutic Drug Monitoring* (pp. 197–218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385467-4.00010-5>
- Mella M., S., Sepúlveda A., M., González R., G., Bello T., H., Domínguez Y., M., Zemelman Z., R., & Ramírez G., C. (2004). Aminoglucósidos-aminociclitoles: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. *Revista Chilena de Infectología*, 21(4). <https://doi.org/10.4067/S0716-10182004000400007>
- Mezzatesta, M. L., Gona, F., Caio, C., Adembri, C., Dell'utri, P., Santagati, M., & Stefani, S. (2013). Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(8), 1932–1934. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt116>
- Mobasser, G., Thong, K. L., & Teh, C. S. J. (2021). Genomic analysis revealing the resistance mechanisms of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from pig and humans in Malaysia. *International Microbiology*, 24(2), 243–250. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00161-5>

- Morales-León, F., Matus-Köhler, M., Araya-Vega, P., Aguilera, F., Torres, I., Vera, R., Ibarra, C., Venegas, S., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., & Opazo-Capurro, A. (2023). Molecular Characterization of the Convergent Carbapenem-Resistant and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain K1-ST23, Collected in Chile during the COVID-19 Pandemic. *Microbiology Spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00540-23>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung, E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- O'Neill J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Report Government of The United Kingdom*. <https://apo.org.au/node/63983>
- Opazo-Capurro, A., Aguilar-Vera, O. A., González-Muñoz, P., Amsteins-Romero, L., Quiroga, M., Encina, A., Herrera-Chávez, N., Quezada-Aguiluz, M., Aguayo-Reyes, A., Morales-León, F., Illesca, V., Vera, R., Salgado, F., Suazo, P., Fuenzalida, L. M., Bello-Toledo, H., Castillo-Ramírez, S., & González-Rocha, G. (2024). Genomic and Phylogenomic Characterization of Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* 'High-risk' Clone O4/ExoS+/ST654 Circulating in Chilean Hospitals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 38, 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.05.015>
- Oteo, J., Domingo-García, D., Fernández-Romero, S., Saez, D., Guiu, A., Cuevas, O., Lopez-Brea, M., & Campos, J. (2012). Abdominal abscess due to NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Journal of*

- Paczosa, M. K., & Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629–661. <https://doi.org/10.1128/mubr.00078-15>
- Pagkalis, S., Mantadakis, E., Mavros, M. N., Ammari, C., & Falagas, M. E. (2011). *Pharmacological Considerations for the Proper Clinical Use of Aminoglycosides*. <https://doi.org/https://doi.org/10.2165/11597020-000000000-00000>
- Pajand, O., Darabi, N., Arab, M., Ghorbani, R., Bameri, Z., Ebrahimi, A., & Hojabri, Z. (2020). The emergence of the hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) strains among circulating clonal complex 147 (CC147) harbouring bla_{NDM}/OXA-48 carbapenemases in a tertiary care center of Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00349-z>
- Papa-Ezdra, R., Cordeiro, N. F., Ferreira, F., García-Fulgueiras, V., Araújo, L., Mota, M. I., Outeda, M., Seija, V., Vignoli, R., & Bado, I. (2024). First Detection of High-Level Aminoglycoside-Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Isolates Due to 16S rRNA Methyltransferases with and Without bla_{NDM} in Uruguay. *Antibiotics*, 13(11), 1029. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13111029>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, 25(7), 1043–1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Peirano, G., Chen, L., Kreiswirth, B. N., & Pitout, J. D. D. (2020). Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(10). <https://doi.org/10.1128/AAC.01148-20>
- Pitchforth, E., Gemma-Clare, A., Smith, E., Taylor, J., Rayner, T., Lichten, C., d'Angelo, C., Gradmann, C., Berridge, V., Bertscher, A., & Allel, K. (2023). What and how can we learn from complex global problems for antimicrobial resistance policy? A comparative study combining historical and foresight approaches. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 35, 110–121. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.08.019>

- Poirel, L., Al Maskari, Z., Al Rashdi, F., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(2), 304–306. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq428>
- Poirel, L., Goutines, J., Aires-de-Sousa, M., & Nordmann, P. (2018). High Rate of Association of 16S rRNA Methylases and Carbapenemases in Enterobacteriaceae Recovered from Hospitalized Children in Angola. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.00021-18>
- Poirel, L., Labarca, J., Bello, H., Rioseco, M. L., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2014). Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing and colistin-Resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate in Chile. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 58, Issue 1, pp. 618–619). <https://doi.org/10.1128/AAC.02059-13>
- Poirel, L., Revathi, G., Bernabeu, S., & Nordmann, P. (2011). Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 934–936. <https://doi.org/10.1128/AAC.01247-10>
- Poirel, L., Schrenzel, J., Cherkaoui, A., Bernabeu, S., Renzi, G., & Nordmann, P. (2011). Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(8), 1730–1733. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr174>
- Poulou, A., Voulgari, E., Vrioni, G., Koumaki, V., Xidopoulos, G., Chatzipantazi, V., Markou, F., & Tsakris, A. (2013). Outbreak Caused by an Ertapenem-Resistant, CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 101 Clone Carrying an OmpK36 Porin Variant. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(10), 3176–3182. <https://doi.org/10.1128/JCM.01244-13>
- Prado-Vivar, M. B., Ortiz, L., Reyes, J., Villacis, E., Fornasini, M., Baldeon, M. E., & Cardenas, P. A. (2019). Molecular typing of a large nosocomial outbreak of KPC-producing bacteria in the biggest tertiary-care hospital of Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.014>

- Quesille-Villalobos, A. M., Solar, C., Martínez, J. R. W., Rivas, L., Quiroz, V., González, A. M., Riquelme-Neira, R., Ugalde, J. A., Peters, A., Ortega-Recalde, O., Araos, R., García, P., Lebreton, F., Munita, J. M., & Diaz, L. (2025). Multispecies emergence of dual *bla*_{KPC/NDM} carbapenemase-producing Enterobacterales recovered from invasive infections in Chile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 69(1). <https://doi.org/10.1128/aac.01205-24>
- Quiles, M. G., Rocchetti, T. T., Fehlberg, L. C., Kusano, E. J. U., Chebabo, A., Pereira, R. M. G., Gales, A. C., & Pignatari, A. C. C. (2015). Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(2), 174–177. <https://doi.org/10.1590/1414-431x20144154>
- Rahman, M., Shukla, S. K., Prasad, K. N., Ovejero, C. M., Pati, B. K., Tripathi, A., Singh, A., Srivastava, A. K., & Gonzalez-Zorn, B. (2014). Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo-β-lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(1), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.03.003>
- Rakotondrasoa, A., Passet, V., Herindrainy, P., Garin, B., Kermorvant-Duchemin, E., Delarocque-Astagneau, E., Guillemot, D., Huynh, B.-T., Brisse, S., & Collard, J.-M. (2020). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolates from a mother–child cohort in Madagascar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(7), 1736–1746. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa107>
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resistance Updates*, 13(6), 151–171. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>
- Ramos, P. I. P., Picão, R. C., de Almeida, L. G. P., Lima, N. C. B., Girardello, R., Vivan, A. C. P., Xavier, D. E., Barcellos, F. G., Pelisson, M., Vespero, E. C., Médigue, C., de Vasconcelos, A. T. R., Gales, A. C., & Nicolás, M. F. (2014). Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics*, 15(1), 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-54>
- Reyes, J., Cárdenas, P., Tamayo, R., Villavicencio, F., Aguilar, A., Melano, R. G., & Trueba, G. (2021). Characterization of *bla*_{KPC-2}-Harboring

Klebsiella pneumoniae Isolates and Mobile Genetic Elements from Outbreaks in a Hospital in Ecuador. *Microbial Drug Resistance*, 27(6), 752–759. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0433>

- Robertson, J., & Nash, J. H. E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics*. <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.6177188>
- Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millán, Á. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 347–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00497-1>
- Rosa, J. N., da Silva, G. C., Fontes, P. P., Guidini, M. M., Oliveira, R. P., & Bazzolli, D. M. S. (2025). *Klebsiella* spp. in healthy pigs: reservoirs of antimicrobial resistance and potential pathogenic threats. *Journal of Applied Microbiology*, 136(2). <https://doi.org/10.1093/jambio/lxaf029>
- Russo, T. A., Alvarado, C. L., Davies, C. J., Drayer, Z. J., Carlino-MacDonald, U., Hutson, A., Luo, T. L., Martin, M. J., Corey, B. W., Moser, K. A., Rasheed, J. K., Halpin, A. L., McGann, P. T., & Lebreton, F. (2024). Differentiation of hypervirulent and classical *Klebsiella pneumoniae* with acquired drug resistance. *MBio*, 15(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.02867-23>
- Russo, T. A., Carlino-MacDonald, U., Drayer, Z. J., Davies, C. J., Alvarado, C. L., Hutson, A., Luo, T. L., Martin, M. J., McGann, P. T., & Lebreton, F. (2024). Deciphering the relative importance of genetic elements in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to guide countermeasure development. *EBioMedicine*, 107, 105302. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.105302>
- Russo, T. A., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *American Society For Microbiology*. <https://journals.asm.org/journal/cmrr>
- Sacco, F., Raponi, G., Oliva, A., Bibbolino, G., Mauro, V., Di Lella, F. M., Volpicelli, L., Antonelli, G., Venditti, M., Carattoli, A., & Arcari, G. (2022). An outbreak sustained by ST15 *Klebsiella pneumoniae* carrying 16S rRNA methyltransferases and *bla*_{NDM}: evaluation of the global dissemination of these resistance determinants. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 60(2), 106615. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106615>

- Salloum, T., Arabaghian, H., Alousi, S., Abboud, E., & Tokajian, S. (2017). Genome sequencing and comparative analysis of an NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 isolated from a refugee patient. *Pathogens and Global Health*, 111(4), 166–175. <https://doi.org/10.1080/20477724.2017.1314069>
- Seemann, T. (2017). *Shovill: Faster SPAdes assembly of Illumina reads*.
- Seiffert, S. N., Marschall, J., Perreten, V., Carattoli, A., Furrer, H., & Endimiani, A. (2014). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(3), 260–262. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.05.008>
- Seki, L. M., Pereira, P. S., de Souza, M. da P. A. H., Conceição, M. de S., Marques, E. A., Porto, C. O., Colnago, E. M. L., Alves, C. de F. M., Gomes, D., Assef, A. P. D. A. C., Samuelsen, Ø., & Asensi, M. D. (2011). Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70(2), 274–277. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.006>
- Sellera, F. P., Fuentes-Castillo, D., & Furlan, J. P. R. (2023). One Health Spread of 16S Ribosomal RNA Methyltransferase-Harboring Gram-Negative Bacterial Genomes: An Overview of the Americas. *Pathogens*, 12(9), 1164. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091164>
- Shankar, C., Kumar, S., Venkatesan, M., & Veeraraghavan, B. (2019). Emergence of ST147 *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{NDM-7} on IncA/C2 with *ompK35* and *ompK36* mutations in India. *Journal of Infection and Public Health*, 12(5), 741–743. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.03.023>
- Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., & Miller, G. H. (1993). Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiological Reviews*, 57(1), 138–163. <https://doi.org/10.1128/mr.57.1.138-163.1993>
- Shen, X., Liu, L., Yu, J., Ai, W., Cao, X., Zhan, Q., Guo, Y., Wang, L., & Yu, F. (2020). High Prevalence of 16S rRNA Methyltransferase Genes in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Associated with Bloodstream Infections in 11 Chinese Teaching

Hospitals. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 2189–2197.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S254479>

Shen, X., Liu, L., Yu, J., Cao, X., Zhan, Q., Guo, Y., Wang, L., & Yu, F. (2019). Coexistence of *bla*_{NDM-1} and *rmtC* on a Transferrable Plasmid of a Novel ST192 *Klebsiella aerogenes* Clinical Isolate. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 3883–3891.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S228130>

Shoma, S., Kamruzzaman, M., Ginn, A. N., Iredell, J. R., & Partridge, S. R. (2014). Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying *bla*_{NDM-1}. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(1), 93–97.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.001>

Siguier, P., Perochon, J., Lestrade, L., Mahillon, J., & Chandler, M. (2006). ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkj014>

Soliman, A. M., Zarad, H. O., Nariya, H., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2020). Genetic analysis of carbapenemase-producing Gram-negative bacteria isolated from a university teaching hospital in Egypt. *Infection, Genetics and Evolution*, 77, 104065.
<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104065>

Souvorov, A., Agarwala, R., & Lipman, D. J. (2018). SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biology*, 19(1), 153.
<https://doi.org/10.1186/s13059-018-1540-z>

Tada, T., Miyoshi-Akiyama, T., Dahal, R. K., Mishra, S. K., Ohara, H., Shimada, K., Kirikae, T., & Pokhrel, B. M. (2013). Dissemination of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (NDM-1 and OXA-72) and 16S rRNA methylases (ArmA, RmtC and RmtF) in Nepal. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 42(4), 372–374.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2013.06.014>

Tada, T., Tsuchiya, M., Shimada, K., Nga, T. T. T., Thu, L. T. A., Phu, T. T., Ohmagari, N., & Kirikae, T. (2017). Dissemination of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of Carbapenemases (KPC-2, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA Methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. *BMC*

Infectious Diseases, 17(1), 467. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2570-y>

- Tafaj, S., Gona, F., Kapisyzi, P., Cani, A., Hatibi, A., Bino, S., Fico, A., Koraqi, A., Kasmi, G., & Cirillo, D. (2019). Isolation of the first New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type ST15 from a digestive carrier in Albania, May 2018. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 17, 142–144. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.002>
- Taggar, G., Attiq Rehman, M., Boerlin, P., & Diarra, M. (2020). Molecular Epidemiology of Carbapenemases in Enterobacteriales from Humans, Animals, Food and the Environment. *Antibiotics*, 9(10), 693. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100693>
- Takei, S., Tabe, Y., Miida, T., Hishinuma, T., Khasawneh, A., Kirikae, T., Sherchand, J. B., & Tada, T. (2024). Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing NDM- and OXA-type carbapenemase in Nepal. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 37, 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.04.008>
- Tamma, P. D., Cosgrove, S. E., & Maragakis, L. L. (2012). Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 25, Issue 3, pp. 450–470). <https://doi.org/10.1128/CMR.05041-11>
- Tan, Y. H., Arros, P., Berríos-Pastén, C., Wijaya, I., Chu, W. H. W., Chen, Y., Cheam, G., Mohamed Naim, A. N., Marcoleta, A. E., Ravikrishnan, A., Nagarajan, N., Lagos, R., & Gan, Y.-H. (2024). Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* employs genomic island encoded toxins against bacterial competitors in the gut. *The ISME Journal*, 18(1). <https://doi.org/10.1093/ismejo/wrae054>
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., & Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6614–6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Tekeli, A., Dolapci, İ., Evren, E., Oguzman, E., & Karahan, Z. C. (2020). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. *Microbial Drug Resistance*, 26(2), 118–125. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0086>

- Thuy, D. B., Campbell, J., Thuy, C. T., Hoang, N. V. M., Voong Vinh, P., Nguyen, T. N. T., Nguyen Ngoc Minh, C., Pham, D. T., Rabaa, M. A., Lan, N. P. H., Hao, N. Van, Thwaites, G. E., Thwaites, C. L., Baker, S., Chau, N. V. V., & Chung The, H. (2021). Colonization with *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* causes infections in a Vietnamese intensive care unit. *Microbial Genomics*, 7(2). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000514>
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. In *Journal of Molecular Biology* (Vol. 431, Issue 18, pp. 3472–3500). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002>
- Toth, M., Frase, H., Antunes, N. T., & Vakulenko, S. B. (2013). Novel Aminoglycoside 2"-Phosphotransferase Identified in a Gram-Negative Pathogen. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(1), 452–457. <https://doi.org/10.1128/AAC.02049-12>
- Vargas, J. M., Moreno Mochi, M. P., Nuñez, J. M., Cáceres, M., Mochi, S., del Campo Moreno, R., & Jure, M. A. (2019). Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon*, 5(6), e01829. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>
- Veloso, M., Arros, P., Acosta, J., Rojas, R., Berríos-Pastén, C., Varas, M., Araya, P., Hormazábal, J. C., Allende, M. L., Chávez, F. P., Lagos, R., & Marcoleta, A. E. (2023). Antimicrobial resistance, pathogenic potential, and genomic features of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in Chile: high-risk ST25 clones and novel mobile elements. *Microbiology Spectrum*, 11(5). <https://doi.org/10.1128/spectrum.00399-23>
- Vila, J., Marcos, M. A., & Jimenez de Anta, M. T. (1996). A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *Journal of Medical Microbiology*, 44(6), 482–489. <https://doi.org/10.1099/00222615-44-6-482>
- Wachino, J. I., Doi, Y., & Arakawa, Y. (2020). Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. In *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol.

34, Issue 4, pp. 887–902). W.B. Saunders.
<https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.06.002>

Wang, L. H., Wei, D.-D., Wan, L.-G., Yu, Y., Deng, Q., & Liu, Y. (2016). Diversity of the Genetic Environment of the *bla*_{KPC-2} Gene Among *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Chinese Hospital. *Microbial Drug Resistance*, 22(1), 15–21. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0281>

Wangkheimayum, J., Bhattacharjee, M., Das, B. J., Singha, K. M., Chanda, D. D., & Bhattacharjee, A. (2020). Expansion of acquired 16S rRNA methyltransferases along with CTX-M-15, NDM and OXA-48 within three sequence types of *Escherichia coli* from northeast India. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 544. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05264-4>

Webster, C. M., & Shepherd, M. (2023). A mini-review: environmental and metabolic factors affecting aminoglycoside efficacy. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 7. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03445-8>

Wise, M. G., Karlowsky, J. A., Mohamed, N., Hermsen, E. D., Kamat, S., Townsend, A., Brink, A., Soriano, A., Paterson, D. L., Moore, L. S. P., & Sahm, D. F. (2024). Global trends in carbapenem- and difficult-to-treat-resistance among World Health Organization priority bacterial pathogens: ATLAS surveillance program 2018–2022. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 37, 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.03.020>

Wood, D. E., Lu, J., & Langmead, B. (2019). Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biology*, 20(1), 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>

Wozniak, A., Figueroa, C., Moya-Flores, F., Guggiana, P., Castillo, C., Rivas, L., Munita, J. M., & García, P. C. (2021). A multispecies outbreak of carbapenem-resistant bacteria harboring the *bla*_{KPC} gene in a non-classical transposon element. *BMC Microbiology*, 21(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02169-3>

Wu, W., Feng, Y., Tang, G., Qiao, F., McNally, A., & Zong, Z. (2019). NDM Metallo-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. *Clinical Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/CMR>

- Wyres, K., & Holt, K. (2022). Regional differences in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet Infectious Diseases*, 22(3), 309–310. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00425-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00425-4)
- Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18(6), 344–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
- Xia, P., Yi, M., Yuan, Y., Huang, J., Yang, B., Liao, J., Dang, Z., Luo, S., & Xia, Y. (2022). Coexistence of Multidrug Resistance and Virulence in a Single Conjugative Plasmid from a Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Isolate of Sequence Type 25. *MSphere*, 7(6). <https://doi.org/10.1128/msphere.00477-22>
- Yang, W., & Hu, F. (2022). Research Updates of Plasmid-Mediated Aminoglycoside Resistance 16S rRNA Methyltransferase. In *Antibiotics* (Vol. 11, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070906>
- Yao, B., Xiao, X., Wang, F., Zhou, L., Zhang, X., & Zhang, J. (2015). Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China. *International Journal of Infectious Diseases*, 37, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.06.023>
- Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H., & Arakawa, Y. (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Lancet*, 362(9399), 1888–1893. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14959-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14959-8)
- Zacharczuk, K., Piekarska, K., Szych, J., Zawidzka, E., Sulikowska, A., Wardak, S., Jagielski, M., & Gierczyński, R. (2011). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(1), 443–446. <https://doi.org/10.1128/AAC.00386-10>
- Zhang, X., Li, F., Cui, S., Mao, L., Li, X., Awan, F., Lv, W., & Zeng, Z. (2020). Prevalence and Distribution Characteristics of *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} Genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 2901–2910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S253631>
- Zhao, J., Zheng, B., Xu, H., Li, J., Sun, T., Jiang, X., & Liu, W. (2022). Emergence of a NDM-1-producing ST25 *Klebsiella pneumoniae* strain

causing neonatal sepsis in China. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.980191>

Zhou, T., Zhang, Y., Li, M., Yu, X., Sun, Y., & Xu, J. (2015). An outbreak of infections caused by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains during a short period of time in a Chinese teaching hospital: epidemiology study and molecular characteristics. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82(3), 240–244. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.03.017>

Zhou, Y., Ai, W., Guo, Y., Wu, X., Wang, B., Xu, Y., Rao, L., Zhao, H., Wang, X., & Yu, F. (2022). Co-Occurrence of Rare ArmA-, RmtB-, and KPC-2–Encoding Multidrug-Resistant Plasmids and Hypervirulence iuc Operon in ST11-KL47 *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology Spectrum*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02371-21>