



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**MAGÍSTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**RELACIÓN GENÉTICA ENTRE CEPAS PRODUCTORAS Y NO  
PRODUCTORAS DE CARBAPENEMASAS DEL COMPLEJO  
*Enterobacter cloacae*, AISLADAS EN HOSPITALES DE CHILE**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE MAGÍSTER**

POR: Víctor Herrera Chávez

PROFESOR GUÍA: Dr. Felipe Morales León

PROFESOR CO-GUÍA: Dr. Gerardo González Rocha

Concepción, Chile 2025

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

## TABLA DE CONTENIDO

1. Índice de tablas.....	5
2. Índice de Figuras.....	7
3. Resumen.....	8
4. Abstract.....	9
5. Marco teórico.....	11
6. Metodología.....	22
6.1. Cepas bacterianas.....	22
6.2. Recuperación de las cepas bacterianas.....	22
6.3. Estudio de susceptibilidad a antibióticos.....	22
6.4. Detección de carbapenemasas.....	24
6.5. Extracción de ADN e identificación de carbapenemasas.....	24
6.6. Agrupación de las cepas.....	26
6.7. Estudio de la relación genética entre las cepas.....	27
6.8. Selección de cepas para secuenciación del genoma completo.....	28
6.9. Secuenciación de cepas.....	28
6.10. Análisis comparativo de la secuencia de las cepas.....	29
6.11. Ensayo de conjugación.....	30
6.12. Sinergia ceftazdima/avibactam + aztreonam.....	31
7. Resultados y discusión.....	33

7.1. Análisis de la viabilidad de las cepas.....	33
7.2. Estudio de susceptibilidad.....	35
7.3. Detección e identificación de carbapenemasas.....	37
7.4. Clasificación de cepas.....	40
7.5. Análisis de la relación genética entre cepas del complejo <i>Enterobacter cloacae</i> .....	40
7.6. Análisis de los resultados de secuenciación.....	45
7.7. Detección de plásmidos.....	58
7.8. Análisis de los resultados de conjugación.....	61
7.9. Resultados del estudio de susceptibilidad extendido.....	66
7.10. Sinergia ceftazidima/avibactam + aztreonam.....	68
8. Conclusión.....	70
9. Bibliografía.....	72
10. Anexos.....	91

## 1. ÍNDICE DE TABLAS

1. Tabla 1. Secuencias y tamaño de amplicón para la detección de carbapenemasa mediante PCR múltiplex.....	25
2. Tabla 2. Perfil térmico para el PCR de identificación de carbapenemasas.....	25
3. Tabla 3. Partidores utilizados para rep-PCR .....	27
4. Tabla 4. Partidores utilizados para ERIC-PCR .....	30
5. Tabla 5. Perfil térmico ERIC-PCR .....	31
6. Tabla 6. Año y procedencia de las cepas.....	33
7. Tabla 7. Portación de genes que codifican carbapenemasas y resultados de estudio de susceptibilidad .....	39
8. Tabla 8. Información de cada cepa que componen cada clúster.....	43
9. Tabla Perfil de resistencia fenotípico de las cepas secuenciadas .....	45
10. Tabla 10. Secuenciotipos detectados mediante MLST y otros datos epidemiológicos.....	46
11. Tabla 11. Genes de resistencia a $\beta$ -lactámicos en cepas del ECC.....	49
12. Tabla 12. Genes de resistencia a quinolonas en cepas del ECC .....	52
13. Tabla 13. Genes de resistencia a aminoglucósidos, trimetoprim y colistina en cepas del ECC .....	53

14. Tabla 14. Genes de resistencia a fenicoles, fosfomicina, sulfonamidas, tetraciclinas y macrólidos en cepas de ECC.....	55
15. Tabla 15. Identificación de grupos de incompatibilidad de plásmidos..	58
16. Tabla 16. Resultados del estudio de susceptibilidad a cepas de la conjugación.....	62
17. Tabla 17. Estudio de susceptibilidad extendido .....	66

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS

1. Figura 1. Gráfico de barras del estudio de susceptibilidad a antibióticos.....	35
2. Figura 2. Resultados Blue-Carba.....	38
3. Figura 3. Resultado rep-PCR .....	41
4. Figura 4. Dendograma de relación genética.....	43
5. Figura 5. Comparación de los entornos genéticos entre <i>contigs</i> que contienen el gen <i>bla<sub>N</sub>DM</i> de cepas de ECC y el plásmido pNDM1_020049.....	61
6. Figura 6. Esquematización del proceso de conjugación.....	62
7. Figura 7. Resultado del PCR para la detección del gen <i>bla<sub>N</sub>DM</i> en cepas de la conjugación.....	63
8. Figura 8. Resultado de ERIC-PCR para las cepas de la conjugación .....	64
9. Figura 9. Resultado de la sinergia ceftazidima/avibactam + aztreonam .....	69

### 3. RESUMEN

El complejo *Enterobacter cloacae* (ECC) posee genes de resistencia intrínsecos y puede adquirir determinantes que confieren resistencia a antibióticos de última línea, como los carbapenémicos. Esto ha favorecido su prevalencia en países como Estados Unidos y China fomentando su incorporación como patógeno de prioridad crítica por la OMS. En Chile, no existen datos actualizados ni estudios exhaustivos sobre ECC productor de carbapenemasas. Este estudio analizó la relación genética entre cepas productoras y no productoras de carbapenemasas en aislados chilenos obtenidos entre 1998 y 2023.

Se estudiaron 187 cepas mediante antibiograma, Blue-Carba y PCR, identificándose 15 cepas portadoras de genes de carbapenemasa. Mediante rep-PCR y herramientas bioinformáticas, se compararon genéticamente con cepas no productoras de carbapenemasa. Se concluyó que estas cepas están genéticamente relacionadas, que el gen de carbapenemasa pudo ser adquirido mediante conjugación y, además, se determinó que la sinergia entre ceftazidima/avibactam y aztreonam puede ser una alternativa para tratar infecciones por estos microorganismos.

En resumen, estos resultados constituyen el primer análisis integral de ECC productores de carbapenemasa en Chile, aportando datos esenciales para la vigilancia epidemiológica y terapéutica.

#### 4. ABSTRACT

The *Enterobacter cloacae* complex (ECC) possesses intrinsic resistance genes and can acquire determinants that confer resistance to last-line antibiotics, such as carbapenems. This has contributed to its high prevalence in countries like the United States and China and has led to its classification as a critical-priority pathogen by the World Health Organization. In Chile, there are no updated data or comprehensive studies on carbapenemase-producing ECC. This study analyzes the genetic relationship between carbapenemase-producing and non-producing ECC strains isolated in Chile between 1998 and 2023.

A total of 187 ECC isolates were analyzed using antibiotic susceptibility testing, Blue-Carba, and PCR, identifying 15 strains harboring carbapenemase genes. These were genetically compared with non-carbapenemase-producing strains using rep-PCR, whole-genome sequencing, and bioinformatics tools. The results revealed a genetic relationship between carbapenem-producing and non-producing isolates, suggesting that the carbapenemase gene was acquired through conjugation. Furthermore, synergy between ceftazidime/avibactam and aztreonam was observed, indicating a potential therapeutic strategy against infections caused by these multidrug-resistant pathogens.

In summary, these results constitute the first comprehensive analysis of carbapenemase-producing ECCs in Chile, providing essential data for epidemiological and therapeutic surveillance.

## 5. MARCO TEÓRICO

La resistencia a antimicrobianos es una de las temáticas más relevantes y estudiadas en el área de la Microbiología. Según la Organización mundial de la salud (OMS):

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se produce cuando bacterias, virus, hongos y parásitos dejan de responder a los medicamentos antimicrobianos. Como resultado de esta resistencia, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces y las infecciones se vuelven difíciles o imposibles de tratar, lo que aumenta el riesgo de propagación de enfermedades, enfermedades graves, discapacidad y muerte (OMS, 2023).

La resistencia a antimicrobianos puede ser intrínseca o adquirida. La resistencia intrínseca es un fenómeno natural, independiente de la exposición a un antibiótico y universalmente encontrado en el genoma, generalmente el cromosoma, de un grupo o especie bacteriana. La resistencia adquirida se da principalmente por mutaciones en los genes del microorganismo o por adquisición de ADN exógeno (transferencia horizontal de genes) con genes de resistencia y está relacionada con la presión selectiva causada por el uso excesivo de antibióticos (Morrison et al., 2020).

La transferencia horizontal de genes permite que las bacterias puedan adquirir material genético fuera de su linaje clonal, lo que juega un rol importante en la adquisición, acumulación y diseminación de genes de resistencia a antibióticos (Liu et al., 2022b). Existen 3 principales mecanismos de transferencia horizontal de genes, la conjugación, transformación natural y

transducción. Sin embargo, en la actualidad, se considera que la secreción de vesículas de membrana bacteriana sería un cuarto mecanismo de transferencia horizontal de genes. (Johnston et al., 2023).

La resistencia a antimicrobianos no es un fenómeno exclusivo del ambiente clínico, sino que también se produce en el ambiente. Este fenómeno se produce generalmente en ambientes contaminados con antibióticos (con aguas servidas, por ejemplo) pero existen estudios donde se han encontrado genes de resistencia en ambientes libres de antibióticos (Aminov, 2009). Estudios como el anteriormente citado destacaron la idea que la resistencia a antibióticos es una problemática que afecta a la sociedad en general.

A raíz del énfasis que la comunidad científica dio a esta problemática, el gobierno del Reino Unido, en el año 2014, solicitó a Jim O'neill y sus colaboradores, la realización de diversos reportes evaluando el impacto de la resistencia a antibióticos a la sociedad, siendo una de sus conclusiones más relevantes: "para 2050, 10 millones de vidas al año y un acumulado de 100 billones USD de producción económica están en riesgo debido al aumento de infecciones resistentes a los medicamentos si no encontramos soluciones proactivas ahora para frenar el aumento de la resistencia a los medicamentos" (O'neill, 2016).

En los años posteriores a la salida de este reporte, la comunidad científica y la sociedad en general incentivaron el estudio de este fenómeno, generando reportes como los descritos por Naghavi et al. (Naghavi et al., 2024) que reúne datos de infecciones asociadas a resistencia a antibióticos de todo el mundo

desde 1990 hasta 2021. Este trabajo prevé que “ en 2050 habrá 1,91 millones de muertes anuales atribuibles a la resistencia a antimicrobianos en todo el mundo y 8,22 millones de muertes anuales serán asociadas a la resistencia a antimicrobianos” (Naghavi et al., 2024).

En el estudio anteriormente citado se dio especial importancia a las infecciones causadas por bacterias clasificadas como grupo crítico según la OMS, en las que se encuentran:

- *Acinetobacter baumannii*, resistente a carbapenémicos.
- Enterobacterales, resistentes a cefalosporinas de tercera generación.
- Enterobacterales, resistentes a carbapenémicos (World Health Organization. 2024)

Las bacterias clasificadas en el último grupo comparten la cualidad de presentar resistencia a los antibióticos carbapenémicos, medicamentos considerados como tratamientos de última línea para algunos microorganismos (Meletis, 2016).

En cuanto a la resistencia a los carbapenémicos, el mecanismo más relevante es la producción de carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar estas moléculas de antibiótico y que pueden ser constitutivas del microorganismo (como por ejemplo OXA-51 en *Acinetobacter* spp), adquiridas del ambiente o traspasadas por otros organismos similares. La capacidad de los genes relacionados con la producción de carbapenemasa para transferirse entre diferentes microorganismos constituye un factor de especial relevancia en comparación con otros mecanismos de resistencia a carbapenémicos. Esta

característica facilita su propagación entre diversos ambientes y su rápida diseminación geográfica, como ha sido documentado en regiones específicas del mundo, incluyendo Europa, Asia y América del Sur. (Codjoe & Donkor, 2017).

Dentro del grupo de Enterobacterales resistentes a carbapenémicos, se puede encontrar a bacterias pertenecientes al género *Enterobacter*, las que serán el foco de este estudio.

En el género *Enterobacter* se encuentran clasificadas diversas especies bacterianas de origen tanto intrahospitalario como ambiental. Éstos son bacilos Gram negativos, fermentadores de glucosa y, en su mayoría fermentadores de lactosa, sacarosa, móviles, indol negativo y VP positivos. Una de las características importantes de este género es que pertenece a un grupo de bacterias que representan una amenaza global a la salud humana (De Oliveira et al., 2020) clasificado como grupo ESKAPE, grupo que comparte con *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. (Tiwari, 2018).

En los últimos años ha cobrado importancia el ECC, un complejo de bacterias dentro del género *Enterobacter* compuesto por las siguientes especies: *E. cloacae subsp cloacae*, *E. asburiae*, *E. kobei*, *E. hormaechei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis* (Mustafa et al., 2020). Las bacterias pertenecientes a este complejo son fenotípicamente indistinguibles entre sí, pero se pueden diferenciar mediante técnicas como la clasificación en clusters por el análisis

de la secuencia de la proteína Hsp60 (Akbari et al., 2016) o mediante PCR multiplex (Ji et al., 2021) donde se pueden diferenciar las tres especies más prevalentes del complejo, *E. Cloacae sub cloacae*, *E. Hormachei* y *E. kobei*. Las bacterias pertenecientes a este complejo están presentes en diferentes medios, como, por ejemplo, *E. cloacae* que pertenece a la microbiota intestinal humana, pero se ha aislado de muestras como sangre, esputo y orina, *E. hormachei* en muestras de heridas, esputo y sangre, y *E. kobei* que se ha aislado de sangre, esputo, orina y de infecciones intrabdominales (Davin-regli et al., 2019). Es importante destacar que en el ámbito clínico ECC, especialmente las cepas resistentes a carbapenémicos, son considerados patógenos problemáticos para las instituciones de salud en todo el mundo, siendo constantemente reportado en infecciones nosocomiales o difíciles de tratar. (Manandhar et al., 2022)

En el ECC existen descritos 1069 secuenciotipos (ST) (Liu et al., 2022a), siendo el ST78 uno de los más destacados en la literatura, estando comúnmente asociado a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y resistencia a carbapenémicos (Annavajhala et al., 2019). También se describe a ST171 como un clon importante de *E. cloacae* resistente a carbapenémicos (CREC) con potencial epidémico en los Estados Unidos (Annavajhala et al., 2019) y con doble portación de carbapenemasas (Ghazawi et al., 2024). Desafortunadamente, no se han encontrado estudios que describan la epidemiología de ST en Latinoamérica, incluido Chile.

En cuanto a mecanismos de resistencia, el ECC es conocido por ser intrínsecamente resistente a ampicilina, las combinaciones amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina-sulbactam, cefalosporinas de primera generación y cefamicinas (CLSI, 2025), debido a la presencia de una  $\beta$ -lactamasa cromosomal de tipo AmpC, la cual puede producir un fenotipo inducible de resistencia a cefalosporinas de tercera generación (Liu et al., 2021a). Una de las enzimas que más destaca dentro del grupo anteriormente mencionado es la ACT, ya que se ha demostrado que algunas variantes, como ACT-28, posee una débil pero significativa actividad de carbapenemasa, y que, asociada a defectos en la permeabilidad de membrana externa, puede generar resistencia a carbapenémicos (Jousset et al., 2019).

Además del mecanismo intrínseco anteriormente mencionado, se ha descrito en todo el mundo la adquisición de genes, por parte de este complejo de bacterias, que codifican para BLEE del tipo *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>CTX-M</sub>, entre otras (Davin-Regli et al., 2019).

Otro de los mecanismos de resistencia que se ha reportado en cepas del ECC es la producción de carbapenemasas. Estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar antibióticos carbapenémicos, antimicrobianos considerados como tratamiento de última línea para bacilos Gram negativos (Davin-Regli et al., 2019). Hasta hace algunos años, los aislados pertenecientes al complejo que producían carbapenemasas eran relativamente raras pero existía preocupación sobre su aparición y diseminación (Mezzatesta et al., 2012). En años posteriores esta preocupación demostró ser fundada, ya que datos

epidemiológicos informaron la aparición y propagación del ECC resistente a los carbapenémicos, y se han planteado como una grave amenaza para la salud humana en todo el mundo. (Liu et al., 2021b).

Por ejemplo, según lo descrito por Annavajhala et al. *Enterobacter* spp., es la segunda Enterobacteriaceae resistente a carbapenémicos (CRE) más común en los Estados Unidos (Annavajhala et al., 2019), mientras que Chen et al señala que, hasta la fecha, el ECC resistente a carbapenémicos (CREC) se ha convertido en la tercera enterobacteria resistente a carbapenémicos (CRE) más común en China (Chen et al., 2021).

Actualmente, se desconoce el mecanismo exacto mediante el cual el ECC adquirió genes relacionados con la producción de carbapenemasas. Sin embargo, se postula que cepas originalmente susceptibles incorporaron plásmidos portadores de estos genes. Algunos estudios sugieren que bacterias resistentes a antibióticos, como las del género *Acinetobacter*, podrían haber actuado como intermediarias en la transferencia de genes codificantes de carbapenemasas hacia miembros de la familia Enterobacteriaceae (Wailan et al., 2016).

Como se mencionó previamente, el proceso mediante el cual el ECC adquirió estos genes sigue siendo incierto; no obstante, el primer reporte de una cepa de *Enterobacter cloacae* productora de carbapenemasa data de 1986 (Medeiros & Hare, 1986) y fue referenciado posteriormente en el trabajo de Nordmann et al. (Nordmann et al., 1993).

A pesar de que las cepas del ECC son productoras de carbapenemasas, se pueden encontrar en diversas partes del mundo, la prevalencia del tipo de carbapenemasa que producen difiere. Esto se comprueba en los resultados de un estudio que analizó 61 publicaciones con datos de diversos países, el cual informa que cepas que contienen *bla*<sub>KPC</sub> son las más prevalentes en Estados Unidos y Canadá, pero también han sido informadas en Europa y Sudamérica. Las cepas portadoras de *bla*<sub>NDM-1</sub> son endémicas de la India, los genes que codifican IMP han sido ampliamente descritos en el sudeste asiático, mientras que las variantes de VIM son más prevalentes en Europa, con escasos reportes en Sudamérica y el sudeste asiático. Finalmente se han informado carbapenemasas OXA-48-like en cepas de este complejo en Turquía, Oriente Medio, el norte de África y Europa (Annavajhala et al., 2019). Lamentablemente, no se han encontrado muchos estudios que informen sobre las cepas productoras de carbapenemasas del ECC en aislados chilenos ni datos epidemiológicos que demuestren que estas cepas son un problema en los centros de salud chilenos.

Con estos antecedentes, este estudio propone generar datos de cepas aisladas en centros de salud chilenos, utilizando cepas almacenadas en biorepositorio del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA), que mantiene aislados del ECC desde el año 1998 hasta 2023, para así poder determinar sus características moleculares y presencia de elementos genéticos móviles que permitan comparar la relación genética

entre aislados portadores de genes que codifican para carbapenemasas y los no portadores de genes codificantes de estas enzimas.

El objetivo de esta tesis es aportar datos epidemiológicos sobre las cepas chilenas del ECC, con el fin de contribuir a la identificación de mejores alternativas terapéuticas para el tratamiento de las infecciones actualmente causadas por estos agentes, así como para la preparación ante posibles brotes futuros en el país.

**Pregunta de investigación:**

¿La aparición del fenotipo de resistencia a carbapenémicos mediada por la presencia de carbapenemasas en cepas del complejo *Enterobacter cloacae* se debe a la adquisición de elementos genéticos móviles, o corresponde a la emergencia de nuevos clones distintos de aquellos que originalmente eran susceptibles a carbapenémicos?

**Hipótesis:**

La aparición del fenotipo de resistencia a carbapenémicos mediada por la presencia de carbapenemasas en cepas del complejo *Enterobacter cloacae* se debe a la adquisición de elementos genéticos móviles por clones que originalmente eran susceptibles a carbapenémicos

**Objetivo General:**

Comparar la relación genética entre cepas portadoras y no portadoras de carbapenemasas del complejo *Enterobacter cloacae* aisladas en Chile.

**Objetivos específicos:**

- Clasificar una colección histórica de cepas del complejo *Enterobacter cloacae* según su perfil de resistencia a carbapenémicos y su capacidad de producir carbapenemasas, e identificar el tipo específico de carbapenemasa presente en las cepas productoras.

- Determinar la relación genética entre las cepas productoras de carbapenemasas, las resistentes a carbapenémicos sin producción de carbapenemasa y las cepas susceptibles a carbapenémicos.
- Determinar las características moleculares de secuenciotipo y la presencia de elementos genéticos móviles en los clones identificados del complejo *Enterobacter cloacae*.

## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1. Cepas bacterianas:**

Las cepas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de la colección de cepas pertenecientes al biorepositorio del Laboratorio de Investigación de Agentes Antibacterianos (LIAA) de la Universidad de Concepción. Este cepario alberga cepas del ECC aisladas desde el año 1998 hasta el año 2023 en varios centros de salud de Chile, acumulando un total de 196 cepas. Las cepas están almacenadas en crioviales que contienen 700  $\mu\text{L}$  de caldo tripticasa de soya, con la suspensión de bacterias y 350  $\mu\text{L}$  de glicerol al 50% v/v. Estas cepas se almacenan a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **6.2. Recuperación de las cepas bacterianas:**

Las cepas utilizadas fueron traspasadas desde crioviales almacenados en el biorepositorio del LIAA a un agar Tripticasa de soya (TSA) y se incubaron a  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , en aerobiosis por 24 h para evaluar su viabilidad y pureza.

### **6.3. Estudio de susceptibilidad a antibióticos:**

Para evaluar la susceptibilidad de las cepas en estudio, se llevó a cabo un

antibiograma utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer (CLSI, 2025). Los antibióticos seleccionados fueron: ceftazidima, cefepime, meropenem, imipenem, gentamicina, amikacina, ciprofloxacino y aztreonam. Estos antibióticos fueron seleccionados por estar dentro de las categorías 1 y 2 de la guía M100 de CLSI 2025 para Enterobacterales (CLSI, 2025), a excepción de ceftazidima y aztreonam que se añadieron para evaluar su interacción con AmpC y Metallo-  $\beta$ -lactamasas, según lo indicado por el CLSI. Los criterios empleados para determinar la susceptibilidad o resistencia a los agentes antimicrobianos siguieron los puntos de corte establecidos en la guía CLSI M100 2025 (CLSI, 2025). Para las cepas productoras de carbapenemasas, identificadas mediante PCR y seleccionadas para secuenciación, se realizó un antibiograma extendido con ertapenem, tetraciclina, levofloxacino, cefotaxima, trimetoprim/sulfametoxazol, piperacilina/tazobactam y ceftazidima/avibactam. Esta prueba también se efectuó mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, siguiendo los mismos criterios de interpretación mencionados

anteriormente. Como controles se utilizaron las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

#### **6.4. Detección de carbapenemasas:**

Para confirmar la producción de carbapenemasas, se realizó una prueba fenotípica (Blue-Carba) a las cepas que mostraron resistencia o resultados intermedios frente a al menos un carbapenémico en el estudio de susceptibilidad, siguiendo el protocolo de Pires et al. (Pires et al., 2013). Aquellos resultados débiles o no concluyentes fueron sometidos a una prueba fenotípica adicional, la prueba mCIM, conforme al protocolo del CLSI (CLSI, 2025). Se consideró un resultado no concluyente como un cambio de color en el tubo de reacción de azul a verde claro, en un lapso de entre 90 y 120 minutos de reacción, y el tubo control sin cambios de color.

#### **6.5. Extracción de ADN e identificación de carbapenemasas:**

La extracción de ADN se realizó con el kit comercial InstaGene® según el protocolo del fabricante.

Por su parte, la identificación de carbapenemasas se realizó a las cepas que dieron un resultado positivo para la prueba de detección fenotípica. Este estudio se realizó mediante un PCR multiplex con partidores para las enzimas más prevalentes en ECC, según la información descrita por Davin-Regli et al.

(Davin-regli et al., 2019), y por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP, 2018).

- De los genes indicados en el mencionado estudio se estudiaron los siguientes:
- Clase A: *bla<sub>KPC</sub>*
- Clase B: *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*

Los partidores y el programa de amplificación utilizados para la detección de estos genes se encuentran en las tabla 1 y 2, respectivamente.

**Tabla 1.** Secuencias y tamaño de amplicón para la detección de carbapenemasa mediante PCR múltiplex.

Gen	Secuencia	Producto (pb)	Referencia
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	F: ATGTCACTGTATCGCCGTCT R: TTTTCAGAGCCTTACTGCC	893	Schechner et al., 2009
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	F: ATGGAATTGCCCAATATTATGCAC R: TCAGCGCAGCTTGTCGGC	813	Ejaz et al., 2021
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	F: CCGATGGTGTGGTTCGCAT R: GAATGCGCAGCACCAGGAT	391	Pérez et al., 2008

**Tabla 2.** Perfil térmico para el PCR de identificación de carbapenemasas.

Etapa	N° ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Inicial	1	95	9 min
Desnaturalización		95	30 s
Hibridación	35	58	40 s
Elongación		72	50 s

---

Final	1	72	5 min
-------	---	----	-------

---

Los productos de PCR generados se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% por 1 h a 100 V. Como controles se utilizaron las cepas del biorepositorio del LIAA UC-318 de *Klebsiella pneumoniae* (*bla<sub>KPC</sub>*), UCO-452 de *Escherichia coli* (*bla<sub>NDM</sub>*) y UC-236 de *Pseudomonas aeruginosa* (*bla<sub>VIM</sub>*).

#### **6.6. Agrupación de las cepas:**

Para los posteriores estudios, las cepas fueron agrupadas en 3 grupos según los resultados del estudio de susceptibilidad, detección e identificación de carbapenemasas:

- **Grupo 1:** cepas resistentes a los carbapenémicos por producción de carbapenemasas.
- **Grupo 2:** cepas no susceptibles a los carbapenémicos sin producción de carbapenemasas.
- **Grupo 3:** cepas susceptibles a los carbapenémicos.

Del total de cepas analizadas se seleccionaron al azar un número de muestras representativas de cada uno de los 3 grupos para los estudios moleculares.

### 6.7. Estudio de la relación genética entre las cepas:

La relación genética entre las cepas seleccionadas para el estudio se realizó mediante rep-PCR, según lo descrito por Castro-Alarcón, et al. (Castro-Alarcón et al., 2009), utilizando los partidores de la tabla 3.

**Tabla 3.** Partidores utilizados para rep-PCR.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5'→3'</b>
<b>REP1</b>	IIINCGNCGNCATCNGGC
<b>REP2</b>	NCGNCTTATCNGGCCTAC

N: Posición degenerada, puede ser válida para A,C,T o G; I: Posición semidegenerada por inosina. Se une preferentemente para A,C y T, y en menor medida para G.

Para evaluar el resultado del PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % a 70 V por 4 h. Posterior a esto, los resultados se interpretaron utilizando la herramienta GelJ en sus parámetros por defecto (versión 1.0) (Heras et al., 2015). Los aislados que mostraron un resultado mayor o igual al 92% fueron considerados genéticamente relacionados (Castro-Alarcón et al., 2009) y los grupos de 3 o más cepas genéticamente relacionadas se consideraron como un clúster, según los criterios establecidos por el laboratorio.

## **6.8. Selección de cepas para secuenciación del genoma completo:**

A partir de los resultados de relación genética, para los siguientes estudios se seleccionó una cepa por cada clúster. Además, toda cepa fuera de los clústeres con un resultado positivo para la identificación de carbapenemasas fue seleccionada para secuenciar. En total 12 cepas fueron seleccionadas para secuenciar, siendo la cepa más antigua aislada en el año 1998 y la cepa más actual del año 2023.

## **6.9. Secuenciación de cepas:**

Las cepas seleccionadas para la secuenciación se enviaron al laboratorio externo SeqCenter para realizar la secuenciación por tecnología Illumina®. Se utilizó el servidor Galaxy Australia (Abueg et al., 2024) para el análisis bioinformático y dentro de él, las herramientas Trimmomatic (versión 0.36.6) para eliminar las secuencias adaptadoras (Bolger et al., 2014), SPAdes (versión 4.2.0+galaxy0) (Antipov et al., 2016) para ensamblar el producto de la secuenciación obtenido y también FastQC (versión 0.74+galaxy1) (Andrews, s.f.) como herramienta de control de calidad.

## 6.10. Análisis comparativo de la secuencia de las cepas:

Las secuencias obtenidas se analizaron en los servidores de Galaxy Australia para obtener información respecto a sus genes de resistencia, secuenciotipo y portación de plásmidos. Para realizar dichos análisis se utilizaron las siguientes herramientas:

Galaxy Australia:

- pubMLST (T, 2016) (versión 2.22.0): Para obtener el secuenciotipo por MLST.
- ABRicate (versión 1.0.1): Utilizando la base de datos de Resfinder (Bortolaia et al., 2020) (Camacho et al., 2009) para identificar genes de resistencia a antibióticos,
- PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014) (versión 2.1.6+galaxy1) y MOB-Recon (Robertson, s.f.) (versión 3.1.9+galaxy0): Para identificación y tipificación de plásmidos.

Finalmente, las cepas que presentaron variantes del gen *bla*<sub>NDM</sub> fueron sometidas a un análisis comparativo con la herramienta Clinker (Gilchrist & Chooi, 2021) (versión 0.0.23+galaxy0). Este análisis consistió en comparar los *contigs* asociados a genes de carbapenemasas (estén o no asociados a plásmidos) con plásmidos portadores del gen *bla*<sub>NDM</sub> informados en el trabajo de Li et al. (Li et al., 2023).

### 6.11. Ensayo de conjugación:

Se realizó un ensayo de conjugación para comprobar la transferencia horizontal de genes de carbapenemasas. Dicho ensayo fue realizado según lo descrito por Quezada-Aguiluz et al. (Quezada-Aguiluz et al., 2022) con modificaciones como la utilización de 2 µg/mL de imipenem y 640 µg/mL de rifampicina como antibióticos seleccionadores, y modificación de las temperaturas de incubación a 30°C. Se utilizó como cepa donadora la cepa *Enterobacter cloacae* T-176 y la cepa UCO 231 de *E. coli* K12 como receptora. Se realizó un estudio de susceptibilidad a las cepas que incluyó rifampicina mediante disco difusión e imipenem mediante epsilometría. Los resultados fueron interpretados mediante los mismos criterios mencionados en el apartado 6.3.

Para evidenciar la presencia de las carbapenemasas en la cepa transconjugante se realizó una extracción de ADN con el kit comercial InstaGene (Bio-Rad) y PCR bajo las mismas condiciones expuestas en apartados anteriores (tablas 1 y 2).

Finalmente, para evaluar la relación genética entre cepas transconjugantes, donadora y receptora, se realizó un ERIC-PCR (Versalovic et al., 1991). Para esto, se utilizaron los siguientes descritos en la tabla 4.

**Tabla 4.** Partidores utilizados para ERIC-PCR.

<b>Primer</b>	<b>Secuencia 5'→3'</b>
<b>ERIC 1</b>	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC
<b>ERIC 2</b>	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG

Para ERIC-PCR, las muestras se sometieron al protocolo de la tabla 5.

**Tabla 5.** Perfil térmico ERIC-PCR.

<b>Etapa</b>	<b>N° Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo (min)</b>
Inicial	1	95	7
Desnaturalización		94	1
Hibridación	30	52	1
Elongación		65	8
Final	1	65	15

Los resultados se evidenciaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % que se corrió por 3 h (con gel packs para controlar la temperatura) a 70 V. Los resultados de la electroforesis fueron interpretados visualmente, sin la ayuda de software.

#### **6.12. Sinergia ceftazidima/avibactam + aztreonam:**

El ensayo de sinergia se realizó según lo descrito en el trabajo de Harris et al. (Harris et al., 2023) para las 7 cepas secuenciadas que eran productoras de carbapenemasa (T-192, T-189, T-183, T-181, T-177, T-176 y UDEC32). Para el ensayo se generaron 4 tubos para cada cepa, conteniendo caldo Mueller Hinton ajustado de cationes (CLSI, 2025) y un inóculo estandarizado de la bacteria. El primer tubo no contenía antibióticos, el segundo contenía un disco de ceftazidima/avibactam, el tercero un disco de aztreonam y el cuarto un

disco de cada antibiótico mencionado anteriormente. Los tubos se incubaron a 35 °C +/- 2 °C, en aerobiosis por 16-20 h.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Análisis de la viabilidad de las cepas:

De las cepas almacenadas en el biorepositorio del LIAA, se logró recuperar 187 cepas viables para su posterior análisis. Estas cepas comprenden un rango de fechas de aislamiento que va desde 1998 hasta 2023, y fueron obtenidas a partir de diversas muestras clínicas, tales como infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones urinarias, entre otras. Las muestras fueron recolectadas en centros clínicos ubicados en distintas ciudades de Chile, lo que proporciona una representación geográficamente diversa.

**Tabla 6.** Año y procedencia de las cepas

<b>Año de aislamiento</b>	<b>N° de cepas</b>	<b>Procedencia</b>	<b>N° de cepas por procedencia</b>
<b>1998</b>	1	Concepción	1
<b>2000</b>	19	Concepción	7
		Santiago	11
		Puerto Montt	1
<b>2001</b>	6	Santiago	2
		Iquique	4
<b>2002</b>	1	Talca	1
<b>2008</b>	66	Concepción	14
		Santiago	38
		Valparaíso	1
		Temuco	4
		Puerto Montt	8
		No disponible	1
<b>2009</b>	17	Santiago	9

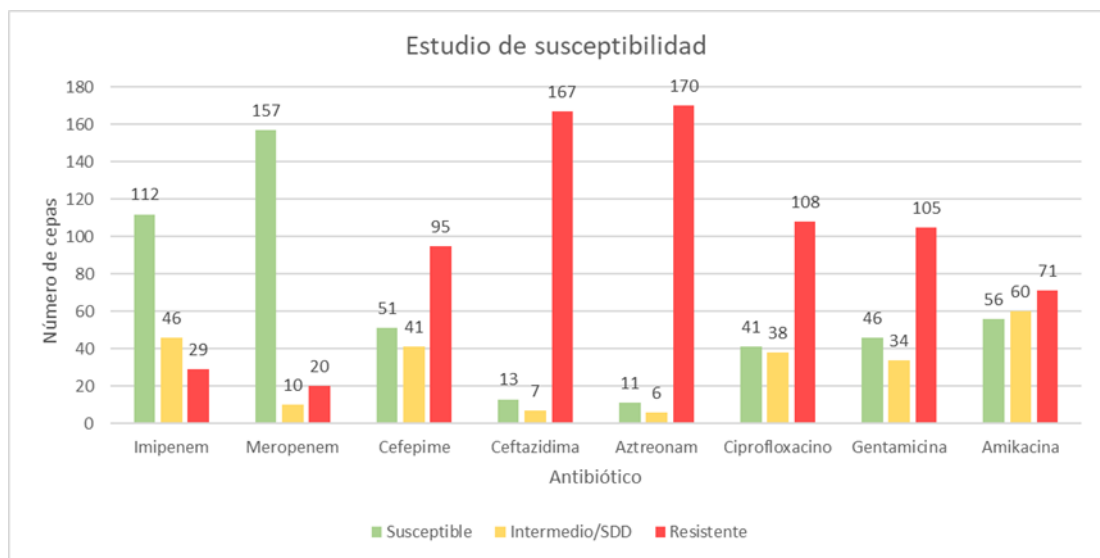
		Temuco	6
		puerto Montt	2
<b>2012</b>	8	Santiago	5
		Puerto Montt	3
<b>2013</b>	23	Santiago	12
		Temuco	11
<b>2014</b>	2	Los Ángeles	2
<b>2018</b>	2	Talca	1
		Santiago	1
<b>2021</b>	1	No disponible	1
<b>2022</b>	15	Santiago	15
<b>2023</b>	1	Concepción	1
<b>Fecha no disponible</b>	30	Concepción	3
		Santiago	13
		Valparaíso	6
		Temuco	7
		Puerto Montt	1
<b>Total</b>	192	<b>Total</b>	192

Información de las cepas estudiadas, incluyendo las 5 cepas que no se lograron recuperar

En cuanto a su crecimiento en TSA, se observaron dos fenotipos diferenciados con base en características macroscópicas. El fenotipo predominante presentaba colonias de tamaño mediano, redondeadas, con bordes irregulares, ligeramente convexas y de aspecto cremoso. El segundo fenotipo, observado en aproximadamente cinco cepas, mostraba una morfología similar, aunque con una apariencia mucosa en lugar de cremosa.

## 7.2. Estudio de susceptibilidad:

El estudio de susceptibilidad se realizó para 187 cepas, según lo descrito en la metodología observando los siguientes resultados.



**Figura 1.** Gráfico de barras del estudio de susceptibilidad a antibióticos. SDD: susceptible dosis dependiente, rango que solo aplica para cefepime.

En relación con los antibióticos evaluados, se observó que el mayor número de cepas resistentes se presentó frente a aztreonam, debido a que su  $\beta$ -lactamasa cromosomal de clase C presenta una elevada afinidad por aztreonam (Akhtar, 2022), seguido por ceftazidima con una diferencia de solo tres cepas. Cabe destacar que más de la mitad de las cepas mostraron resistencia a cefepime, ceftazidima, aztreonam, ciprofloxacino y gentamicina. Respecto de los carbapenémicos, 29 cepas evidenciaron resistencia a imipenem y 20 cepas a meropenem, lo que posiciona a los carbapenémicos como la clase de antibióticos con el mayor número de cepas susceptibles. Sin

embargo, en el caso de imipenem, 46 de 187 (24.6%) cepas mostraron un valor intermedio.

Respecto a la resistencia a cefalosporinas, el resultado posiblemente se deba a la portación intrínseca de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC en las bacterias del género *Enterobacter*, pero no sería concordante con las cepas que mostraron un resultado susceptible a estas. Este fenómeno puede entenderse mejor al considerar las recomendaciones de la guía CLSI M100, la cual advierte que, aunque las cefalosporinas puedan aparecer como susceptibles en pruebas *in vitro*, durante el tratamiento clínico puede desarrollarse resistencia debido a la desrepresión de la enzima AmpC (CLSI, 2025). La desrepresión de esta  $\beta$ -lactamasa cromosomal conduce a una hiperexpresión de la enzima, ampliando su espectro de hidrólisis para incluir cefalosporinas de tercera generación (Seral et al., 2012) y monobactámicos (Mauri et al., 2021), lo que explica la resistencia observada en estas familias de antibióticos.

Como se mencionó anteriormente, más de la mitad de las cepas fueron resistentes a ciprofloxacino y gentamicina. En contraste, la amikacina mostró el menor número de cepas resistentes, con excepción de los carbapenémicos, lo que sugiere que este amikacina podría ser una opción terapéutica viable, especialmente en aislamientos urinarios, donde su uso es más común.

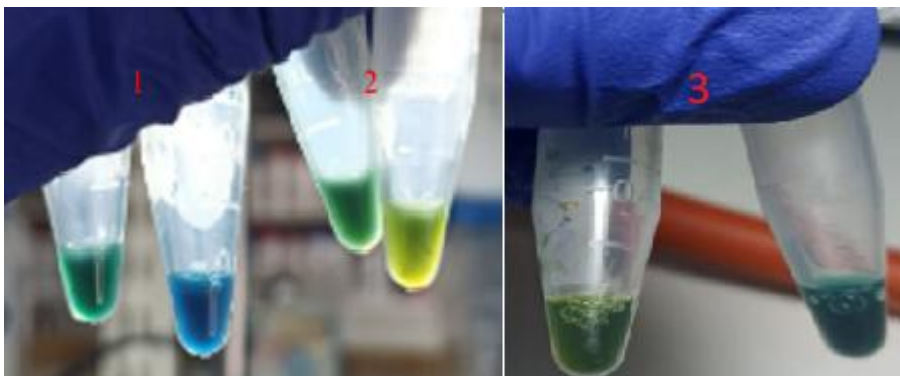
El 41% (77) de las cepas mostraron un resultado de no susceptibilidad (intermedio o resistente) a al menos uno de los carbapenémicos ensayados. Las 77 cepas con un resultados de no susceptibilidad se utilizarán para los estudios posteriores. Como los carbapenémicos son antibióticos utilizados

como última línea de tratamiento en bacilos Gram negativos, es esperable que no existan muchas cepas resistentes a estos y que las no susceptibles lo sean por factores como impermeabilidad de membrana o pérdida de porinas, más que por la presencia de carbapenemasas. El alto porcentaje de cepas que muestran susceptibilidad, en comparación con otros antibióticos comúnmente utilizados en perfiles de antibiogramas rutinarios, puede llevar a que los carbapenémicos se conviertan en la terapia de elección para los aislamientos de esta especie. Sin embargo, el uso extendido de carbapenémicos podría favorecer la selección de cepas con mecanismos de resistencia a estos antibióticos, que representan la última línea de tratamiento, lo que plantea un desafío significativo para los sistemas de salud.

### **7.3. Detección e identificación de carbapenemasas:**

De las 77 cepas que fueron estudiadas el 75% (58) resultaron negativas a la detección de carbapenemasas, mientras que el 19% (15) fueron positivas, mientras que el 6% (4) de las cepas dieron resultados considerados como no concluyentes. Al respecto, se definió un resultado no concluyente como el cambio de color a verde/amarillento posterior a una hora de incubación en la prueba de Blue-Carba, tal como se observa en la Figura 2. Se realizó mCIM a las 4 cepas con resultados no concluyentes y se obtuvieron halos de inhibición, siendo interpretables también como no concluyentes según mCIM (CLSI, 2025). El método mCIM tiene una sensibilidad y especificidad de 99% para las carbapenemasas KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM, SME y tipo- OXA (CLSI,

2025), por lo que con estas metodologías no puede confirmarse ni descartarse la presencia de otras carbapenemasas distintas a las mencionadas para estos 4 aislados.



**Figura 2.** Resultados Blue-Carba. 1: Resultado negativo; 2: Resultado positivo y 3: resultado No concluyente.

De acuerdo con los resultados obtenidos, únicamente 15 del total cepas analizadas en este estudio resultaron portar algún gen codificante de carbapenemasa. De éstas, 14 cepas portaban el gen *bla*<sub>NDM</sub>, mostrando resistencia tanto a meropenem como a imipenem. La cepa T-177, que resultó positiva para el gen *bla*<sub>VIM</sub>, presentó un resultado intermedio a imipenem y fue susceptible a meropenem. Este hallazgo resalta la importancia de estudiar la presencia de carbapenemasas en cepas con resultados de susceptibilidad intermedia frente a al menos uno de los carbapenémicos analizados.

Es relevante destacar que ninguna de las cepas en las que se detectó la presencia de una carbapenemasa portaba el gen *bla*<sub>KPC</sub>. Este resultado contrasta con los datos de vigilancia más recientes en Chile (ISP, 2018), que

reportan a *bla<sub>KPC</sub>* como el gen más prevalente en cepas de *Enterobacter cloacae*. Cabe mencionar que el estudio citado recopiló datos entre los años 2014 y 2017, mientras que las cepas portadoras de carbapenemasas identificadas en esta investigación fueron aisladas entre 2018 y 2023. Esto sugiere un posible cambio en la prevalencia de las carbapenemasas en las cepas del ECC en Chile, lo cual subraya la necesidad de una actualización de los datos epidemiológicos en el país.

**Tabla 7.** Portación de genes que codifican carbapenemasas y resultados de estudio de susceptibilidad.

N° de cepa	Carbapenemasa	Resultado antibiograma							
		IM P	ME R	FE P	CA Z	AZ T	CI P	GE N	AM K
<b>T-192</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-191</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>T-190</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>T-189</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-188</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-187</b>	NDM	R	R	R	R	I	R	R	S
<b>T-186</b>	NDM	R	R	R	R	R	I	R	S
<b>T-184</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-183</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-181</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-180</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-179</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>T-177</b>	VIM	I	S	R	R	R	I	R	S
<b>T-176</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>UDEC32</b>	NDM	R	R	R	R	R	R	R	I

R: resistente; I: intermedio; S: susceptible. IMP: imipenem; MER: meropenem; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidime; AZT: aztreonam; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina y AMK: amikacina

#### **7.4. Clasificación de cepas:**

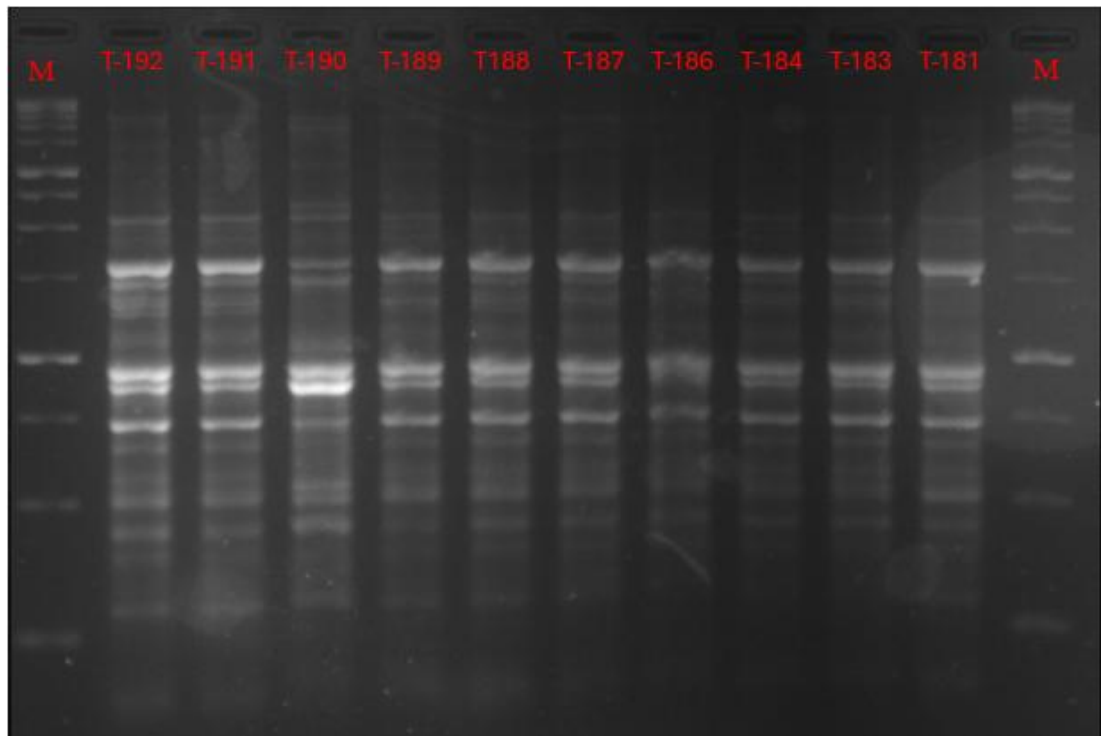
Según los resultados expuestos, las cepas se clasificaron en 3 grupos

- **Grupo 1:** Cepas resistentes a carbapenémicos por producción de carbapenemasa: 15
- **Grupo 2:** Cepas no susceptibles a carbapenémicos sin producción de carbapenemasa: 62 (incluye cepas con un resultado no concluyente para la detección de carbapenemasas)
- **Grupo 3:** Cepas susceptibles a carbapenémicos: 110

Para los siguientes estudios se seleccionó al azar un número de cepas de cada grupo.

#### **7.5. Análisis de la relación genética entre cepas del complejo *Enterobacter cloacae*:**

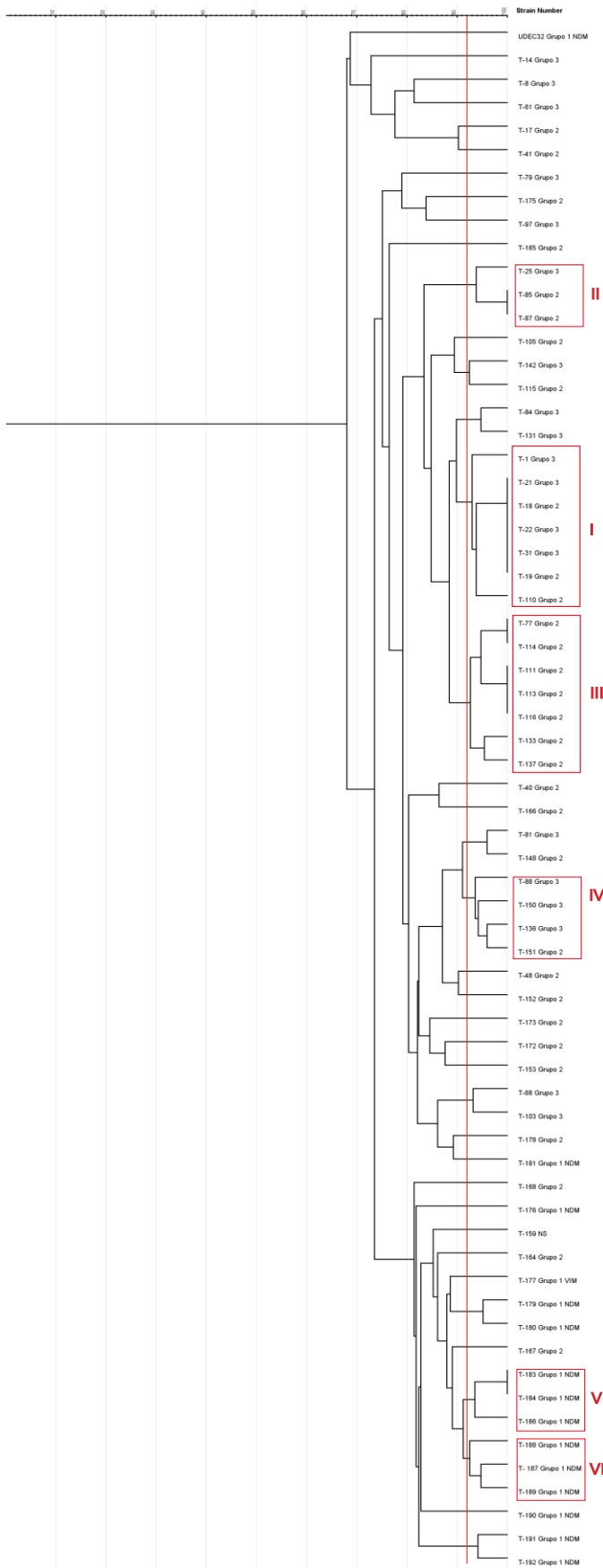
Se seleccionaron 67 cepas desde los 3 grupos, 15 cepas del grupo 1, 33 cepas del grupo 2 y 19 cepas del grupo 3. El resultado del rep-PCR realizado a algunas de estas cepas se expone como ejemplo en la figura



**Figura 3.** Resultado rep-PCR. Gel correspondiente a rep-PCR donde se observan distintos patrones de bandas generados por las cepas de interés. Todas las cepas expuestas en la figura se clasificaron dentro del grupo 1 M: Marcadores de pares de bases (1kb) de la marca Promega.

En ambos extremos de la imagen, rotulados con la letra "M" se observan los marcadores de pares de bases y entre estos se encuentran las cepas con sus patrones de bandas producidos luego del rep-PCR.

Los resultados producidos por rep-PCR y observados en las imágenes de electroforesis fueron analizados mediante el software GelJ con el que se generó el dendograma de la Figura 4.



**Figura 4.** Dendograma de relación genética. En la imagen se observa el numero de la cepa y el grupo al que pertenece. Grupo 1: Cepas resistentes a carbapenémicos por producción de carbapenemasa; Grupo 2: Cepas no susceptibles a carbapenémicos sin producción de carbapenemasa; Grupo 3: Cepas susceptibles a carbapenémicos.

NDM: portación del gen *bla<sub>NDM</sub>*; VIM: portación del gen *bla<sub>VIM</sub>*. En números romanos se observan los clústeres identificados. En el apartado anexos se encuentra una la imagen ampliada y con mayor resolución.

Los resultados de la amplificación de las secuencias rep demostraron que existe una relación genética entre cepas susceptibles a carbapenémicos (grupo 3) y no susceptibles, pero sin portación de carbapenemasas (grupo 2), pero no se observa relación entre estos dos grupos y las cepas productoras de carbapenemasas (grupo 1).

**Tabla 8.** Información de cada cepa que componen cada clúster.

Clúster	Nº de cepa	Procedencia	Año de aislamiento	Grupo
I	T-1	Concepción	1998	3
	T-18	Santiago	2000	2
	T-19	Santiago	2000	2
	T-21	Santiago	2001	3
	T-22	Iquique	2001	3
	T-31	Santiago	2008	3
	T-110	Santiago	2009	2
II	T-25	Iquique	2001	3
	T-85	Santiago	2008	2
	T-87	Santiago	2008	2
III	T-77	Santiago	n.d.	2
	T-111	Santiago	2009	2

	T-113	Santiago	n.d.	2
	T-114	Santiago	2009	2
	T-116	Santiago	2009	2
	T-133	Puerto Montt	2012	2
	T-137	Temuco	n.d.	2
IV	T-88	Concepción	2008	3
	T-136	Temuco	n.d.	3
	T-150	Temuco	2013	3
	T-151	Temuco	2013	2
V	T-183	Santiago	2022	1
	T-184	Santiago	2022	1
	T-186	Santiago	2022	1
VI	T-187	Santiago	2022	1
	T-188	Santiago	2022	1
	T-189	Santiago	2022	1

n.d.: No disponible.

En relación con los clústeres analizados (Tabla 8), no se evidencia una tendencia definida respecto a su procedencia geográfica, salvo en los clústeres 5 y 6, cuyos aislamientos comparten un mismo origen. En cuanto al año de aislamiento, se observa una tendencia a la agrupación de cepas obtenidas en períodos temporales similares: las cepas más antiguas se agrupan en clústeres distintos a aquellos que contienen cepas más recientes. Este patrón puede explicarse por la naturaleza de las secuencias *rep*, las cuales están asociadas a la inserción de elementos genéticos móviles (Tobes y Pareja, 2006). En consecuencia, el número y disposición de dichas secuencias podrían variar significativamente entre cepas aisladas con varios años de diferencia.

Respecto a la agrupación basada en el perfil de susceptibilidad a carbapenémicos, se evidencia una relación genética entre cepas pertenecientes al grupo 2 (no susceptibles, pero sin producción de carbapenemasas) y al grupo 3 (susceptibles), como se observa en los clústeres 1, 2 y 4. Por otro lado, el clúster 3 incluye exclusivamente cepas del grupo 2, mientras que los clústeres 5 y 6 agrupan únicamente cepas del grupo 1 (productoras de carbapenemasa).

En conjunto, los resultados obtenidos mediante la técnica de rep-PCR no permiten confirmar de manera concluyente la hipótesis planteada en esta investigación, aunque sugieren posibles relaciones genéticas entre cepas con distintos fenotipos de resistencia.

## 7.6. Análisis de resultados de secuenciación:

**Tabla 9.** Perfil de resistencia fenotípico de las cepas secuenciadas.

N° de cepa	Resultado antibiograma							
	IMP	MER	FEP	CAZ	AZT	CIP	GEN	AMK
<b>UDEC32</b>	R	R	R	R	R	R	R	I
<b>192</b>	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>189</b>	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>183</b>	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>181</b>	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>177</b>	I	S	R	R	R	I	R	S
<b>176</b>	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>168</b>	I	S	S	R	R	S	S	S
<b>151</b>	R	I	R	R	R	R	I	R
<b>133</b>	R	S	R	R	R	R	R	R
<b>25</b>	S	S	R	R	R	R	R	R
<b>1</b>	S	S	R	R	R	R	R	R

R: resistente; I: intermedio; S: susceptible. IMP: imipenem; MER: meropenem; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidime; AZT: aztreonam; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina y AMK: amikacina

**Tabla 10.** Secuenciotipos detectados mediante MLST y otros datos epidemiológicos.

N° de cepa	ST	Clúster	Año de aislamiento	Carbapenemasa	Ciudad de procedencia
T-1	-	1	1998	N/D	Concepción
T-25	ST88	N/D	2001	N/D	Iquique
T-133	ST94	2	2012	N/D	Puerto Montt
T-151	ST200	3	2013	N/D	Temuco
T-168	-	N/D	2013	N/D	Santiago
T-176	ST683	N/D	2018	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Santiago
T-177	ST88	N/D	2021	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Concepción
T-181	ST134	N/D	2022	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Santiago
T-183	ST134	4	2022	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Santiago
T-189	ST134	5	2022	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Santiago
T-192	ST134	N/D	2022	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Santiago
UDEC32	ST269	N/D	2023	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	Concepción

ST: secuenciotipo; -: sin secuenciotipo asignado; N/D: no detectado

Las 12 cepas secuenciadas se distribuyeron en 6 secuenciotipos según MLST. Las cepas que pertenecieron a un mismo secuenciotipo fueron T-25 y T-177 (ST88), y las cepas T-181, T-183, T-189 y T-192 (ST134). Las cepas que fueron únicas de la selección en su secuenciotipo fueron T-133 (ST94), T-151 (ST200), UDEC32 (ST269) y T-176 (ST683). Para las cepas T-1 y T-168 no se pudo asignar a un secuenciotipo, de acuerdo con la información registrada en pubMLST, por lo que se proyecta realizar análisis adicionales para su asignación. Las 4 cepas pertenecientes al ST134 fueron aisladas en el mismo año (2022) y en la misma ciudad de procedencia (Santiago), por lo

que probablemente pertenecieron a un mismo brote. Esto podría dar cuenta de un hecho alarmante, ya que las cepas son resistentes a antibióticos de última línea para Enterobacterales y un brote de estos microorganismos puede afectar significativamente a los pacientes de un establecimiento de salud. Un hallazgo relevante es que, a pesar de que el análisis rep-PCR no mostró relación genética entre las cepas, las cepas T-25 y T-177 (73%), aisladas con 20 años de diferencia y en ciudades que se encuentran a más de 2200 kilómetros de distancia, pertenecen al mismo secuenciotipo ST88. La cepa T-25 fue aislada el año 2001 (Iquique) y susceptible a carbapenémicos, mientras que la cepa T-177 (Concepción), fue aislada el año 2021, y es portadora del gen de carbapenemasa *bla<sub>VIM</sub>*, siendo resistente a estos antibióticos. Esto sugiere fuertemente que cepas relacionadas, que originalmente eran susceptibles a los carbapenémicos, adquirieron genes de resistencia que las hicieron resistentes a estos  $\beta$ -lactámicos. La discrepancia observada entre los resultados obtenidos mediante las metodologías rep-PCR y MLST puede atribuirse a las diferencias fundamentales en sus principios de análisis genómico. La técnica rep-PCR se basa en la amplificación de secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas dispersas a lo largo del genoma, lo que permite generar un patrón de bandas distintivo mediante electroforesis en geles de agarosa. En contraste, el método MLST (*Multilocus Sequence Typing*) se fundamenta en la secuenciación de fragmentos de siete genes *housekeeping* altamente conservados, lo que permite la asignación precisa de secuenciotipos.

Ambos enfoques son metodológicamente válidos para estudios de tipificación genética. En este contexto, se consideró que las cepas T-25 y T-177 están genéticamente relacionadas, a pesar de las diferencias detectadas entre ambas técnicas. Estudios previos, como el de Viau et al. (Viau et al., 2017), en los que se comparan distintas metodologías de tipificación para ECC, concluyen que, si bien MLST es superior frente a métodos como la secuenciación del gen *hsp60*, rep-PCR ofrece un mayor poder discriminativo entre cepas.

Los elementos repetitivos utilizados en rep-PCR, conocidos como *repetitive extragenic palindromic sequences* (REP), han sido ampliamente estudiados. Investigaciones como la de Tobes y Pareja (Tobes & Pareja, 2006) han demostrado que estas secuencias actúan como puntos de acceso preferenciales (*hot spots*) para eventos de transposición, y están fuertemente asociadas con procesos de plasticidad genómica mediados por elementos genéticos móviles.

Con base en esta evidencia, la divergencia entre los resultados de rep-PCR y MLST podría explicarse por la adquisición de material genético a lo largo del tiempo, en cepas pertenecientes a un mismo secuenciotipo. Estos eventos de adquisición podrían incluir regiones que contienen secuencias REP, afectando así el perfil obtenido por rep-PCR. No obstante, los genes *housekeeping*

empleados en MLST, debido a su carácter conservado, tienden a permanecer estables en el tiempo, lo que los hace menos susceptibles a dichos cambios.

Un ejemplo de este fenómeno lo constituyen dos cepas del secuenciotipo ST88, aisladas con una diferencia temporal de 20 años, las cuales presentaron perfiles divergentes mediante rep-PCR. Esto sugiere que las variaciones genéticas acumuladas durante ese intervalo temporal fueron suficientes para alterar los patrones generados por esta técnica, sin afectar los loci utilizados en MLST.

En consecuencia, se propone que MLST constituye una herramienta más adecuada para evaluar la relación genética entre cepas aisladas en intervalos de tiempo prolongados, mientras que rep-PCR podría ser más apropiada para distinguir cepas aisladas en periodos más cercanos. La validación de este fenómeno se plantea como una proyección para investigaciones futuras.

**Tabla 11.** Genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos en cepas del ECC.

<b>Genes de resistencia para <math>\beta</math>-lactámicos</b>				
<b>N° de cepa</b>	<b>Carbapene masas</b>	<b>BLEE</b>	<b>AmpC</b>	<b>Otras</b>
<b>T-1</b>	N/D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-177</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-16</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , y <i>bla</i> <sub>SCO-1</sub>
<b>T-25</b>	N/D	N/D	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	<i>bla</i> <sub>PER-2</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-101</sub> , <i>bla</i> <sub>SCO-1</sub> y <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
<b>T-133</b>	N/D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> , y <i>bla</i> <sub>OXA-2</sub>
<b>T-151</b>	N/D	<i>bla</i> <sub>CTX-M-177</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-16</sub>	N/D
<b>T-168</b>	N/D	N/D	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	N/D

<b>T-176</b>	<i>bla</i> <sub>NDM-7</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-14</sub> y <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>
<b>T-177</b>	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> y <i>bla</i> <sub>CTX-M-30</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub> y <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>
<b>T-181</b>	<i>bla</i> <sub>NDM-7</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-30</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
<b>T-183</b>	<i>bla</i> <sub>NDM-7</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-30</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
<b>T-189</b>	<i>bla</i> <sub>NDM-7</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-30</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
<b>T-192</b>	<i>bla</i> <sub>NDM-7</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-30</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
<b>UDEC 32</b>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>ACT-7</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> y <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>

N/D: no detectado.

En todas las cepas se detectaron genes de resistencia a  $\beta$ -lactámicos. Todas las cepas presentaron alguna variante de la  $\beta$ -lactamasa de tipo AmpC de la familia ACT (*bla*<sub>ACT-7</sub>, *bla*<sub>ACT-16</sub>, *bla*<sub>ACT-14</sub>), siendo la variante *bla*<sub>ACT-7</sub> la que se detectó en el mayor número de cepas. La  $\beta$ -lactamasa tipo ACT es la más conservada de las  $\beta$ -lactamasas clase C de Ambler en *Enterobacter* y se ha descrito que la variante de la enzima está relacionada con la especie de ECC, como ACT-2 y ACT-3 están presentes solo en *Enterobacter asburiae* y ACT-6, ACT-9 y ACT-12 solo en *Enterobacter kobei* (Dong et al., 2022). Respecto a *Enterobacter hormachei*, la única especie a la que pertenecen las cepas secuenciadas, no existe información respecto a prevalencia de cierto tipo de variantes, pero este estudio sugiere que ACT-7 podría ser la variante característica en esta especie, aunque faltan estudios, principalmente que incluyan un mayor número de cepas, para sostener dicha afirmación.

Es importante destacar a la cepa T-168, que es no susceptible a carbapenémicos, y se clasificó como resultado no concluyente según Blue-

Carba y mCIM. En esta cepa no se detectaron genes asociados a carbapenemasas y la única  $\beta$ -lactamasa detectada fue *bla*<sub>ACT-7</sub>. Un caso similar a este fue descrito en el trabajo de Jousset et al. (Jousset et al., 2019), en el que trabajaron con una cepa de *E. kobei* clasificada como productora de carbapenemasa según técnicas de detección y determinaron que esta cepa, que solo producía ACT-28, generaba una hidrólisis leve del imipenem. Los resultados no concluyentes de la cepa T-168 que porta el gen *bla*<sub>ACT-7</sub>, al igual que en el trabajo anteriormente mencionado, podrían ser explicado por una hidrólisis enzimática de baja intensidad sobre el imipenem. No obstante, la confirmación de la actividad hidrolítica de la enzima ACT-7 requeriría estudios cinéticos detallados, los cuales exceden los objetivos y el alcance experimental del presente trabajo.

Respecto de otras  $\beta$ - lactamasas relevantes, se destacó la detección de genes de:

- $\beta$ - lactamasas de espectro extendido (BLEE) como las distintas variantes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>PER-2</sub> y *bla*<sub>SHV-12</sub>.
- $\beta$ - lactamasas de amplio espectro (BLAE) como *bla*<sub>TEM-1A</sub> y *bla*<sub>TEM-1B</sub>.
- $\beta$ - lactamasas de clase A no pertenecientes a BLEE ni BLAE como *bla*<sub>SCO-1</sub>.
- $\beta$ - lactamasas clase C, como variantes de *bla*<sub>ACT</sub> y *bla*<sub>DHA-1</sub>
- $\beta$ - lactamasas clase D como las distintas variantes de las tipo *bla*<sub>OXA</sub>

Finalmente, respecto a las carbapenemasas, solo se detectaron genes relacionados a  $\beta$ -lactamasas de clase B, tal y como demuestran los resultados

anteriores. Es importante destacar que estos genes de carbapenemasas solo fueron detectados en cepas aisladas en años más recientes, lo que entrega soporte a la hipótesis sobre la adquisición de estos genes.

**Tabla 12.** Genes de resistencia a quinolonas en cepas del ECC.

<b>N° de cepa</b>	<b>Genes de resistencia a quinolonas</b>
<b>T-1</b>	<i>oqxA</i> y <i>oqxB</i>
<b>T-25</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> y <i>mdf(A)</i>
<b>T-133</b>	<i>oqxA</i> y <i>oqxB</i>
<b>T-151</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>T-168</b>	<i>oqxA</i> y <i>oqxB</i>
<b>T-176</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> y <i>qnrB4</i>
<b>T-177</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>mdf(A)</i> y <i>qnrB4</i>
<b>T-181</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB1</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>T-183</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB1</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>T-189</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB1</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>T-192</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrB1</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i>
<b>UDEC32</b>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>mdf(A)</i> , <i>qnrB1</i> y <i>aac(6')-Ib-cr</i>

En cuanto a fluoroquinolonas, todas las cepas presentan el gen *oqxA* y *oqxB*, que está relacionado a bombas de expulsión para estos compuestos. Las cepas T-1, T-133 y T-168 solo presentaron los genes previamente mencionados. Además, se encontraron distintas variantes del gen *qnr* en las cepas T-176 (*qnrB4*) y T-183 (*qnrB1*), que está relacionado con la protección de la ADN girasa. También se encontró el gen *aac(6')-Ib-cr*, relacionado con la producción de enzimas modificadoras de antibióticos como aminoglicósidos y quinolonas, en diversas cepas, donde se incluyen T-151 y T-192. Finalmente, en las cepas T-25, T-177 y UDEC32 se encontró el gen *mdf(A)*,

relacionado con una bomba de expulsión que confiere resistencia a quinolonas, tetraciclina, aminoglucósidos, fenicoles y macrólidos, entre otros (Lewinson, 2003).

**Tabla 13.** Genes de resistencia a aminoglucósidos, trimetoprim y colistina en cepas del ECC.

Cepa	Genes de resistencia para		
	Aminoglucósidos	Trimetoprim	Colistina
T-1	<i>acc(3')-IIa, acc(6')-1q, aph(3)-1a y ant(3'')-1a</i>	<i>dfrA1</i>	<i>mcr-9.1</i>
T-25	<i>rmtD2, mdf(A), ant(3'')Ia y acc(3)-IIa</i>	<i>dfrA1</i>	N/D
T-133	<i>acc(3')-IIa, acc(6')-1b, aadA1 y aph(3')-Ia</i>	<i>dfrA12</i>	N/D
T-151	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>dfrA1 y dfrA12</i>	<i>mcr-9.1</i>
T-168	N/D	N/A	N/D
T-176	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Ib, acc(6')-IIc,</i>	<i>dfrA19</i>	<i>mcr-9.1</i>
T-177	<i>mdf(A), acc(6')-IIc, acc(3')-IIb, aph(3')-Ia, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id y aadA2</i>	<i>dfrA12 y dfrA19</i>	N/D
T-181	<i>aac(6')-Ib-cr, ant(3'')-1a, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id y acc(3)-IIa</i>	<i>dfrA14</i>	N/D
T-183	<i>aac(6')-Ib-cr, ant(3'')-1a, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id y acc(3)-IIa</i>	<i>dfrA14</i>	N/D
T-189	<i>aac(6')-Ib-cr, acc(3)-IIa, ant(3'')-Ia</i>	<i>dfrA14</i>	N/D
T-192	<i>aac(6')-Ib-cr, ant(3'')-1a, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id y acc(3)-IIa</i>	<i>dfrA14</i>	N/D
UDE32	<i>aac(6')-Ib-cr, mdf(A), aph(3'')-Ib, aph(6)-Id y acc(3)-IIa</i>	<i>dfrA14</i>	N/D

N/D: no detectado.

En cuanto a los aminoglucósidos, las cepa T-168 no presentó ningún gen asociado a mecanismos de resistencia, lo que concuerda con su susceptibilidad a aminoglucósidos. El resto de las cepas mostraron genes relacionados con diversos tipos y variantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos (EMA), tales como acetilasas (*acc*), fosforilasas (*aph*), adenilasas (*aad*) y nucleotidiltransferasas (*ant*). Entre estas, las acetilasas y fosforilasas son las más destacadas en cuanto a la resistencia a los aminoglucósidos. Se detectó el gen *rmtD2*, asociado a una metilasa del ARN ribosomal 16S que otorga resistencia a los principales aminoglucósidos utilizados en terapias sistémicas (Bueno et al., 2016), el cual estuvo presente únicamente en la cepa T-25. El gen *rmtD2*, reportado desde hace algunos años en plásmidos de cepas multirresistentes de Enterobacterales y *Pseudomonas* spp. (Bueno et al., 2016), ha sido informado en cepas de *Enterobacter* spp. desde 1996 y sugiere que géneros como *Enterobacter* spp. o *Citrobacter* spp. son el reservorio original de este gen (Tijet et al., 2011).

En todas las cepas, excepto en la cepa T-168, se encontraron variantes del gen *drfA*, los cuales han sido relacionados con la expresión de proteínas homólogas de la proteína F<sub>olA</sub>, que no son inhibidas por el trimetoprim, el cual es el blanco de este antibiótico.

En relación con la resistencia a la colistina, las cepas T-1, T-151 y T-176 presentaron el gen *mcr-9.1*, el cual está relacionado con una fosfoetanolamina

transferasa que modifica el lípido A de la membrana externa, reduciendo así la afinidad del antibiótico colistina por su blanco.

**Tabla 14.** Genes de resistencia a fenicoles, fosfomicina, sulfonamidas, tetraciclinas y macrólidos en cepas de ECC.

Nº de cepa	Fenicole s	Fosfom icina	Sulfona midas	Tetracic linas	Macrólidos
T-1	<i>catA1</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	N/A	N/A
T-25	<i>mdf(A)</i> y <i>floR</i>	N/A	<i>sul1</i>	<i>tet(G)</i>	<i>mdf(A)</i> y <i>ere(A)</i>
T-133	<i>catA2</i>	N/A	<i>sul1</i>	N/A	<i>mph(A)</i>
T-151	N/A	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	N/A	<i>mph(A)</i>
T-168	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
T-176	<i>catA2</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	N/A	<i>ere(A)</i>
T-177	<i>mdf(A)</i> y <i>catA2</i>	N/A	<i>sul1</i> y <i>sul2</i>	<i>tet(D)</i>	<i>erm(B)</i> , <i>mdf(A)</i> , <i>ere(A)</i> y <i>mph(A)</i>
T-181	<i>catA1</i>	<i>fosA</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	N/A
T-183	<i>catA1</i>	<i>fosA</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	N/A
T-189	<i>catA1</i>	<i>fosA</i>	N/A	<i>tet(A)</i>	N/A
T-192	<i>catA1</i>	<i>fosA</i>	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	N/A
UDEC 32	<i>mdf(A)</i>	N/A	<i>sul2</i>	<i>tet(A)</i>	N/A

N/D: no detectado

Respecto a fenicoles, las cepas T-151 y T-168 no presentaron genes de resistencia asociados. Ocho de las 12 cepas presentaron variantes de los genes *catA* que se asocian con la expresión de una enzima cloranfenicol acetiltransferasa que inactiva dicha droga. En la cepa T-25 se encontró el gen *floR* que está asociado a una bomba de expulsión que otorga resistencia a

florfenicol, un antibiótico cuyo uso es principalmente veterinario, y también a cloranfenicol. Como se mencionó anteriormente, las cepas T-25, T-177 y UDEC32 presentaron el gen *mdf(A)* que también está asociado a resistencia a fenicoles.

En cuanto a fosfomicina, en las cepas T-1, T-151, T-176, T-181, T-183, T189 y T1-92, se encontró el gen *fosA* asociado a la expresión de una enzima que inactiva fosfomicina.

Todas las cepas portan genes de resistencia asociados a sulfonamidas, con excepción de T-168 y T-189, siendo estos genes *sul1* o *sul2*, y el único caso de portación de ambos genes es T-177. Los genes *sul1* y *sul2* codifican para una proteína homóloga de la dihidropteroato sintasa que no son inhibidas por sulfonamidas.

Respecto a tetraciclinas, la cepa T-25 porta el gen *tet(G)*, T-177 el gen *tet(D)* y las cepas T-181, T-183, T-189, T-192 y UDEC32 el gen *tet(A)*. Los genes encontrados han sido relacionados con bombas de expulsión para tetraciclinas.

Finalmente, 5 de las 12 cepas portan genes de resistencia a macrólidos, pero estos no serán descritos debido a su nula significancia clínica.

Considerando todos los genes de resistencia encontrados, todas las cepas, excepto una (T-168), presentaron una notable cantidad y diversidad de genes. La diferencia más destacada fue la presencia de genes de carbapenemasas en las cepas aisladas en 2018 y en adelante, lo cual podría atribuirse a la presión selectiva derivada del mayor uso de carbapenémicos en los últimos

años. La cepa más antigua (T-1), aislada en 1998, portaba genes de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (*bla*<sub>CTX-M-177</sub>) y de AmpC (*bla*<sub>ACT-16</sub>), lo que le confería resistencia a una amplia gama de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, dejando los antibióticos de última línea como única opción terapéutica. Este hecho pudo haber favorecido la selección de cepas resistentes, explicando la emergencia de cepas portadoras de carbapenemasa en los años más recientes.

Se observaron discrepancias entre la detección de genes de resistencia y los resultados fenotípicos de susceptibilidad. Un ejemplo es la cepa T-168, que posee genes asociados a resistencia a quinolonas, pero es susceptible a ciprofloxacino. Este fenómeno podría explicarse por la función de estos genes, que codifican bombas de expulsión capaces de conferir resistencia a ciprofloxacino solo cuando se encuentran hiperexpresados (Albarri et al., 2022). Es importante considerar que la resistencia a quinolonas se genera por la mutación de genes cromosomales, pero estas mutaciones por sí solas no confieren resistencia a fluoroquinolonas como ciprofloxacino, sino que, por la combinación de estas con genes de resistencia adquiridos en plásmidos. La combinación mutaciones en genes cromosomales (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*), la adquisición de genes de resistencia contenidos en plásmidos que protegen a las enzimas blanco de quinolonas (*qnrB*) o que contralan la expresión bombas de expulsión (*oqxA* y *oqxB*) y la presión selectiva del ambiente es lo que genera la selección de cepas resistentes a fluoroquinolonas (Hooper & Jacoby, 2015). En el caso de este estudio, se observa que las cepas que

contienen una mayor diversidad de genes de resistencia asociados a quinolonas son las que expresaron la resistencia fenotípica a ciprofloxacino, lo que explicaría la discrepancia mencionada.

### 7.7. Detección de plásmidos:

**Tabla 15.** Identificación de grupos de incompatibilidad de plásmidos.

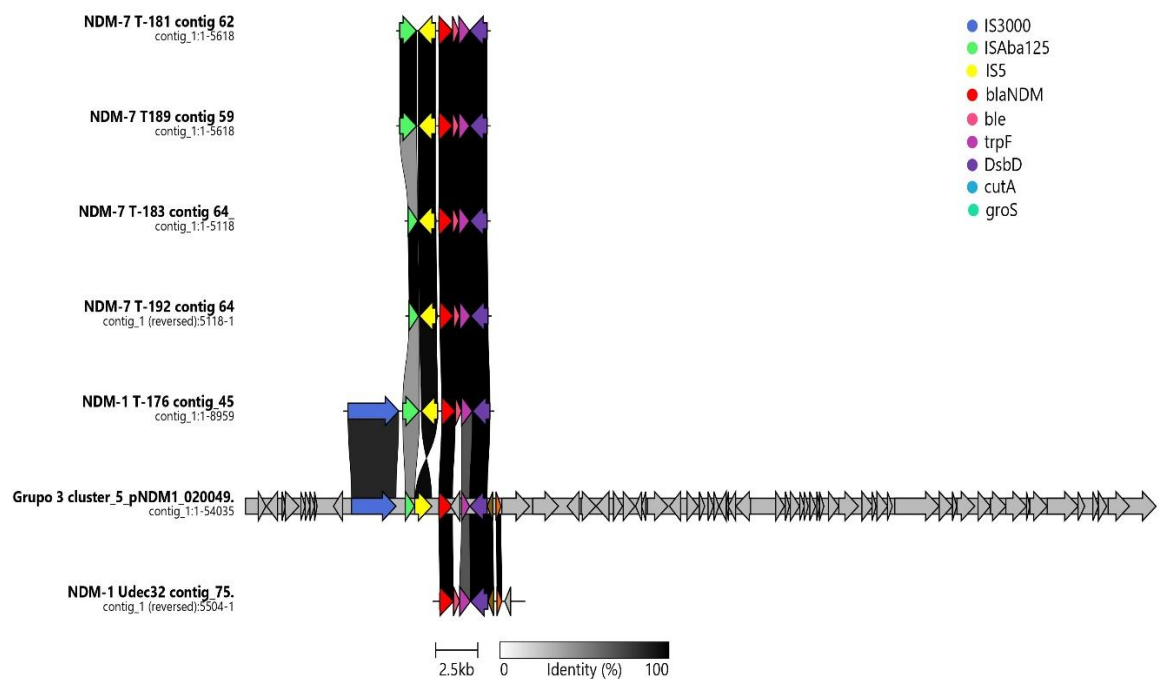
<b>N° de cepa</b>	<b>Grupos de incompatibilidad por PlasmidFinder</b>	<b>Grupos de incompatibilidad por MOB-suite</b>
T-1	IncFIB, IncHI2, IncHI2A e IncL/M	IncFIB, IncHI2A, IncL/M e Inc18
T-25	IncFIB, IncFII, IncHI2 e IncHI2A	IncFIB, IncFIC, IncFII, IncFIB, IncFII e IncHI2A
T-133	No detectado	No detectado
T-151	IncFIB, IncHI2, IncHI2A e IncL/M	IncHI2A, IncFIB e IncL/M
T-168	No detectado	IncFIA, IncFII
T-176	IncHI2, IncHI2A, IncL/M e IncX3	IncFIA, IncHI2A e IncL/M
T-177	IncFII, IncHI2, IncHI2A e IncN3	IncHI2A, IncFIB, IncFII e IncN
T-181	IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncN3 e IncX3	IncHI2A, IncN, IncFIB e IncFII
T-183	IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncN3 e IncX3	IncHI2A, IncN, IncFIB e IncFII
T-189	IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncN3 e IncX3	IncHI2A, IncN, IncFIB e IncFII
T-192	IncFIB, IncFII, IncHI2, IncHI2A, IncN3 e IncX3	IncHI2A, IncN, IncFIB e IncFII
UDEC	No detectado	IncU

Todas las cepas analizadas, con excepción de T-133, presentaron plásmidos pertenecientes a diversos grupos de incompatibilidad. El análisis de PlasmidFinder de las cepas T-168 y UDEC32 no detectó grupos de incompatibilidad pertenecientes a plásmidos, pero el análisis por MOB-suite si los detectó, lo que demuestra la utilidad en el uso de más de una herramienta para este tipo de análisis. También se detectaron discrepancias como la detección del grupo de incompatibilidad IncX3, que fue detectado en 5 cepas por la herramientas PlasmidFinder pero en ninguna cepa por la herramienta MOB-suite. Esta discrepancia se debe a que, tal y como se indica en el foro de respuestas de MOB-suite, la herramienta detecta las secuencias asociadas al grupo de incompatibilidad IncX3 como una secuencia de inserción y no como un plásmido (jrober84, 2020), lo que apoya aún más el uso de más de una herramienta para la detección de secuencias asociadas a grupos de incompatibilidad de plásmidos.

El análisis por MOB-suite reveló que los *contigs* en los que detectó el gen *bla<sub>VIM-2</sub>*, en la cepa T-177, está asociado a un plásmido. Lo mismo se detectó en las cepas T-192, T-189, T-183 y T-181, que portan genes *bla<sub>NDM-7</sub>*. En el caso de las cepas T-176 y UDEC32, los *contigs* en los cuales se detectaron los genes *bla<sub>NDM-7</sub>* y *bla<sub>NDM-1</sub>*, respectivamente, fueron reconocidos como genes cromosomales, lo que no está en acuerdo con la información descrita en la literatura, ya que no se han reportado *E. hormaechei* que contengan el gen *bla<sub>NDM</sub>* de manera cromosomal. Comparando la secuenciación Illumina con la secuenciación híbrida, la primera, al generar fragmentos cortos, no

genera una secuencia genómica completa (Zhang, 2021), lo que pudo provocar que el *contig* donde se detectó *bla*<sub>NDM-1</sub> no contuviera al plásmido completo y por esto no fuera reconocido como tal por las herramientas.

Considerando lo anterior, se utilizó la herramienta *clinker* para evaluar el entorno genético de los *contigs* donde se detectaron variantes del gen *bla*<sub>NDM</sub> y se compararon con plásmidos portadores de *bla*<sub>NDM</sub> descritos en el trabajo de Li et al. (Li et al., 2023).



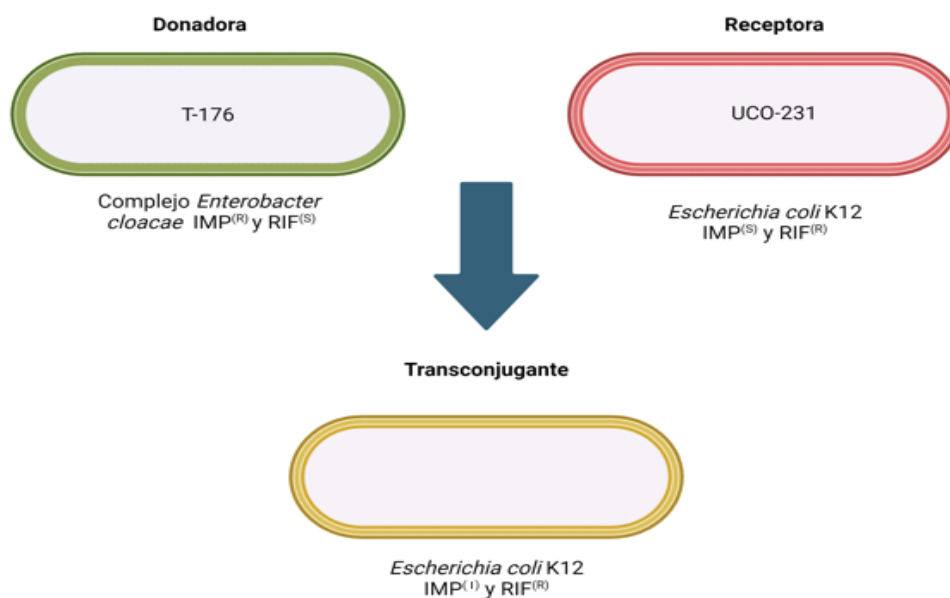
**Figura 5.** Comparación de los entornos genéticos entre *contigs* que contienen el gen *bla*<sub>NDM</sub> de cepas de ECC y el plásmido pNDM1\_020049.

El análisis de *clinker* demuestra similitud entre los elementos estudiados. La similitud en el entorno genético entre el *contig* que contiene el gen *bla*<sub>NDM-1</sub> en la cepa T-176, con el plásmido portador de *bla*<sub>NDM</sub> y con las demás cepas de

ECC que fueron detectadas como plásmidos según MOB-suite, es indicativo de que este gen efectivamente se encuentra dentro de un plásmido y no en el cromosoma de la cepa.

### 7.8. Análisis de los resultados de conjugación:

Las siguientes figuras, imágenes y tablas esquematizan el proceso de conjugación:



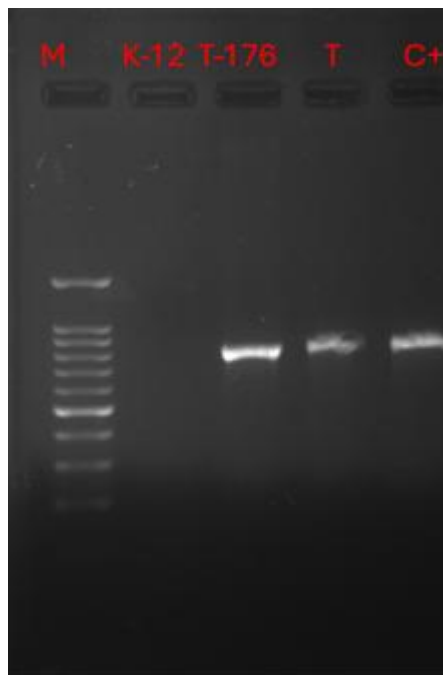
**Figura 6.** Esquematización del proceso de conjugación.

**Tabla 16.** Resultados del estudio de susceptibilidad a cepas de la conjugación.

Cepa	Rifampicina		Imipenem	
	Interpretación	CIM (µg/mL)	Interpretación	
Donadora	S	24	R	
Receptora	R	0,19	S	
Transconjugante	R	2	I	

S: Susceptible; I: Intermedio, R: Resistente y CIM: Concentración mínima inhibitoria.

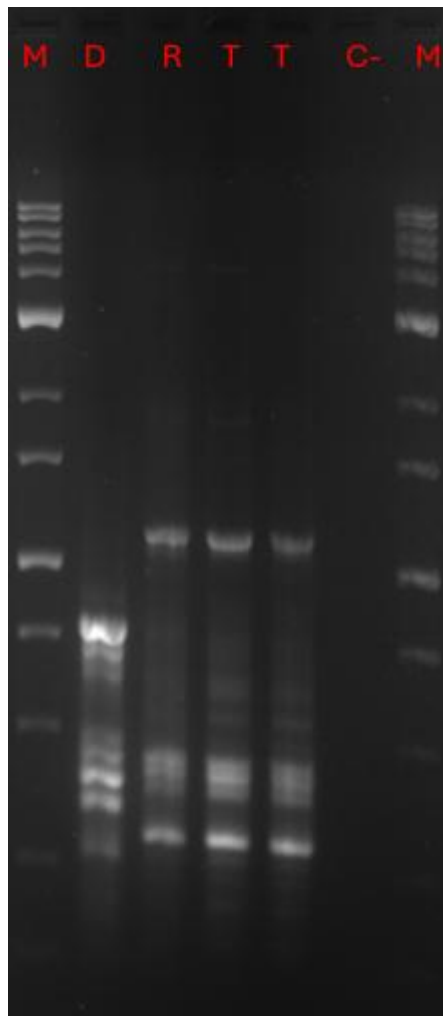
Se logró generar una cepa transconjugante a partir de una cepa donadora (T-176) susceptible a rifampicina, pero resistente a imipenem (CIM 24 µg/mL) y una cepa receptora de *E. coli* (UCO231) resistente a rifampicina, pero susceptible a imipenem (CIM 0,19). La cepa transconjugante generada fue resistente a rifampicina e intermedia a imipenem con una CIM (2 µg/mL) 7 magnitudes más elevada al determinar la CIM con la tira epsilométrica (BioMérieux).



**Figura 7.** Resultado del PCR para la detección del gen *bla<sub>NDM</sub>* en cepas de la conjugación. Carril 1 marcador de tamaño de 100 pb (Promega); carril 2 *E.*

*coli* K-12 UCO231 (cepa receptora); carril 3: ECC T-176 (cepa donadora), carril 3: cepa T de transconjugante y carril 4: control positivo (C+).

La cepa receptora resultó negativa para la portación del gen *bla*<sub>NDM</sub>, mientras que la cepa donadora y la transconjugante resultaron positivas. Este resultado demuestra que, el gen *bla*<sub>NDM</sub> fue adquirido por la cepa receptora durante el proceso de conjugación, generando así la cepa transconjugante.



**Figura 8.** Resultado de ERIC-PCR para las cepas de la conjugación. M: Marcador de pares de bases 1kb (Promega); D: Donadora; R: Receptora; T: Transconjugante; C-: Control negativo

Para confirmar los resultados del ensayo de conjugación, se llevó a cabo un análisis mediante ERIC-PCR con el objetivo de evaluar la relación genética entre las tres cepas utilizadas: T-176 (donadora), UCO231 (receptora) y la transconjugante. En la imagen obtenida se observan dos patrones de bandas distintos, uno correspondiente a la cepa donadora y otro compartido por la cepa receptora y la transconjugante. Este análisis confirma que el proceso de conjugación fue exitoso y que, efectivamente, la cepa receptora adquirió el material genético conjugable, transformándose en la cepa transconjugante.

La confirmación de que, bajo las condiciones evaluadas, la cepa T-176, perteneciente al ECC es capaz de transferir el gen *bla<sub>N</sub>DM* a otras especies de bacilos Gram negativos de importancia clínica, como *Escherichia coli*, que representa una preocupación significativa desde la perspectiva de la salud pública (Fuga et al., 2022). El ambiente hospitalario, caracterizado por una elevada presión selectiva debido al uso intensivo de antibióticos, favorece la selección de cepas con una amplia gama de genes de resistencia, tal como ocurre en la cepa T-176.

En caso de que se produzcan fallos en los protocolos de control en los centros clínicos, cepas resistentes como T-176 o los genes que porta podrían dispersarse a través de desechos hospitalarios o el lixiviado que se genera a

partir de estos (Abosse et al., 2024), personas (ya sean personal de salud, pacientes de hospitales o visitantes) (Ding et al., 2023), aguas residuales, aire, animales de granja entre otros vectores, llegando a contaminar el ambiente (Jian et al., 2021). Esto podría facilitar la propagación de genes de resistencia a antibióticos de última línea, lo que tendría un impacto devastador a nivel ambiental, en la ganadería y otros sectores. Dado que cepas del ECC han sido detectadas en el ambiente, como en efluentes que desembocan en ríos, (Maikalú et al., 2023), la cepa T-176, al ser un patógeno de origen hospitalario, con resistencia a muchos antibióticos, y ser de una especie que puede ser diseminada al ambiente, podría actuar como un puente ideal para la transferencia de genes de resistencia entre el ambiente hospitalario y otros ecosistemas, con potenciales consecuencias globales (Zhang et al., 2020).

### 7.9. Resultados del estudio de susceptibilidad extendido:

**Tabla 17.** Estudio de susceptibilidad extendido.

N° de cepa	CTX	ETP	CAZ/AVI	PIP/TAZO	SXT	LEV	TET
T-192	R	R	R	R	R	R	R
T-189	R	R	R	R	R	S	R
T-183	R	R	R	R	R	I	R
T-181	R	R	R	R	R	S	R
T-177	R	R	R	R	R	S	R
T-176	R	R	R	R	R	R	S
UDEC32	R	R	R	R	R	R	R

CTX: Cefotaxima; ETP: Ertapenem; CAZ/AVI: Ceftazidima/avibactam;

PIP/TAZO: Piperacilina/tazobactam; SXT: Trimetoprim/sulfametoxazol; LEV:

Levofloxacino y TET: Tetraciclina.

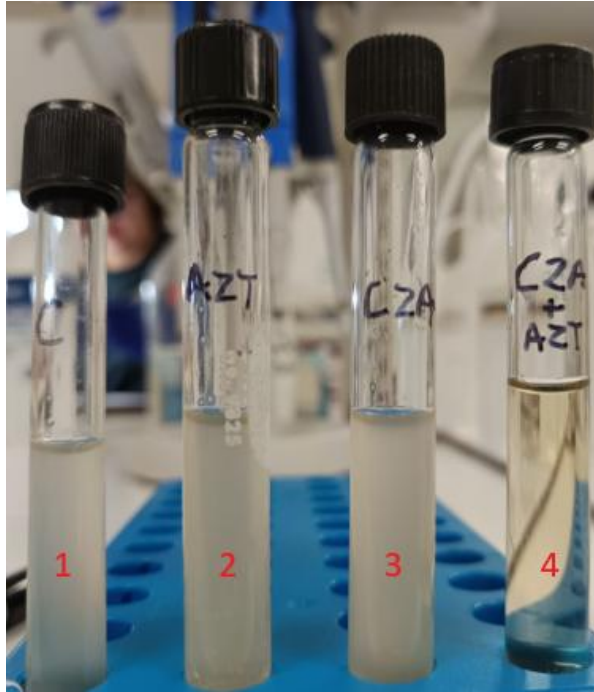
En este estudio, realizado para las cepas seleccionadas para secuenciación y que portaban carbapenemasas, se evaluaron antibióticos en combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, antibióticos pertenecientes a familias que no habían sido incluidas en el antibiograma original, así como antibióticos de familias previamente testeadas, y que por limitaciones de espacio, no fueron incorporados, y antibióticos en combinación con inhibidores de  $\beta$ -lactamasas. Las cepas mostraron resistencia a la mayoría de los antibióticos evaluados; la cepa T-176 fue la única susceptible a tetraciclina, mientras que las cepas T-189, T-181, T-177 fueron susceptibles a levofloxacin, y la cepa T-183 presentó susceptibilidad intermedia a este último antibiótico. Todas las cepas fueron resistentes a las combinaciones de  $\beta$ -lactámicos con inhibidores por la acción de enzimas como ACT (clase C de Ambler), que no es inhibida por tazobactam e hidrolizan aztreonam, y por carbapenemasas NDM o VIM (Clase B de Ambler) que no se son inhibidas ni por tazobactam ni avibactam. Por el hallazgo de cepas con portación de  $\beta$ -lactamasas de clase B y C, se incluyó una prueba de sinergia para ceftazidima/avibactam + aztreonam (CLSI, 2025) para evaluar una posible opción de tratamiento para estas cepas .

Comparando resultados de este antibiograma ampliado con los resultados de genes de resistencia, se puede observar discrepancias en los resultados, como el caso de la cepa T-181 que presenta un gen relacionado a resistencia a quinolonas (*qnrB1*) (Domínguez-Herrera et al., 2013) pero en el estudio fenotípico se observa resistente a ciprofloxacino, pero susceptible a

levofloxacino. Este fenómeno probablemente se deba a que, para la detección de resistencia producida por la expresión de variantes del gen *qnr*, se recomienda utilizar metodologías cuantitativas y no disco difusión, y si se utiliza disco difusión, ciprofloxacino es un mejor marcador de resistencia que levofloxacino (Cavaco & Aarestrup, 2009).

#### **7.10. sinergia ceftazidima/avibactam + aztreonam:**

Considerando que existieron cepas que fueron resistentes a todos los antibióticos ensayados, y que se evidenció la portación de carbapenemasas de clase B y de  $\beta$ -lactamasas tipo AmpC en algunas cepas, se consideró realizar este ensayo como explorar una potencial alternativa terapéutica. La prueba fue positiva para todas las cepas evaluadas, por lo que esta sinergia entre antibióticos podría ser considerada una opción terapéutica para infecciones causadas por bacterias multirresistentes del ECC, tal como lo han concluido estudios que lo evaluaron *in vitro* (Li et al., 2024) e *in vivo* (Cairns et al., 2021).



**Figura 9.** Resultado de la sinergia ceftazidima/avibactam + aztreonam. 1 control; 2: Aztreonam; 3: Ceftazidima/avibactam; y 4: Sinergia ceftazidima/avibactam + aztreonam.

## 8. Conclusión

- *Enterobacter cloacae* complex (ECC) constituye un grupo bacteriano heterogéneo; sin embargo, los resultados de este estudio sugieren una mayor prevalencia en Chile de *Enterobacter hormaechei* en infecciones clínicas humanas, lo que debe ser confirmado con futuros estudios.
- Las cepas del ECC presentan resistencia a múltiples familias de antibióticos, principalmente a los  $\beta$ -lactámicos, debido a la producción cromosómica de la  $\beta$ -lactamasa AmpC y su posible desrepresión.
- La caracterización de la colección histórica reveló un cambio en el perfil de susceptibilidad a carbapenémicos del complejo *Enterobacter cloacae* en Chile, transitando de cepas susceptibles (110 en la colección histórica) hacia la emergencia de fenotipos de resistencia. Se identificó una transición epidemiológica relevante: mientras que los aislamientos no susceptibles independientes de carbapenemasas (62) han persistido desde el año 2000, a partir de 2018 se evidencia la aparición de cepas productoras de estas enzimas (15). Este cambio sugiere un desplazamiento en los mecanismos de resistencia, evolucionando desde determinantes no enzimáticos (alteración de la permeabilidad de membrana o la hiperexpresión de sistemas de eflujo)

hacia la adquisición de carbapenemasas como principal impulsor de la resistencia a carbapenémicos.

- El análisis genético mediante rep-PCR no evidenció una relación clonal entre cepas productoras y no productoras de carbapenemasas. No obstante, el análisis por MLST reveló una relación genética entre dos aislamientos separados por un intervalo temporal de 20 años.
- La detección de diferentes plásmidos asociados a genes de carbapenemasas, junto con su capacidad de transferencia por conjugación, respalda la hipótesis de que clones originalmente susceptibles pudieron adquirir estos determinantes de resistencia mediante elementos genéticos móviles.
- Este estudio demostró que el fenotipo de resistencia a carbapenémicos surgió en cepas de ECC relacionadas genéticamente (ST88) por la adquisición de elementos genéticos móviles que contienen genes que codifican carbapenemasas.
- La alternativa terapéutica basada en la combinación ceftazidima/avibactam + aztreonam representa una opción eficaz frente a cepas multirresistentes de ECC productoras de metalo- $\beta$ -lactamasas.
- Los resultados enfatizan la necesidad de mantener una vigilancia epidemiológica y molecular continua, así como de promover el uso

racional de antibióticos para prevenir la propagación de fenotipos multirresistentes.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

Abosse, J. S., Megersa, B., Zewge, F., & Eregno, F. E. (2024). Healthcare waste management and antimicrobial resistance: a critical review. *Journal of Water and Health*, 22(11), 2076-2093.

Abueg, L. A. L., Afgan, E., Allart, O., Awan, A. H., Bacon, W. A., Baker, D., Bassetti, M., Batut, B., Bernt, M., Blankenberg, D., Bombarely, A., Bretaudeau, A., Bromhead, C. J., Burke, M. L., Capon, P. K., Čech, M., Chavero-Díez, M., Chilton, J. M., Collins, T. J., ... Zoabi, R. (2024). The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W83–W94.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkae410>

Akbari, M., Bakhshi, B., & Najjar Peerayeh, S. (2016). Particular Distribution of *Enterobacter cloacae* Strains Isolated from Urinary Tract Infection within Clonal Complexes. *Iranian biomedical journal*, 20(1), 49–55.  
<https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.007>

Akhtar, A., Fatima, N., & Khan, H. M. (2022). Beta-lactamases and their classification: an overview. *Beta-Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Threats and Challenges*, 25-33.

Albarri, O., AlMatar, M., Öcal, M. M., & Köksal, F. (2022). Overexpression of efflux pumps AcrAB and OqxAB contributes to ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *K. pneumoniae*. *Current Protein and Peptide Science*, 23(5), 356-368.

Aminov, R.I. (2009). The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology*, 11: 2970-2988.  
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01972.x>

Andrews, S. (s.f.). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data.  
<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A and Uhlemann A-C (2019) Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front. Microbiol.* 10:44.doi: 10.3389/fmicb.2019.00044

Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J. S., & Pevzner, P. A. (2016). HybridSPAdes: An algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics*, 32(7), 1009–1015.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv688>

Azevedo, P. A. A., Furlan, J. P. R., Oliveira-Silva, M., Nakamura-Silva, R., Gomes, C. N., Costa, K. R. C., ... & Pitondo-Silva, A. (2018). Detection of virulence and  $\beta$ -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Brazilian journal of microbiology*, 49, 224- 228.

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Bolourchi, N., Giske, C. G., Nematzadeh, S., Mirzaie, A., Abhari, S. S., Solgi, H., & Badmasti, F. (2022). Comparative resistome and virulome analysis of clinical NDM-1–producing carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 28, 254-263.

Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., ... Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>

Bueno, M. F. C., Francisco, G. R., de Oliveira Garcia, D., & Doi, Y. (2016). Complete sequences of multidrug resistance plasmids bearing rmtD1 and rmtD2 16S rRNA methyltransferase genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3), 1928-1931.

Cabral, A. B., Maciel, M. A. V., Barros, J. F., Antunes, M. M., Barbosa de Castro, C. M. M., & Lopes, A. C. S. (2017). Clonal spread and accumulation of  $\beta$ -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital Recife, Pernambuco, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, 66(1), 70–77.

Cairns, K. A., Hall, V., Martin, G. E., Griffin, D. W., Stewart, J. D., Khan, S. F., ... & Peleg, A. Y. (2021). Treatment of invasive IMP-4

Enterobacter cloacae infection in transplant recipients using ceftazidime/avibactam with aztreonam: a case series and literature review. *Transplant Infectious Disease*, 23(2), e13510.

Castro-Alarcón, N., Alonso-Morales, A., Silva-Sánchez, J., & Armenta-Solís, A. (2009). Validación de dos variantes de la técnica rep-PCR para la tipificación molecular de aislados de *Enterobacter cloacae* productores de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Bioquimia*, 34(4), 165-174.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

Cavaco, L. M., & Aarestrup, F. M. (2009). Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, and *aac (6') Ib-cr*, in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and determinations of wild-type distributions. *Journal of clinical microbiology*, 47(9), 2751-2758.

Chen, J., Tian, S., Nian, H., Wang, R., Li, F., Jiang, N., & Chu, Y. (2021). Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex in a tertiary Hospital in Northeast China, 2010-2019. *BMC infectious diseases*, 21(1), 611. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06250-0>

Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI M100-ED35:2025 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. 2025.

Codjoe, F., & Donkor, E. (2017). Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences*, 6(1), 1. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/medsci6010001>

Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019). *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 32(4), e00002-19.

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). *Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. <https://doi.org/10.1128/CMR>

Ding, D., Wang, B., Zhang, X., Zhang, J., Zhang, H., Liu, X., ... & Yu, Z. (2023). The spread of antibiotic resistance to humans and potential protection strategies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 254, 114734.

Domínguez-Herrera, J., Velasco, C., Docobo-Pérez, F., Rodríguez- Martínez, J. M., López-Rojas, R., Briales, A., ... & Pachón, J. (2013). Impact of qnrA1, qnrB1 and qnrS1 on the efficacy of ciprofloxacin and levofloxacin in an experimental pneumonia model caused by *Escherichia coli* with or without the GyrA mutation Ser83Leu. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7),1609-1615.

Dong, X., Zhu, M., Li, Y., Huang, D., Wang, L., Yan, C., ... & Pan, W. (2022). Whole-genome sequencing-based species classification, multilocus sequence typing, and antimicrobial resistance mechanism analysis of the *Enterobacter cloacae* complex in Southern China. *Microbiology Spectrum*, 10(6), e02160-22.

Ejaz, H., Ahmad, M., Younas, S., Junaid, K., Abosalif, K. O. A., Abdalla, A. E., Alameen, A. A. M., Elamir, M. Y. M., Bukhari, S. N. A., Ahmad, N., & Qamar, M. U. (2021). Molecular epidemiology of extensively-drug resistant *Acinetobacter baumannii* sequence

type 2 co-harboring *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA</sub> from clinical origin. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1931–1939.

<https://doi.org/10.2147/IDR.S310478>

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). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>.

Fuga, B., Sellera, F. P., Cerdeira, L., Esposito, F., Cardoso, B., Fontana, H., ... & Lincopan, N. (2022). WHO critical priority *Escherichia coli* as one health challenge for a post-pandemic scenario: genomic surveillance and analysis of current trends in Brazil. *Microbiology spectrum*, 10(2), e01256-21.

Ghazawi, A., Anes, F., Mouftah, S., Elbediwi, M., Baig, A., Alketbi, M., Almazrouei, F., Alhashmi, M., Alzarooni, N., Manzoor, A., Habib, I., Strepis, N., Nabi, A., & Khan, M. (2024). Genomic Study of High-Risk Clones of *Enterobacter hormaechei* Collected from Tertiary Hospitals in the United Arab Emirates. *Antibiotics*, 13(7), 592.

<https://doi.org/10.3390/antibiotics13070592>

Gilchrist, C. L., & Chooi, Y. H. (2021). Clinker & clustermap. js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics*, 37(16), 2473-2475.

Harris, H., Tao, L., Jacobs, E. B., Bergman, Y., Adebayo, A., Tekle, T., Lewis, S., Dahlquist, A., Abbey, T., Wenzler, E., Humphries, E & Simner, P. J.(2023).Multicenter evaluation of an MIC-based aztreonam and ceftazidime-avibactam broth disk elution test. *Journal of clinical microbiology*, 61(5), e01647-22.

Heras, J., Domínguez, C., Mata, E. et al. GelJ – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics* 16, 270 (2015).  
<https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>

Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York academy of sciences*, 1354(1), 12-31.

Instituto de salud pública (ISP), Vigilancia de carbapenemasas en bacterias que pueden producir Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), Chile 2014-2017. Vol 8, No.8, Agosto 2018.

Ji Y, Wang P, Xu T, Zhou Y, Chen R, Zhu H and Zhou K. (2021). Development of a One-Step Multiplex PCR Assay for Differential Detection of Four species (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter roggenkampii*, and *Enterobacter kobei*) Belonging to Enterobacter cloacae Complex With Clinical Significance. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:677089. doi: 10.3389/fcimb.2021.677089

Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., ... & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of basic microbiology*, 61(12), 1049-1070.

Johnston, E. L., Zavan, L., Bitto, N. J., Petrovski, S., Hill, A. F., & Kaparakis-Liaskos, M. (2023). Planktonic and Biofilm-Derived *Pseudomonas aeruginosa* Outer Membrane Facilitate Horizontal Gene Transfer of Plasmid DNA. *Microbiology Spectrum*, 11(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.05179-22>

Jousset, A. B., Oueslati, S., Bernabeu, S., Takissian, J., Creton, E., Vogel, A., Sauvadet, A., Cotellon, G., Gauthier, L., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2019). False-Positive Carbapenem-

Hydrolyzing Confirmatory Tests Due to ACT-28, a Chromosomally Encoded AmpC with Weak Carbapenemase Activity from *Enterobacter kobei*. <https://doi.org/10.1128/AAC>

jrober84. (2020, Julio, 13). *plasmid sequence categorized as chromosome* [Comentario en un foro]. phac-nml/mob-suite. <https://github.com/phac-nml/mob-suite/issues/60>

Lewinson, O., Adler, J., Poelarends, G. J., Mazurkiewicz, P., Driessen, A. J., & Bibi, E. (2003). The Escherichia coli multidrug transporter MdfA catalyzes both electrogenic and electroneutral transport reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1667-1672.

Li, W., Zhang, J., Fu, Y., Wang, J., Liu, L., Long, W., ... & Zhang, X. (2024). In vitro and in vivo activity of ceftazidime/avibactam and aztreonam alone or in combination against mcr-9, serine-and metallo- $\beta$ -lactamases-co-producing carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 43(7), 1309-1318.

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.

Liu, S., Fang, R., Zhang, Y., Chen, L., Huang, N., Yu, K., ... & Zhou, T. (2021). Characterization of resistance mechanisms of *Enterobacter cloacae* Complex co-resistant to carbapenem and colistin. *BMC microbiology*, 21(1), 1-10. (a)

Liu, S., Huang, N., Zhou, C., Lin, Y., Zhang, Y., Wang, L., Zheng, X., Zhou, T., & Wang, Z. (2021). Molecular Mechanisms and Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* Complex Isolated from Chinese Patients During 2004-2018. *Infection and drug resistance*, 14, 3647–3658. <https://doi.org/10.2147/IDR.S327595> (b)

Liu S, Chen L, Wang L, Zhou B, Ye D, Zheng X, Lin Y, Zeng W, Zhou T and Ye J. (2022). Cluster Differences in Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, Mobility, and Virulence of Clinical *Enterobacter cloacae* Complex. *Front. Microbiol.* 13:814831. doi: 10.3389/fmicb.2022.814831 (a)

Liu, G., Thomsen, L. E., & Olsen, J. E. (2022). Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: A

mini-review. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 556–567. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab450> (b)

Manandhar, S., Nguyen, Q., Nguyen Thi Nguyen, T., Pham, D. T., Rabaa, M. A., Dongol, S., ... & Karkey, A. (2022). Genomic epidemiology, antimicrobial resistance and virulence factors of *Enterobacter cloacae* complex causing potential community-onset bloodstream infections in a tertiary care hospital of Nepal. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 4(3), dlac050.

Mauri, C., Maraolo, A. E., Di Bella, S., Luzzaro, F., & Principe, L. (2021). The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases. *Antibiotics*, 10(8), 1012. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10081012>

Medeiros, A. A., & Hare, R. S. (1986).  $\beta$ -Lactamase-mediated resistance to penems and carbapenems amongst Enterobacteriaceae, abstr. 116. 26th Intersci. In Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic advances in infectious disease*, 3(1), 15-21.

Mezzatesta, M. L., Gona, F., & Stefani, S. (2012). *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future microbiology*, 7(7), 887–902. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.61>

Morrison, L., & Zembower, T. R. (2020). Antimicrobial Resistance. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*.  
doi:10.1016/j.giec.2020.06.00

Mustafa, A., Ibrahim, M., Rasheed, M. A., Kanwal, S., Hussain, A., Sami, A., ... & Bo, Z. (2020). Genome-wide Analysis of Four *Enterobacter cloacae* complex type strains: Insights into Virulence and Niche Adaptation. *Scientific reports*, 10(1), 8150.

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)

Nordmann, P., Mariotte, S., Naas, T., Labia, R., & Nicolas, M. H. (1993). Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(5), 939-946.

O'Neill, J. (2016). Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.

Organización Mundial de la Salud. (21 de noviembre de 2023). Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Pérez, A. I., García, P. C., Poggi, H. M., Braun, S. J., Castillo, C. V, Carlos Román, J., Lagos, M., Romeo, E. O., Porte, L. T., Labarca, J. L., & González, G. R. (2008). Presencia de metalo-β-lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem Presence of metallo β-lactamases in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. In *Rev Méd Chile* (Vol. 136).

Pires, J., Novais, A., & Peixe, L. (2013). Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *Journal of clinical microbiology*, 51(12), 4281-4283.

Quezada-Aguiluz, M., Opazo-Capurro, A., Lincopan, N., Esposito, F., Fuga, B., Mella-Montecino, S., Riedel, G., Lima, C., Bello-Toledo, H., Cifuentes, M., Silva-Ojeda, F., Barrera, B., Hormazabal, J. & González-Rocha, G. (2022). Novel megaplasmid driving NDM-1-mediated carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* ST1588 in South America. *Antibiotics*, 11(9), 1207.

Richter M, Rosselló-Móra R, Glöckner FO, and Peplies J. (2015). JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*. 2015 Nov 16. pii: btv681

Robertson J, N. J. (n.d.). MOB-Suite: Software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. In GitHub repository. GitHub. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>

Schechner, V., Straus-Robinson, K., Schwartz, D., Pfeffer, I., Tarabeia, J., Moskovich, R., Chmelnitsky, I., Schwaber, M. J., Carmeli, Y., &

Navon-Venezia, S. (2009). Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(10), 3261–3265. <https://doi.org/10.1128/JCM.02368-08>

Seral, C., Gude, M. J., & Castillo, F. J. (2012). Emergencia de  $\beta$ -lactamasas AmpC plasmídicas (pAmpC ó cefamicinasas): origen, importancia, detección y alternativas terapéuticas. *Revista española de quimioterapia*, 25(2).

Tijet, N., Andres, P., Chung, C., Lucero, C., Low, D. E., Galas, M., ... & Melano, R. G. (2011). rmtD2, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in Enterobacteriaceae isolates from Argentina for more than a decade. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(2), 904-909.

T, S. (2016). MLST: Scan contig files against PubMLST typing schemes. <https://github.com/tseemann/mlst>

Tiwari, V. (2018). Post-translational modification of ESKAPE pathogens as a potential target in drug discovery. *Drug Discovery Today*.

Tobes, R., & Pareja, E. (2006). Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for Insertion Sequence elements. *BMC genomics*, 7, 1-12.

Versalovic J, Koeuth T, Lupski R (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res. Oxford University Press*; 19(24):6823– 31

Viau, R. A., Kiedrowski, L. M., Kreiswirth, B. N., Adams, M., Perez, F., Marchaim, D., ... & Bonomo, R. A. (2017). A comparison of molecular typing methods applied to *Enterobacter cloacae* complex: hsp60 sequencing, Rep-PCR, and MLST. *Pathogens & immunity*, 2(1), 23.

Wailan, A. M., Sidjabat, H. E., Yam, W. K., Alikhan, N. F., Petty, N. K., Sartor, A. L., Williamson, D. A., Forde, B. M., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., Walsh, T. R., & Partridge, S. R. (2016). Mechanisms involved in acquisition of *bla*<sub>NDM</sub> genes by IncA/C2 and IncFIIY plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7),4082– 4088. <https://doi.org/10.1128/AAC.00368-16>

WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and

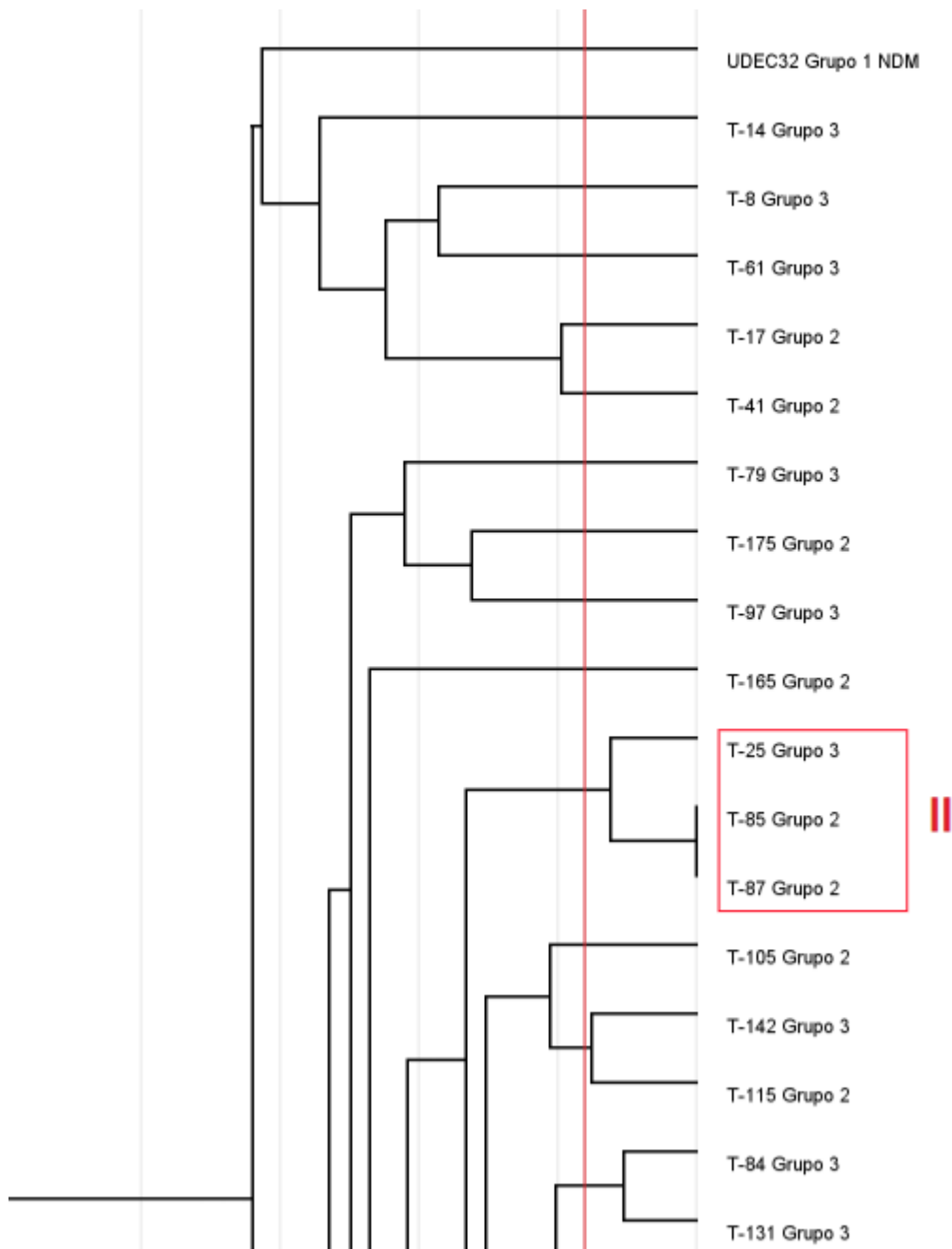
strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Zhang, X., Yan, S., Chen, J., Tyagi, R. D., & Li, J. (2020). Physical, chemical, and biological impact (hazard) of hospital wastewater on environment: presence of pharmaceuticals, pathogens, and antibiotic-resistance genes. In *Current developments in biotechnology and bioengineering* (pp. 79-102). *Elsevier*.

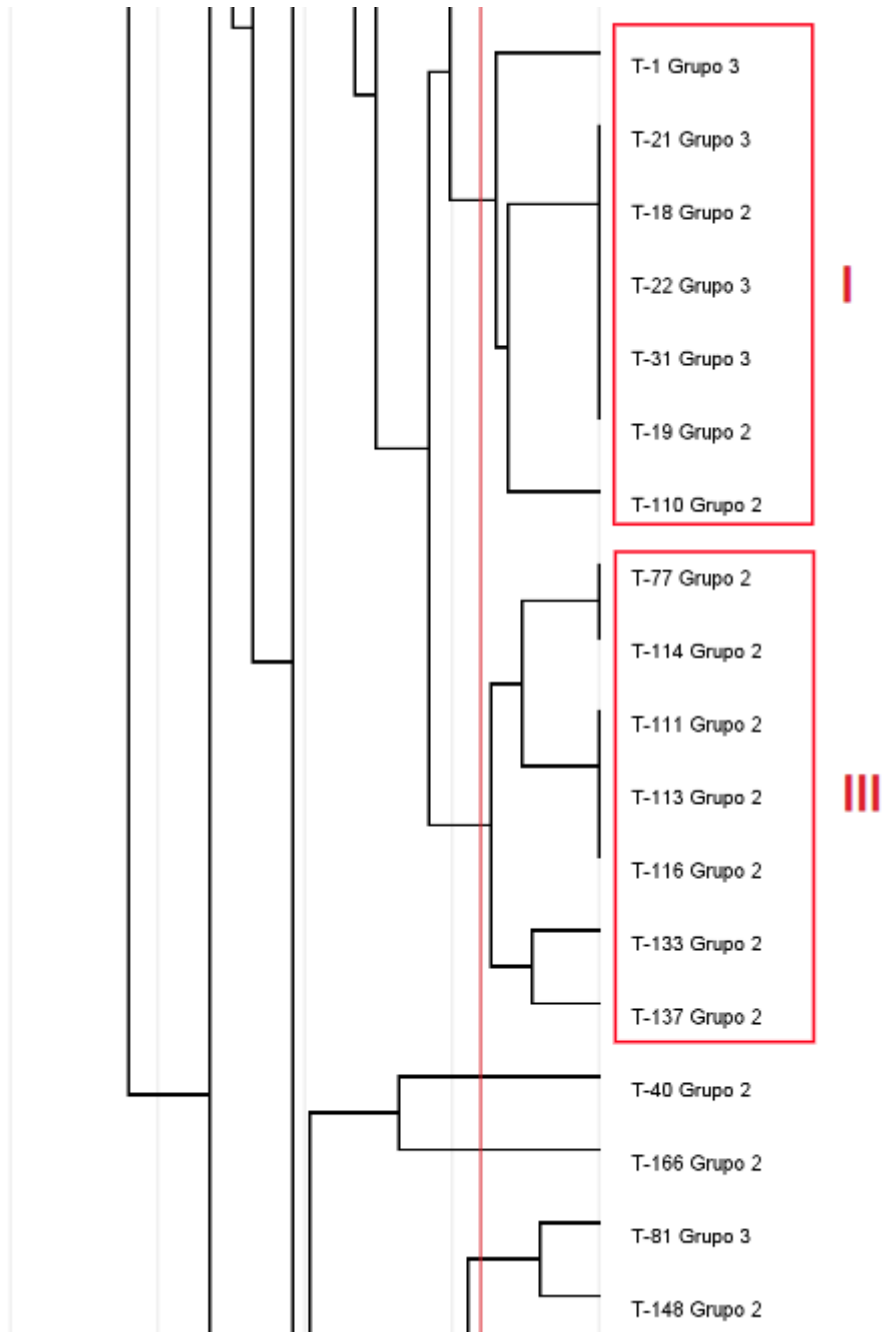
Zhang, P., Jiang, D., Wang, Y., Yao, X., Luo, Y., & Yang, Z. (2021). Comparison of de novo assembly strategies for bacterial genomes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(14), 7668.

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000), "A greedy algorithm for aligning DNA sequences", *J Comput Biol* 2000; 7(1-2):203-14.

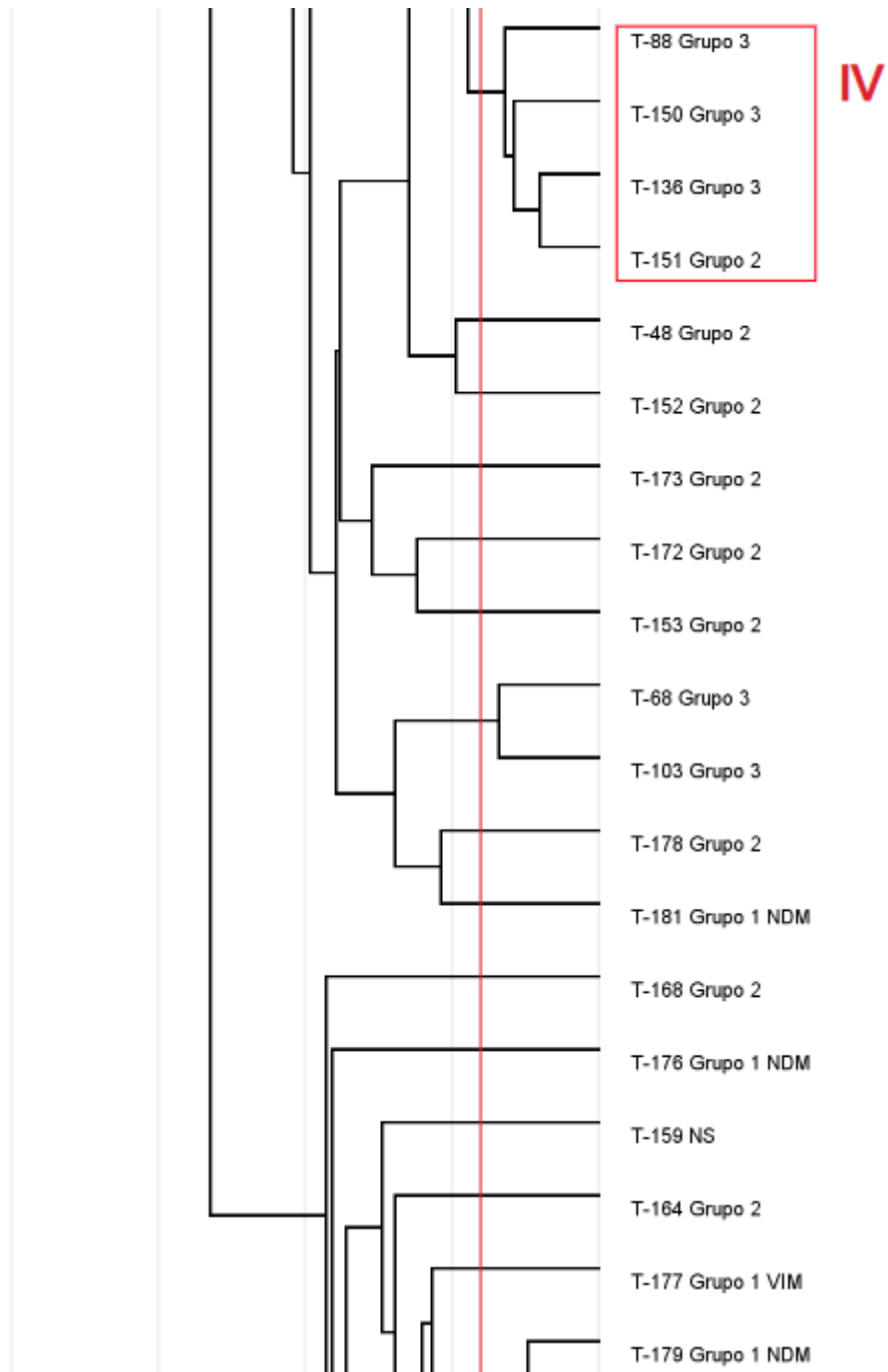
## 10. ANEXOS



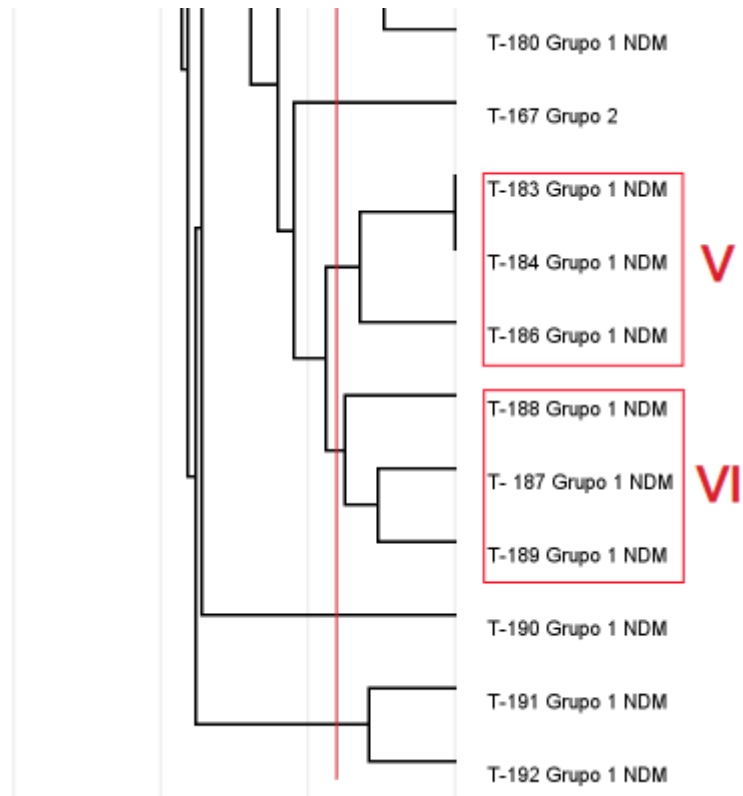
Anexo 1. Dendrograma ampliado N°1.



Anexo 2. Dendrograma ampliado N°2.



Anexo 3. Dendrograma ampliado N°3.



Anexo 4. Dendrograma ampliado N°4.