



Universidad de Concepción  
Facultad de Ciencias Biológicas

**CARACTERIZACIÓN DEL COMPLEJO *Citrobacter*  
*freundii* EN CHILE: MECANISMOS DE RESISTENCIA A  
CARBAPENÉMICOS Y EPIDEMIOLOGÍA**

POR ISIDORA FRANCISCA MANRIQUEZ CUADRA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción  
para optar al grado académico de Magister en Bioquímica y Bioinformática

**Profesor Guía**

Andrés Opazo-Capurro  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

**Profesor co-Guía**

Gerardo González-Rocha  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

14 de julio, 2025

Concepción, Chile

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

**Dedicado a**  
*Mis padres, Cecilia y  
Enrique, y a mi  
hermano Sebastián.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas, al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y a los directores del programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática, por darme la oportunidad de formar parte de este postgrado, que, si bien no fue fácil, logré superar el desafío con determinación y orgullo.

También agradezco profundamente a mi laboratorio, el Laboratorio de Investigación de Agentes Antibacterianos (LIAA) por poder formar parte de este gran equipo. A mis tutores, Dr. Andrés Opazo Capurro y Dr. Gerardo González-Rocha por el cariño, la preocupación y la dedicación. Estar en este laboratorio logró cambiar mi perspectiva y motivación con respecto a la ciencia y la investigación, y también la difusión. Además, agradecer a mis compañeros de laboratorio, Victoria, Claudia, Maximiliano, Pablo, Tamara, Cristóbal, todos, por mantener el ambiente grato y motivante para trabajar, y también por el cariño, los consejos, el apoyo y la ayuda cuando fue necesario. Formar parte del LIAA hizo que todo este proceso fuera muy ameno y tranquilo, y también fueron un “parche curita” para mi corazón.

Agradezco también a mi familia, que sin ellos no habría sido posible llegar a esta instancia, con su apoyo constante, su comprensión y su cariño, y a mis amigos,

Michelle, Francisca, Paulina, Fabián, Bastián, Francisco, José, Camila, y a todos, por su compañía y apoyo constante, que también sin ellos no habría sido posible llegar a esta instancia. Finalmente agradezco a mis compañeros de magister, que ha sido un agrado conocerlos y compartir y tener con quién sobrevivir a los ramos del magister.

## TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>1. Resistencia a los antibióticos .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Complejo <i>Citrobacter freundii</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Carbapenemasas .....</b>	<b>7</b>
<b>4. Distribución global de carbapenemasas del complejo <i>C. freundii</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>5. Herramientas bioinformáticas para el estudio de bacterias resistentes ....</b>	<b>14</b>
<b>6. Epidemiología molecular del complejo <i>C. freundii</i> productoras de carbapenemasas.....</b>	<b>20</b>
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVOS.....	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
<b>1. Cepas bacterianas .....</b>	<b>27</b>
<b>2. Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos e identificar los genes de carbapenemasas en cepas del complejo <i>C. freundii</i> aisladas en hospitales de Chile .....</b>	<b>28</b>
2.1 <i>Caracterización microscópica:</i> .....	28
2.2 <i>Perfil bioquímico .....</i>	29
2.3 <i>Extracción de ADN bacteriano .....</i>	30
2.4 <i>Relación genética de las cepas mediante ERIC-PCR.....</i>	31
2.5 <i>Perfil de susceptibilidad antibiótica.....</i>	33
2.6 <i>Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas .....</i>	34
2.7 <i>Identificación rápida de las familias de carbapenemasas mediante inmunocromatografía. ....</i>	35
2.8 <i>Detección molecular de carbapenemasas mediante PCR.....</i>	35

2.9	<i>Pruebas de susceptibilidad a tigeciclina y colistín</i> .....	37
2.10	<i>Secuenciación de genomas completos (whole genome sequencing) de las cepas en estudio.</i> .....	38
2.11	<i>Ensamble de secuencias de genomas completos de las cepas del complejo C. freundii.</i> .....	39
2.12	<i>Identificación bacteriana</i> .....	41
2.13	<i>Anotación de genes</i> .....	42
2.14	<i>Identificación de genes de resistencia</i> .....	43
<b>3. Determinar la epidemiología molecular de las cepas del complejo <i>Citrobacter freundii</i> resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos</b> .....		<b>44</b>
3.1	<i>Determinación de secuenciotipos (STs)</i> .....	44
3.2	<i>Alineamiento del core-genome</i> .....	45
3.3	<i>Construcción de árbol filogenético</i> .....	46
<b>RESULTADOS</b> .....		<b>48</b>
<b>1. Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos e identificar los genes de carbapenemasas en cepas del complejo <i>Citrobacter freundii</i> aisladas en hospitales de Chile</b> .....		<b>48</b>
1.2	<i>Caracterización microscópica y perfil bioquímico</i> .....	48
1.3	<i>Relación genética mediante ERIC-PCR</i> .....	50
1.4	<i>Perfiles de susceptibilidad antibiótica</i> .....	52
1.5	<i>Prueba Blue Carba para identificación de carbapenemasas</i> .....	56
1.6	<i>Detección rápida de carbapenemasas mediante inmunocromatografía</i> .....	57
1.7	<i>Detección molecular de carbapenemasas mediante PCR</i> .....	59
1.8	<i>Pruebas de susceptibilidad a tigeciclina y colistín</i> .....	61
1.9	<i>Control de calidad de ensamblajes de genomas completos de las cepas del complejo C. freundii</i> .....	62
1.10	<i>Identificación bacteriana</i> .....	66
1.11	<i>Anotación de genes</i> .....	67
1.12	<i>Identificación de genes de resistencia</i> .....	71
<b>2. Determinar la epidemiología molecular de las cepas del complejo <i>Citrobacter freundii</i> resistentes a carbapenémicos, aisladas en hospitales de Chile</b>		<b>74</b>
2.1	<i>Determinación de secuenciotipos (STs)</i> .....	74

2.2	<i>Alineamiento del core-genome</i> .....	75
2.3	<i>Construcción de árbol filogenético</i> .....	77
	DISCUSIÓN .....	81
	CONCLUSIÓN .....	93
	BIBLIOGRAFÍA.....	95
	ANEXOS.....	129

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Lista de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, 2024.....	3
<b>Figura 2.</b> Distribución global de <i>Citrobacter</i> spp. carbapenemasas positivas ..	13
<b>Figura 3.</b> Caracterización microscópica del complejo <i>Citrobacter freundii</i> mediante tinción de Gram.....	49
<b>Figura 4.</b> Análisis de clonalidad mediante ERIC-PCR .....	51
<b>Figura 5.</b> Perfil de susceptibilidad a antibióticos de cepas del complejo <i>Citrobacter freundii</i> .....	53
<b>Figura 6.</b> Detección de genes que codifican carbapenemasas mediante PCR convencional .....	60
<b>Figura 7.</b> Árbol filogenético basado en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).....	80

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Listado de primers utilizados para ensayos moleculares.....	32
<b>Tabla 2.</b> Listado de antibióticos utilizados para determinar el perfil de susceptibilidad. ....	33
<b>Tabla 3.</b> Características Bioquímicas de cepas del complejo <i>Citrobacter freundii</i> utilizadas en este estudio.....	49
<b>Tabla 4.</b> Detección de actividad enzimática de carbapenemasas por Blue Carba en 27 cepas del complejo <i>C. freundii</i> .....	57
<b>Tabla 5.</b> Detección de carbapenemasas mediante NG-test CARBA® .....	58
<b>Tabla 6.</b> Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para colistín y tigeciclina .....	61
<b>Tabla 7.</b> Reporte de calidad de ensamblados obtenido con la herramienta QUAST .....	63
<b>Tabla 8.</b> Evaluación de completitud genómica mediante BUSCO .....	65
<b>Tabla 9.</b> Anotación funcional de genes con Bakta .....	69
<b>Tabla 10.</b> Genes de resistencia a antibióticos identificados en complejo <i>Citrobacter freundii</i> mediante ABRicate. ....	72
<b>Tabla 11.</b> Determinación de ST utilizando el esquema MLST de <i>C. freundii</i> basada en genes housekeeping .....	75
<b>Tabla 12.</b> Distribución de genes en el pangenoma de genomas del complejo <i>C. freundii</i> .....	76

## RESUMEN

La resistencia a antibióticos (RA) es un desafío global, y el complejo *Citrobacter freundii* contribuye a ello, ya que emergen como un patógeno clínico grave debido a su capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, incluidos los carbapenémicos. En Chile, la emergencia de cepas productoras de carbapenemasas de *C. freundii* y la falta de datos epidemiológicos sobre estas generan una brecha en el conocimiento necesario para implementar medidas de control efectivas. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar la epidemiología molecular de las cepas del complejo *C. freundii* aisladas en hospitales chilenos, así como identificar las carbapenemasas que estas producen. De los resultados obtenidos, 9 de las 27 cepas analizadas presentaron resistencia a carbapenémicos, siendo identificados los genes de carbapenemasas *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>*. Además, el análisis de los secuenciotipos (STs) reveló que el *ST22* es altamente prevalente, y destaca como un clon de alto riesgo, lo que subraya la importancia de su vigilancia. Estos hallazgos subrayan la importancia de la vigilancia epidemiológica para monitorizar la diseminación y evolución de las cepas y perfiles de resistencia, lo cual es crucial para mejorar las estrategias de control y vigilancia de estas.

## ABSTRACT

Antibiotic resistance (AR) is a global challenge, and strains of the *Citrobacter freundii* complex contribute to this, emerging as a serious clinical pathogen due to their ability to develop resistance to multiple antibiotics, including carbapenems. In Chile, the emergence of carbapenemase-producing *C. freundii* and the lack of epidemiological data on these strains create a gap in the necessary knowledge to implement effective control measures. For this reason, the aim of this study was to determine the molecular epidemiology of *C. freundii* strains isolated from Chilean hospitals, as well as to identify the carbapenemases they produce. From the results obtained, 9 out of 27 analyzed strains were resistant to carbapenems, with the carbapenemase genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, and *bla<sub>VIM</sub>* identified. Additionally, the analysis of sequence types (STs) revealed that ST22 is highly prevalent, and stands out as a high-risk clone, highlighting the importance of its surveillance. These findings underscore the importance of epidemiological surveillance to monitor the spread and evolution of strains and resistance profiles, which is crucial for improving control and surveillance strategies for hospital-acquired infections.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Resistencia a los antibióticos

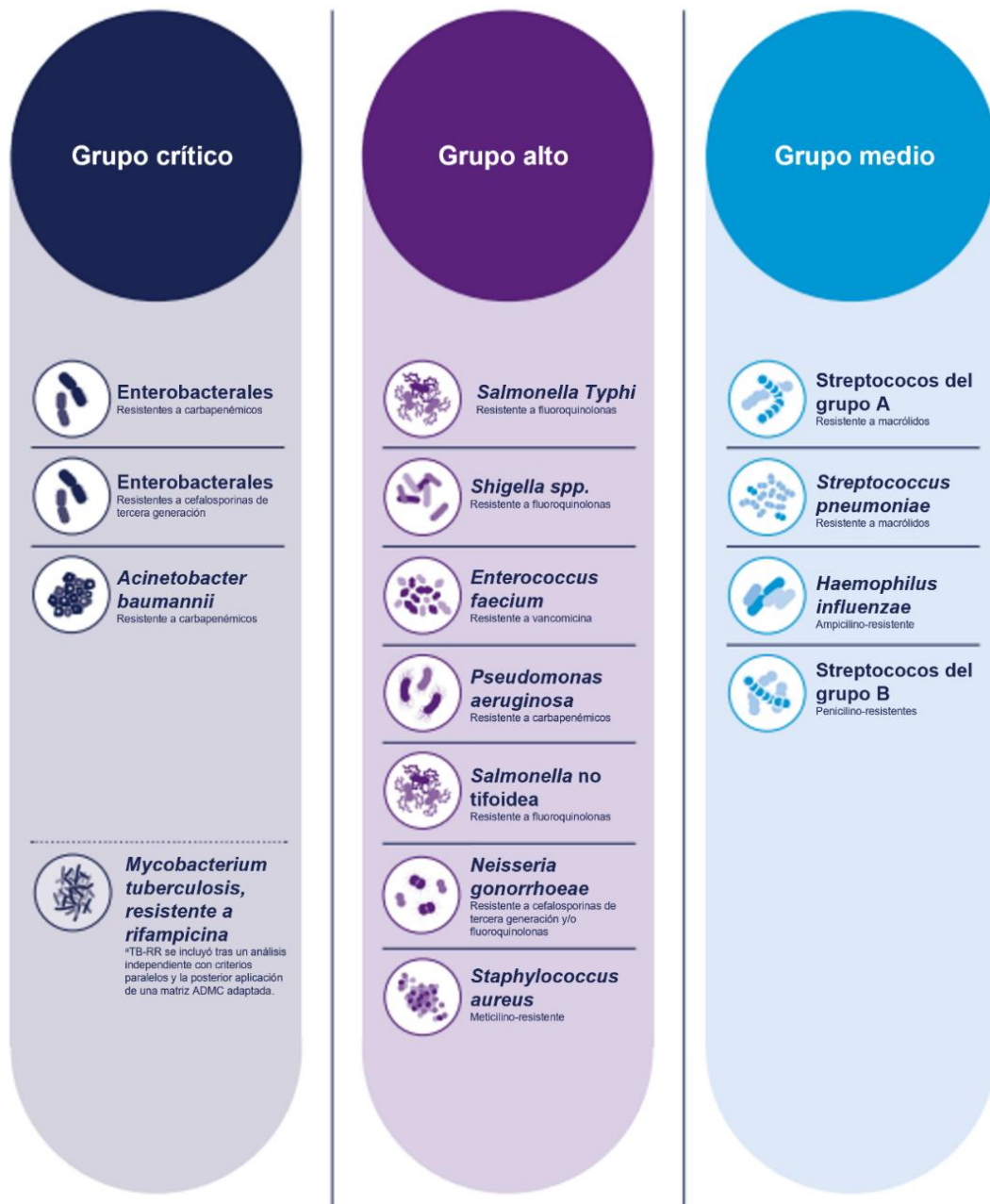
En las últimas décadas, la diseminación de bacterias multirresistentes ha sido considerada como una de las mayores preocupaciones de la salud a nivel mundial, principalmente asociada a bacterias Gram negativas. Este grupo de bacterias es de suma importancia clínica, ya que pueden causar infecciones graves y complejas de tratar, las que son cada vez más resistentes a los distintos tipos de antibióticos (Chinemerem Nwobodo et al., 2022).

Además de la implicancia que tiene la resistencia antibiótica en el ámbito clínico, este hecho tiene un alto impacto en la salud y la economía de los países, donde se ha evidenciado un aumento en los costos de la atención médica y tratamientos,

debido al uso de antibióticos de mayor costo y por un tiempo prolongado (François et al., 2016; Judd et al., 2016; Puchter et al., 2018; Thaden et al., 2017; Zhen et al., 2017, 2017). Asimismo, ha llevado a un aumento en los tiempos de hospitalización, y también en la morbilidad y la mortalidad, lo cual compromete la calidad de vida y productividad laboral, proyectando un total de 10 millones de muertes anuales al 2050, de no establecer medidas que mitiguen el avance de la resistencia (Mendoza Brito, 2015; Murray et al., 2022). Con respecto al impacto directo en la economía, el banco mundial estima una reducción de 1.1% del producto interno bruto (PIB) mundial, y un aumento en el costo de vida a 3,4 trillones de dólares al 2030, si no se toman medidas inmediatas (Barrantes Jiménez et al., 2022; Poudel et al., 2023; Roope et al., 2019).

Es así como la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos bacterianos prioritarios multirresistentes, siendo la última actualización el 2024, donde indica los patógenos considerados como una amenaza para la salud pública debido a la falta de tratamientos efectivos para infecciones causadas por estas bacterias (Figura 1) (WHO, 2024). Dentro de esta lista, destacan diversas especies en el grupo de “patógenos de prioridad crítica”, en donde se encuentran especies del orden *Enterobacterales* resistentes a

carbapenémicos y productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEEs) (WHO, 2017).



**Figura 1.** Lista de patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, 2024. Extraído de WHO (2024) (<https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>)

Las especies del orden *Enterobacterales* corresponden a bacterias Gram negativas que se pueden encontrar en diversos nichos ecológicos, incluyendo insectos, animales y humanos (Adeolu et al., 2016; Doern, 2024). Muchos de los grupos que conforman esta familia tienen relevancia clínica en humanos, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica* y *Citrobacter* spp., las cuales son responsables de una amplia gama de infecciones, que abarcan desde infecciones del tracto urinario (ITUs) hasta infecciones respiratorias (Adeolu et al., 2016; Chow et al., 1994). En este contexto, el género *Citrobacter* spp. destaca como un agente emergente de interés clínico debido a su capacidad de provocar infecciones oportunistas en humanos, asociada normalmente a elevados perfiles de resistencia a los antibióticos (Pepperell et al., 2002).

## **2. Complejo *Citrobacter freundii***

*Citrobacter* corresponde a un género de bacterias Gram negativas compuesto por diversas especies, siendo *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri* y *Citrobacter portucalensis* las más comunes en el ámbito clínico, las cuales se agrupan dentro

del complejo *Citrobacter freundii* (Brenner et al., 1993; G. Zhang et al., 2023). Estas son bacterias anaeróbicas facultativas, no productoras de cápsula, que se pueden encontrar comúnmente en agua, suelo, alimentos y el tracto intestinal de animales y humanos (Arens & Verbist, 1997; Ranjan & Ranjan, 2013) y se caracterizan por utilizar citrato y/o malonato como fuente de carbono y fermentar lactosa (Lipsky et al., 1980). Si bien representan una menor prevalencia en infecciones humanas en comparación con otras del orden *Enterobacterales*, como *E. coli* y *K. pneumoniae*, diversos estudios las identifican entre los tres patógenos urinarios más comunes. Además, en la actualidad se consideran patógenos intrahospitalarios multirresistentes relevantes (Majewski et al., 2017; Pepperell et al., 2002).

En concordancia con lo anterior, se ha documentado que las especies del complejo *C. freundii* pueden causar una variedad de infecciones, entre las que destacan las ITUs. Estas han sido asociadas a procedimientos hospitalarios invasivos, como cateterismo urinario o el uso de instrumentación genitourinaria, las cuales favorecen la colonización e infección del tracto urinario (Metri et al., 2013; Mohanty et al., 2007). Debido a esto, se han establecido diversas estrategias para tratar las infecciones causadas por cepas bacterianas pertenecientes a estas especies, donde se ha logrado determinar que poseen una

alta capacidad para desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, como por ejemplo a quinolonas, aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos, lo cual limita las opciones terapéuticas (L. Liu et al., 2017, 2018). Dentro de los  $\beta$ -lactámicos, la resistencia a carbapenémicos representa un problema de salud pública a nivel global, ya que estos constituyen una de las últimas líneas terapéuticas disponibles para el tratamiento de infecciones graves causadas por bacterias multirresistentes. Los carbapenémicos destacan por su amplio espectro, elevada eficacia clínica y bajos niveles de toxicidad en comparación con otros antibióticos (Meletis, 2016; R. Zhang et al., 2008). Debido al aumento de la resistencia a estos compuestos y su impacto en las infecciones intrahospitalarias, diversas especies bacterianas pertenecientes al orden *Enterobacterales*, como el complejo *C. freundii*, han sido incluidas en el grupo crítico de la lista de patógenos prioritarios de la OMS (*Enterobacterales* resistentes a carbapenémicos, Figura 1), lo que destaca su relevancia clínica (WHO, 2024).

### 3. Carbapenemasas

La resistencia a carbapenémicos en *Enterobacterales* se asocia a diversos mecanismos, siendo el principal la producción de carbapenemasas, enzimas pertenecientes a la familia de las  $\beta$ -lactamasas, capaces de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico de antibióticos carbapenémicos, tales como ertapenem, doripenem, imipenem y meropenem (Chi et al., 2020; Wang et al., 2022). Estas enzimas presentan una gran versatilidad hidrolítica, la cual se basa en su estructura y función. Debido a esto, las carbapenemasas se clasifican en 4 clases moleculares: A, B, C y D (Bush et al., 1995; Queenan & Bush, 2007).

Las carbapenemasas de clase A se caracterizan por tener un residuo de serina en su sitio activo, lo cual les confiere su propiedad hidrolítica, en donde los genes que codifican para estas enzimas se localizan comúnmente asociados a elementos genéticos móviles (EGMs), tales como plásmidos, lo cual facilita su diseminación y transferencia a otras bacterias (García-Betancur et al., 2021). De esta clase, destacan las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC, del

inglés *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), las que son clínicamente relevantes debido a su alta capacidad de diseminación, donde se ha reportado una tasa de mortalidad de un 75% en infecciones causadas por aislados productores de KPC (Brescini et al., 2019).

Con respecto a las carbapenemasas de clase B, o metalo- $\beta$ -lactamasas (MBL), estas dependen de iones  $Zn^{2+}$  en su sitio catalítico, y son inhibidas *in vitro* por agentes quelantes de zinc, tales como EDTA , y también por ciertos antibióticos como aztreonam (García-Betancur et al., 2021). Por otro lado, en el contexto clínico, estas se caracterizan por hidrolizar varios tipos de antibióticos, tales como carbapenémicos, cefalosporinas y penicilinas, lo cual implica una limitación para los tratamientos de infecciones causadas por aislados productores de MBL (Felici et al., 1993; Krco et al., 2023). Estas enzimas son clasificadas en 3 subgrupos, según su secuencia aminoacídica, los ligandos que se pueden unir a su sitio activo y su capacidad hidrolítica (Galleni et al., 2001; Queenan & Bush, 2007). En este sentido, el grupo B1 tiene una capacidad hidrolítica más amplia, siendo capaz de inhibir el efecto de penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, mientras que la subclase B2, si bien presenta una estructura similar del sitio activo, tiene menor capacidad hidrolítica sobre los carbapenémicos. Con respecto al subgrupo B3, su capacidad hidrolítica es limitada con respecto a

carbapenémicos, y también presentan muy baja actividad sobre penicilinas y cefalosporinas (Karsisiotis et al., 2014).

Dentro de estas subclases destacan las MBL de las familias NDM, IMP y VIM, las cuales se han identificado principalmente en bacterias Gram negativas de importancia clínica, tales como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y la *Enterobacterales*, principalmente en *K. pneumoniae* (Carrasco-Anabalón et al., 2019; Chi et al., 2020; Doi et al., 2014; Elena et al., 2024; Roschanski et al., 2017). Su rápida diseminación mundial, desde regiones específicas como Italia, Japón e India, es una amenaza a nivel global, ya que ha complicado severamente el tratamiento de infecciones por estos patógenos multirresistentes, aumentando la morbimortalidad y los costos asociados (García-Betancur et al., 2021; Lowe et al., 2020; Queenan & Bush, 2007; Roschanski et al., 2017; Wei et al., 2015).

Las carbapenemasas de clase D u oxacilinasas (OXA), se encuentran entre las primeras  $\beta$ -lactamasas detectadas. El nombre designado (oxacilinasas) es debido a su capacidad para hidrolizar isoxazolilpenicilinas, tales como oxacilina,

metilina y cloxacilina, pero también presentan la capacidad de actuar contra otros grupos como carbapenémicos o cefalosporinas (Evans & Amyes, 2014; Hammoudi Halat & Ayoub Moubareck, 2020; Queenan & Bush, 2007). Su mecanismo de acción, al igual que las carbapenemasas de clase A y C, es mediante una serina en su sitio activo (Jeon et al., 2015). Dentro de las carbapenemasas clase D, los grupos OXA-23 y OXA-58 se han identificado principalmente en *Acinetobacter spp.*, mientras que las del grupo OXA-48 son más frecuentes en especies de Enterobacterales como *E. coli* y el complejo *Citrobacter freundii* (Galan-Sanchez et al., 2012; García-Betancur et al., 2021).

Considerando que existen 4 clases distintas de carbapenemasas que actúan sobre una amplia gama de antibióticos  $\beta$ -lactámicos, es de suma importancia estudiar qué tipo de carbapenemasas se encuentra presente en las cepas de interés, ya que limita severamente las opciones terapéuticas (Íñigo & Pozo, 2022; Morrill et al., 2015).

Cabe destacar que en la actualidad existen diversos reportes demostrando que los genes que codifican para carbapenemasas, tales como KPC, NDM y OXA, se

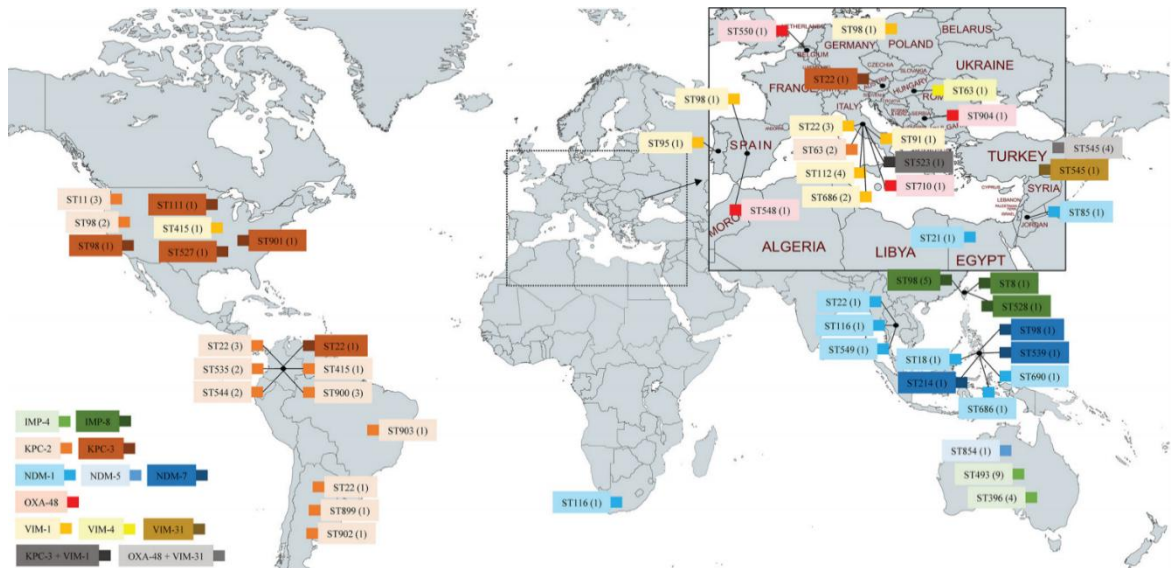
encuentran en EGMs, como por ejemplo plásmidos, integrones o transposones, que pueden ser transferidos mediante transferencia horizontal de genes desde bacterias resistentes a bacterias susceptibles (Acman et al., 2022; Hardiman et al., 2016; Ramsamy et al., 2022). Además, estos EGMs pueden portar más de un solo gen, por lo cual pueden conferir resistencia a más de un antibiótico, además de carbapenémicos (Doi et al., 2014; Yamada et al., 2022). Sumado a esto, la globalización, los viajes al internacionales, el transporte rápido, la transmisión en entornos hospitalarios y el uso inapropiado de antibióticos, influyen directamente en la propagación de estas, lo cual representa un grave problema en la salud pública (Salam et al., 2023; Theriault et al., 2021).

#### **4. Distribución global de carbapenemasas del complejo *C. freundii***

En el año 2023 se publicó un primer reporte sobre la epidemiología molecular de cepas de *Citrobacter* spp. productoras de carbapenemasas a nivel mundial aisladas entre 2015 y 2017 (Figura 2), en donde se reportan 86 cepas productoras de carbapenemasas, principalmente de las especies *C. freundii* y *C. portucalensis*

(Nobrega et al., 2023). En este trabajo, mediante secuenciación de genomas completos, se determinaron los distintos secuenciotipos (STs) dominantes asociados a genes de carbapenemasas, como por ejemplo enzimas *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>OXA-48</sub>, destacando los ST98, ST22, ST493 y ST545 (Nobrega et al., 2023).

Por otro lado, estudios similares reportan la presencia de genes de carbapenemasas en aislados del complejo *C. freundii* en distintos países, tales como Italia, Corea, Alemania, España, Finlandia y Estados Unidos, donde destaca la producción de *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> y MBLs entre los años 2000 y 2023, recalcando la prevalencia y la propagación de estos genes alrededor del mundo, así como también la emergencia de este complejo a nivel global (Arana et al., 2017; Gaibani et al., 2013; Lee et al., 2005; Yao et al., 2021).



**Figura 2.** Distribución global de *Citrobacter* spp. carbapenemasas positivas. Extraído de Nobrega et al. (2023)

Como se puede observar en la Figura 2, si bien incluye data de distintos países de América, no se incluyen cepas productoras de carbapenemasa de Chile (Nobrega et al., 2023). En este sentido, el Boletín de Vigilancia de carbapenemasas en bacterias aisladas desde infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), publicado en 2018 por el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP), confirma la presencia de cepas de *Citrobacter* spp. productoras de carbapenemasas en hospitales de Chile, principalmente recuperadas desde muestras de hisopado rectal (vigilancia) y de orina (ISP, 2018). Sin embargo, tanto en el boletín de resistencia antimicrobiana como el de vigilancia de laboratorio para carbapenemasas del 2022 del ISP, no se menciona a *Citrobacter* spp. como un patógeno de vigilancia prioritaria, a pesar de que sí es reportado también en el

informe de vigilancia de IAAS del Ministerio de Salud (MINSAL), publicado en el año 2020 (ISP, 2022, 2023; MINSAL, 2020). Estos informes mencionados reflejan una notable brecha de información en cuanto a la resistencia a carbapenémicos en cepas del complejo *C. freundii* en Chile, donde si bien se reportan datos de distintas especies de *Enterobacterales*, la ausencia de datos específicos sobre *Citrobacter* spp. en los boletines de resistencia antimicrobiana y vigilancia de laboratorio para carbapenemasas sugiere una falta de atención o subrepresentación en los informes oficiales, planteando la necesidad de una mayor investigación y vigilancia de la resistencia a carbapenémicos en cepas de *Citrobacter* spp. en el país.

## **5. Herramientas bioinformáticas para el estudio de bacterias resistentes**

El avance de la bioinformática y la genómica ha revolucionado el estudio de la resistencia a los antimicrobianos, permitiendo una identificación más rápida y precisa de los genes involucrados, su transmisión y la evolución de patógenos multirresistentes (Hendriksen et al., 2019; Seoane & Bou, 2021). Gracias al

desarrollo de bases de datos y algoritmos especializados, es posible analizar grandes volúmenes de información y mejorar la vigilancia epidemiológica, lo que facilita el diseño de estrategias más eficaces para su control (Hendriksen et al., 2019; Samantray et al., 2023).

En este sentido, se han establecido técnicas fundamentales que permiten obtener, procesar y analizar información genética de un organismo, tales como la secuenciación de genomas completos (Heather & Chain, 2016). Las tecnologías de secuenciación han evolucionado significativamente y se agrupan actualmente en tres generaciones, diferenciadas por el principio de lectura, la longitud de los fragmentos obtenidos, la precisión, la profundidad y el costo (Eren et al., 2022; Satam et al., 2023). La primera generación está representada por la secuenciación Sanger, que aún se utiliza para el análisis de fragmentos específicos, como el gen ribosomal 16S rRNA. La segunda generación, también conocida como secuenciación de próxima generación (NGS), incluye plataformas como *Illumina MiSeq* y *HiSeq* (*Illumina Inc.*), que permiten obtener grandes volúmenes de datos con alta precisión y son ampliamente utilizadas en estudios de genomas completos. Por otro lado, la tercera generación, que se basa en tecnologías de *long-reads* como *SMRT sequencing* (*Single Molecular Real-Time*) de *Pacific Biosciences* (*PacBio*) y *nanopore sequencing* de *Oxford Nanopore*

*Technology* (ONT), permite lecturas largas, lo cual es especialmente útil para la reconstrucción de plásmidos y otros elementos genéticos móviles. Estas tecnologías han establecido herramientas fundamentales para la obtención, procesamiento y análisis de información genética, siendo esenciales para estudios enfocados en la identificación de genes de resistencia, diversidad genética y epidemiología molecular (Heather & Chain, 2016; Berberich et al., 2018; Dewey et al., 2012).

Para poder interpretar y extraer la información relevante de los datos obtenidos por las plataformas, es fundamental el uso de bases de datos especializadas (NCBI, 2013). Estas contienen información útil para realizar comparaciones precisas, ya que almacenan secuencias genómicas, información sobre genes, proteínas, variantes genéticas y otros datos biológicos que facilitan el análisis y la interpretación de los resultados obtenidos de la secuenciación (Papp & Solymosi, 2022). Dentro de los análisis destacan la identificación de especies, anotación de genes, identificación de genes de resistencia y análisis filogenéticos (Teufel et al., 2006). Así, las bases de datos especializadas proporcionan herramientas claves para realizar un análisis exhaustivo de los datos, permitiendo identificar relaciones evolutivas, la presencia de variantes genéticas asociadas a características específicas, y la comparación de cepas (Doyle et al., 2020). Por ejemplo,

*GenBank* ofrece un repositorio de secuencias genómicas que facilita la comparación entre diferentes especies y cepas (Benson et al., 2013). Por otro lado, *The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* es una herramienta muy útil para la alineación y comparación de secuencias, lo cual ayuda a descubrir mutaciones o variaciones genéticas relevantes (Altschul et al., 1990).

Existen también otras herramientas especializadas como *Shovill*, una pipeline diseñada para el ensamblaje rápido de genomas bacterianos a partir de lecturas de secuenciación de nueva generación con ensambladores como SPAdes o Skesa, o *Prokka*, que anota de manera rápida y precisa el genoma bacteriano, permitiendo identificar genes, secuencias regulatorias y otras características genéticas relevantes (Prjibelski et al., 2020; Seemann, 2014, 2016/2024; Souvorov et al., 2018).

Para el análisis de genes de resistencia son fundamentales las herramientas que identifican genes de resistencia a antibióticos a partir de secuencias genómicas, las cuales también utilizan diversas bases de datos especializadas, como *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)*, la base de datos de

NCBI, ResFinder, entre otras, las que proporcionan una lista detallada de los genes presentes y su relación con la resistencia a distintos antibióticos, permitiendo también conocer los mecanismos de resistencia (Alcock et al., 2020; Feldgarden et al., 2021; Florensa et al., 2022).

Como se menciona anteriormente, las herramientas bioinformáticas también juegan un rol fundamental en la epidemiología molecular, ya que permite rastrear la distribución y propagación de patógenos multirresistentes a través de poblaciones y regiones geográficas (Chen et al., 2023; Nobrega et al., 2023; Yang et al., 2024). Para lograr esto, se deben combinar herramientas bioinformáticas con el análisis filogenético y la tipificación molecular, con el fin de comprender la evolución y diseminación de patógenos resistentes (Hall & Barlow, 2006).

La tipificación molecular permite clasificar a las bacterias en linajes o clones específicos, donde una de las técnicas más empleadas es el *Multilocus Sequence Typing (MLST)*, el cual asigna un ST a cada cepa, basándose en la secuencia de un conjunto de *loci* genéticos conservados (Larsen et al., 2012). Esta técnica permite identificar la relación entre diferentes cepas de una especie, además de

determinar si las cepas resistentes a antibióticos pertenecen a un mismo ST, indicando que pueden ser clones de un mismo origen (Clermont et al., 2015; Dziri et al., 2022; L. Liu et al., 2020; Warren et al., 2000).

Además de identificar la relación entre cepas, el análisis de STs permite identificar linajes dominantes, que pueden estar asociados a clones de alto riesgo (Woodford et al., 2011; Zurita et al., 2024). Estos clones corresponden a grupos de cepas bacterianas que comparten características genéticas similares, en donde se relacionan con genotipos asociados a virulencia y resistencia a antibióticos, asociándose a brotes, en donde diversos fenómenos de variabilidad genética pueden mediar esta diseminación (Dos Santos et al., 2023; Mazumder et al., 2021; Shelenkov et al., 2023; Woodford et al., 2011)

Por otro lado, el análisis filogenético permite definir la relación genética y evolutiva entre las cepas bacterianas, y permite determinar si las cepas están relacionadas entre sí (Hillis, 1997). A través del uso de herramientas bioinformáticas como *IQ-TREE* o *MrBayes*, se puede representar de forma gráfica cómo las cepas se relacionan y cómo la resistencia se ha propagado a través de generaciones, lo

cual es esencial para comprender la dinámica de la resistencia y sus patrones de diseminación, ya que los repositorios proporcionan acceso libre y público a una gran colección de genomas provenientes de diversas partes del mundo, permitiendo que investigadores de cualquier ubicación puedan descargar y comparar secuencias genómicas para vigilancia epidemiológica (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Nguyen et al., 2015).

## **6. Epidemiología molecular del complejo *C. freundii* productoras de carbapenemasas**

Como se menciona anteriormente, la tipificación molecular ha facilitado el seguimiento de la transmisión de cepas resistentes (Larsen et al., 2012). Por ejemplo, en el estudio de Nobrega y colaboradores, se señala que la identificación de los STs está relacionada con los clones predominantes, ya que ciertas cepas que comparten un mismo ST pueden pertenecer al mismo linaje, sugiriendo una posible prevalencia de clones específicos, lo que facilita la identificación de su distribución global (Nobrega et al., 2023). De esta manera, la determinación de

los STs se convierte en una herramienta fundamental para caracterizar las cepas y diseñar estrategias eficaces de control y prevención (L. Liu et al., 2020; Nobrega et al., 2023).

En este sentido, se han identificado cerca de 22 STs dominantes del complejo *C. freundii*, resaltando principalmente el ST22, ST98 y ST19, tal como se observa en la Figura 2, los cuales están altamente distribuidos en múltiples regiones del mundo, incluyendo Europa, Asia y América, lo que sugiere una diseminación global impulsada por la movilidad de pacientes y el intercambio de material genético (Nobrega et al., 2023; Wang et al., 2022; Yao et al., 2021).

Diversos estudios han demostrado que estos clones portan genes de resistencia a carbapenémicos, por ejemplo, en el caso del ST22 se han encontrado cepas de *C. freundii* que portan *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub> y *bla*<sub>NDM-1</sub>, al igual que el ST98, en donde también se ha observado que portan EGMs tales como integrones y transposones, lo cual indica una acumulación de diferentes mecanismos de resistencia, y también una alta capacidad de diseminación y propagación (Arana et al., 2017; L. Liu et al., 2017; Sommer et al., 2024; Yao et al., 2021).

La presencia de estos determinantes genéticos, junto con su capacidad de propagación y persistencia en entornos clínicos, ha llevado a la clasificación de ciertos STs como “clones de alto riesgo” (Willems et al., 2011; Woodford et al., 2011). Esto se debe a su capacidad para persistir en entornos hospitalarios, además de causar infecciones graves y resistentes a antibióticos, así como también diseminación eficiente (Biez et al., 2023; H. Liu et al., 2024). Su elevada resistencia a antimicrobianos, impulsada por la acumulación de genes de resistencia en EGMs, los hace difíciles de erradicar, lo cual compromete el tratamiento efectivo de infecciones y es un desafío significativo para la vigilancia epidemiológica (Biez et al., 2023; Heljanko et al., 2023; Rezaei et al., 2016).

Por lo tanto, si bien la vigilancia de la resistencia de *Citrobacter* spp. a carbapenémicos se realiza en diversos países a nivel mundial, a la fecha no hay data robusta sobre la resistencia ni la epidemiología molecular de cepas del complejo *C. freundii* en Chile. Considerando el emergente impacto de este complejo como patógeno intrahospitalario, es importante determinar la prevalencia y el tipo de resistencia a carbapenémicos en nuestro país, así como también a los clones/linajes circulantes en el país. Por esta razón, el presente proyecto tiene como objetivo estudiar la epidemiología molecular de cepas bacterianas del complejo *C. freundii* aisladas en Chile. Los resultados de este

trabajo contribuyen a un mejor entendimiento de la epidemiología y evolución de *Citrobacter* spp. en Chile aportando con la línea base epidemiológica local, lo cual permitirá adoptar medidas adecuadas para el control de infecciones y la gestión de la resistencia a carbapenémicos en el país.

## PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La falta de estudios detallados sobre la resistencia a antibióticos y la epidemiología molecular de las cepas del complejo *C. freundii* resistentes a antibióticos en Chile, plantea un desafío significativo en la gestión y control de infecciones y resistencia a antimicrobianos, lo cual requiere un análisis exhaustivo de las cepas de este complejo para identificar la evolución de estas bacterias, identificar clones de alto riesgo y los genes de resistencia presentes en estas cepas. Por esta razón, surge la siguiente pregunta: **¿Las cepas del complejo *Citrobacter freundii* aisladas en hospitales de Chile forman parte de los complejos clonales predominantes a nivel mundial asociados a resistencia a carbapenémicos?**

## HIPÓTESIS

En Chile, las cepas del complejo *Citrobacter freundii* resistentes a carbapenémicos pertenecen a los complejos clonales de “alto riesgo” de diseminación global.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar la epidemiología molecular de las cepas del complejo *C. freundii* aisladas en hospitales chilenos resistentes a carbapenémicos, así como las enzimas tipo carbapenemasas que estas producen.

### Objetivos específicos

1. Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos e identificar los genes de carbapenemasas en cepas del complejo *C. freundii* aisladas en hospitales de Chile.
2. Determinar la relación genética de las cepas del complejo *C. freundii* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas bacterianas

Con el fin de lograr los objetivos de este trabajo de investigación, se utilizaron 29 cepas del complejo *C. freundii* aisladas en 13 Hospitales de Chile (tabla S1). El análisis incluyó el uso de técnicas microbiológicas convencionales, así como también herramientas bioinformáticas, utilizando la información de la secuenciación de los genomas completos disponibles previamente. Tanto las cepas bacterianas como los genomas a utilizar se encuentran disponibles en el Laboratorio de Investigación de Agentes Antibacterianos (LIAA) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción.

## **2. Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos e identificar los genes de carbapenemasas en cepas del complejo *C. freundii* aisladas en hospitales de Chile**

La determinación de las características fenotípicas de las cepas se llevó a cabo aplicando técnicas convencionales de microbiología. Para esto, las cepas se sembraron en placas con agar triptona-soya (TSA) desde los cultivos criopreservados a -80°C y se incubaron por 18-20 h a 37°C en aerobiosis. Luego se procedió con las actividades, utilizando las colonias obtenidas de la siembra.

### **2.1 Caracterización microscópica:**

Para la caracterización microscópica se realizó la tinción de Gram, una tinción de contraste que permite diferenciar bacterias Gram positivas y Gram negativas, y

además identificar su morfología y agrupación (Tripathi & Sapra, 2025)., observando los frotis mediante microscopía óptica.

## **2.2 Perfil bioquímico**

Con el fin de determinar las características bioquímicas y confirmar la identificación de las cepas del complejo *C. freundii*, se realizaron las pruebas de la escala bioquímica, la que consta de 12 pruebas realizadas en 5 tubos con medios de cultivos específicos: *Triple Sugar Iron* (TSI - hierro de triple azúcar), *Lysine Iron Agar* (LIA - agar hierro-lisina), MIO (Motilidad, Indol, Ornitina), citrato y urea (Ederer & Clark, 1970; Hajna, 1945; Johnson et al., 1966; Paliwal & Randhawa, 1977; Simmons, 1926).

### **2.3 Extracción de ADN bacteriano**

Para la realización de la reacción de ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction*) y PCR convencional para detección genes de carbapenemasas, el ADN genómico (ADNg) se extrajo utilizando la resina Chelex 5% (Bio-Rad®). Específicamente, desde el cultivo en agar se seleccionaron 5 colonias y se resuspendieron en 1 ml de H<sub>2</sub>O estéril en tubos Eppendorf. Posteriormente, se centrifugó a 13.000 rpm por 1 min, se removió el sobrenadante y se agregaron 200 µl de Chelex-100 al 5% (de Lamballerie et al., 1992). Luego, los tubos fueron incubados a 95°C y centrifugados a 13.000 g, ambos por 10 min. Finalmente, se extrajo el sobrenadante en donde se encuentra el ADNg, el cual se transfirió a tubos nuevos para luego almacenarlos a -20°C para ser utilizados posteriormente. La determinación de la concentración y pureza de las muestras de ADNg se realizó utilizando el espectrofotómetro de microplacas Take3Epoch™, midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm, para posteriormente calcular la relación 260/280.

## 2.4 Relación genética de las cepas mediante ERIC-PCR

Con el fin de establecer la relación genética entre las cepas, se utilizó la técnica de ERIC-PCR o *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (Ranjbar et al., 2017). Los partidores utilizados se encuentran en la Tabla 1. El ERIC-PCR se realizó utilizando para cada muestra 400 ng de ADNg, 0.8 µl de cada partidor, 10 µl de GoTaq® G2 Green Máster Mix, y 0.4 µl de MgCl<sub>2</sub>, en un volumen final de 20 µl. La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems™ Veriti™ (Thermo Fisher), con parámetros de ciclado descritos por Di Giovanni y colaboradores (Di Giovanni GD et al., 1999). Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se utilizó un marcador de tamaño molecular de 1 Kb para estimar el tamaño de los productos amplificados (MaestroGen, cat. 02004-500 AccuRuler), los cuales se visualizaron en transiluminador UV (UVITEC®, UVIDOC H5)

La relación clonal entre las cepas del complejo *C. freundii* se determinó utilizando los patrones de bandas obtenidas desde los resultados ERIC-PCR, lo cual se

realizó utilizando el software GelJ (Heras et al., 2015). Para esto, se incluyeron etapas de normalización en el análisis de los patrones obtenidos para garantizar una comparación adecuada del patrón de bandas. Luego, se generaron dendrogramas para los geles ERIC-PCR, utilizando el coeficiente de similitud de Dice y el método de grupo de pares no ponderado utilizando promedios aritméticos (UPGMA), con un 2% de tolerancia en posición (Heras et al., 2016). Las cepas del complejo *C. freundii* con una similitud superior al 80% se consideraron estrechamente relacionadas, basándose en el porcentaje establecido por el “*gold standard*”, que corresponde a la técnica de campo pulsado para *Enterobacterales* propuesto por (Tenover et al., 1995).

**Tabla 1.** Listado de primers utilizados para ensayos moleculares

Primer	Blanco	Secuencia (5' → 3')	Tamaño amplicón (pb)	Ref.
ERIC-1	ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Repeticiones de 127	(Codjoe et al., 2019)
ERIC-2		AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
KPC-F	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	ATGTCACTGTATCGCCGTCT	893	(Schechner et al., 2009)
KPC-R		TTTTCAGAGCCTTACTGCCC		
NDMseqF	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC	782	(Doyle et al., 2012)
NDMseqR		GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT		
VIM1-4F	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	ATT CAG CCA GAT CGG CAT	437	(Bogaerts et al., 2013)
VIM1-4R		ATA TCG CAA CGC AGT CGT TT		

## 2.5 Perfil de susceptibilidad antibiótica

Para determinar la susceptibilidad de las cepas a antibióticos, se llevó a cabo el método de Kirby-Bauer, o de difusión en agar (Tenover et al., 1995). Para esto, se utilizaron distintos grupos de antibióticos (Tabla 2), los cuales fueron seleccionados de los antibióticos se basó en los que se utilizan actualmente en nuestro país, y también en el listado del CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*, EEUU) (CLSI., 2024). La realización de esta prueba se llevó a cabo utilizando la guía M100 del CLSI: “*Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 34th Edition*” (CLSI, 2024).

**Tabla 2.** Listado de antibióticos utilizados para determinar el perfil de susceptibilidad.

Familia	Antibiótico	Abreviación
Carabapenémicos	Imipenem	IPM
	Meropenem	MEM
Quinolonas	Ciprofloxacino	CIP
	Levofloxacina	LEV
Cefalosporinas	Cefuroxima	CXM
	Cefotaxima	CTX

	Ceftazidima	CAZ
Aminoglucósidos	Gentamicina	GEN
	Amikacina	AMK
Combinación $\beta$ -lactámico	Piperacilina-Tazobactam	TZP
Tetraciclina	Tetraciclina	TE
Sulfonamida	Cotrimoxazol (Sulfametoxazol + Trimetoprim)	SXT

## 2.6 Detección fenotípica de la producción de carbapenemasas

Con el objetivo de detectar fenotípicamente la producción de carbapenemasas en las cepas del complejo *C. freundii*, se empleó el ensayo BlueCarba, el cual es un método colorimétrico que permite identificar actividad enzimática mediante el cambio de color de la reacción. Este ensayo se llevó a cabo utilizando el protocolo adaptado del Laboratorio de Investigación de Agentes Antibacterianos (LIAA), a partir de lo establecido por Pires y colaboradores (Pires et al., 2013).

## **2.7 Identificación rápida de las familias de carbapenemasas mediante inmunocromatografía.**

Dado que no fue posible confirmar la presencia de genes de carbapenemasa en las cepas C22, CIT-58 y CIT-32, se realizó el inmunoensayo NG-Test ® CARBA 5 (NG Biotech, Francia), una técnica de inmunocromatografía que permite detectar de manera cualitativa y visual la presencia carbapenemasas de las familias *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>IMP</sub> (NG Biotech). La prueba se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

## **2.8 Detección molecular de carbapenemasas mediante PCR.**

Una vez obtenidos los resultados de la inmunocromatografía, se realizó la detección de los genes de carbapenemasas *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> para las cepas

C22, C23, C24, CIT-107, CIT-79, CIT-73, CIT58, CIT-32 y UDEC039. Los partidores utilizados están en la Tabla 1. Brevemente, la PCR se realizó utilizando 100 ng de ADNg, 0.2 µl de cada partidador y 5 µl de GoTaq® G2 Green Master Mix, en un volumen final de 10 µl. La amplificación se realizó en un termociclador MiniAMP™ Plus (Thermo Fisher), con parámetros de ciclado basados en bibliografía según corresponde (Tabla 1). Como control positivo se utilizaron las cepas UCO454, Kpn 2044 y Kpn 2070 para *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* y *bla<sub>VIM</sub>* respectivamente.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb para estimar el tamaño de los productos amplificados (MaestroGen, cat. 02002-500 AccuRuler), los cuales se visualizaron mediante un transiluminador UV (UVITEC®, UVIDOC H5)

## 2.9 Pruebas de susceptibilidad a tigeciclina y colistín

Además de los antibiogramas, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para colistín y tigeciclina, mediante la técnica de microdilución en caldo, exclusivamente para la cepa CIT-107 debido a su amplio resistoma y la presencia del gen *mcr-9*. La determinación de CMI de colistín se llevó a cabo utilizando el kit ComASP™ COLISTINA 0.25-16 µg/mL Liofilchem®, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Con respecto a tigeciclina, la determinación de la CMI se realizó utilizando el protocolo adaptado por el Laboratorio de Investigación de Agentes Antibacterianos (LIAA). Brevemente, en una microplaca de 96 pocillos se agregaron 100 µl de caldo Müller-Hinton (MHB) ajustado en cationes a cada pocillo a utilizar. Luego, se agregaron 100 µl de la solución de antibiótico a la primera fila. A continuación, se procedió a hacer la microdilución, donde se tomaron 100 µl de caldo con antibiótico, para depositarlo en la siguiente fila de pocillos. Se tomaron 100 µl de cada fila de pocillos, y se depositaron en la

siguiente fila, hasta llegar a la dilución mínima deseada, que corresponde a 0.0625 µg/mL del antibiótico. Para el inóculo bacteriano utilizado se preparó una dilución McFarland al 0.5, y se diluyeron 50 µl en 950 µl de agua destilada. Luego, se agregaron 20 µl de inóculo a cada pocillo e incubó la microplaca a 36°C por 16-20 h. La interpretación de los resultados se realizó utilizando el criterio establecido por la U.S. *Food and Drug Administration* (FDA) para *Enterobacterales* (<https://www.fda.gov/drugs/development-resources/antibacterial-susceptibility-test-interpretive-criteria>).

## **2.10 Secuenciación de genomas completos (*whole genome sequencing*) de las cepas en estudio.**

Para realizar el análisis genómico de las cepas del complejo *C. freundii*, se realizó secuenciación de genoma completo, a las cepas que en su perfil de susceptibilidad clasificaron como resistentes a carbapenémicos, mediante la plataforma Illumina en la empresa SeqCenter® (Pittsburgh, EE. UU.). Las bibliotecas genómicas de las muestras para la plataforma Illumina se prepararon

utilizando el kit Illumina DNA Prep y los índices UDI de 10 pb de IDT. La secuenciación se llevó a cabo con el sistema Illumina NextSeq 2000, obteniendo lecturas de 2x151 pb. La demultiplexación, el control de calidad y el recorte de adaptadores se realizaron con bcl-convert (v3.9.3)

Los análisis bioinformáticos que se detallan a continuación se realizaron a través de la plataforma Galaxy Australia (<https://usegalaxy.org.au/>), la cual es una plataforma *web* que contiene más de 1000 herramientas bioinformáticas para llevar a cabo análisis ómicos de libre acceso (The Galaxy Community, 2022).

## **2.11 Ensamble de secuencias de genomas completos de las cepas del complejo *C. freundii*.**

En primer lugar, se analizó la calidad de las secuencias obtenidas, para posteriormente generar el ensamble de las secuencias. El análisis de calidad se

realizó utilizando FASTQC (Andrews, 2010), donde se ingresaron los datos crudos en formato .fastq. Luego, el ensamble de los genomas se realizó mediante Shovill (Galaxy Version 1.1.0) (<https://github.com/tseemann/shovill>), empleando el trimming con la herramienta Trimmomatic, luego el ensamble con los algoritmos de SPades y SKESA (Seemann, 2016/2024, y el pulido del ensamble con pilon (Bolger et al., 2014; Walker et al., 2014). El ensamble se realizó utilizando datos *paired-end*, en formato .fastq, utilizando los parámetros establecidos por *default*, con una profundidad de 100%, cobertura mínima de 2 y se utilizaron valores automáticos (*default*) tanto para el tamaño de *k-mer* como para el tamaño estimado del genoma. Durante el proceso de ensamblado se aplicaron múltiples tamaños de *k-mer*, con valores entre 31 y 111. Los tamaños estimados de genoma se encontraron entre 5.043.386 y 6.156.315 pb.

Una vez realizados los ensambles, se emplearon cuatro herramientas para evaluar su calidad. En primer lugar, se utilizó QUAST (Galaxy Version 5.3.0), que evalúa métricas tales como el N50, y también BUSCO (Galaxy Version 5.8.0), que evalúa integridad del ensamble basado en ortólogos universales de copia única (Manni et al., 2021; Mikheenko et al., 2018). Además, se emplearon las herramientas CheckM *taxonomy* (Galaxy Version 1.2.3) y FastANI (Galaxy

Version 1.3), con el fin de determinar completitud del genoma, contaminación y similitud de estos (Jain et al., 2018; Parks et al., 2015).

## **2.12 Identificación bacteriana**

Para establecer la especie y subespecie de las cepas secuenciadas, se ingresaron los genomas ya ensamblados al servidor JspeciesWS (Richter et al., 2016). La identificación fue realizada mediante el análisis taxonómico de las secuencias ensambladas, en formato fasta, utilizando los valores de identidad mediante secuencias (ANI), lo cual además de establecer la taxonomía, permitió evaluar similitud genómica entre las cepas depositadas en la base de datos de dicha plataforma.

### 2.13 Anotación de genes

Una vez ensamblados los genomas, se procedió a la anotación funcional de los genes presentes. Para ello, los archivos de ensamblaje en formato fasta fueron ingresados en la herramienta Bakta (Galaxy versión 1.9.4), una pipeline automatizada para la anotación funcional de genomas bacterianos (Schwengers et al., 2021). Cabe destacar, que para la identificación de genes de resistencia a antimicrobianos, tiene integrada la herramienta *AMRFinderPlus* (Galaxy versión V3.11\_2023-11-15.1), que permite obtener una caracterización precisa de los mecanismos de resistencia presentes (Feldgarden et al., 2021). Los parámetros utilizados fueron los establecidos por *default*, siendo el tamaño mínimo de contig de 1 pb. Los archivos de salida obtenidos fueron en formato tsv, gff3, fasta y GenBank.

## 2.14 Identificación de genes de resistencia

Una vez anotados los genes, se procedió a identificar genes de resistencia a antibióticos. Para esto se utilizaron los archivos en formato fasta a través de la herramienta ABRicate (Galaxy Version 1.0.1) que permite identificar genes de resistencia a antibióticos (Seemann, 2014/2024). La base de datos utilizada fue *NCBI Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA313047>), con un porcentaje mínimo de identificación y cobertura de ADN de 80.0 (Feldgarden et al., 2019).

### **3. Determinar la epidemiología molecular de las cepas del complejo *Citrobacter freundii* resistentes a carbapenémicos aisladas en hospitales chilenos**

#### **3.1 Determinación de secuenciotipos (STs)**

Con el fin de asignar los secuenciotipos a las cepas, se realizó la técnica de MLST (Larsen et al., 2012). Para esto se ingresaron los genomas anotados en la plataforma PubMLST, que permitió identificar y comparar los STs de manera precisa y efectiva.

### 3.2 Alineamiento del *core-genome*

Para determinar la epidemiología molecular, es esencial alinear el *core-genome*, con el objetivo de identificar regiones génicas conservadas entre las cepas estudiadas (Segerman, 2012). Para esto, en primer lugar, se descargaron 50 genomas de cepas del complejo *C. freundii*, además de un genoma de referencia, MSB1\_1H correspondiente a *C. freundii* (Tabla S2). Los genomas se descargaron de la base de datos BV-BRC (*Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center*) (Olson et al., 2022). Con respecto a la selección específica de los genomas, se consideraron genomas de cepas que pertenezcan al complejo *C. freundii*, que sean aisladas en el continente americano, de genoma completo (WGS) de alta calidad, y estar asociados a un hospedero humano. Estos criterios se basaron en las opciones de filtrado disponibles en la base de datos genómica utilizada para el análisis.

El alineamiento se realizó con Roary (Galaxy Version 3.13.0), una herramienta diseñada para el análisis de pangenomas bacterianos a partir de archivos de anotación genómica en formato .gff3 (Page et al., 2015). Para la construcción del

*core genome* se utilizó un 95% de identidad mínima y un 99% de presencia entre cepas. Cabe destacar que el alineamiento de los genes del *core* se generó con herramientas integradas en el flujo de trabajo de Roary, incluyendo MAFFT para el alineamiento múltiple, las cuales se ejecutan automáticamente (Kato & Standley, 2013).

### **3.3 Construcción de árbol filogenético**

Una vez alineado el *core-genome* de las secuencias, se procedió a armar el árbol filogenético, siguiendo la metodología de Ilabaca-Carrasco et al. (Ilabaca-Carrasco et al., 2025). Para esto, utilizando el archivo de alineamiento de genes del *core*, en formato .fasta. En primer lugar, se realizó una búsqueda de polimorfismos de nucleótido único (SNPs) con la herramienta FindSNP sites (Galaxy versión 2.5.1) lo que permitió identificar variaciones genómicas clave entre las cepas, para facilitar el análisis de la relación evolutiva y proporcionar mayor resolución en la identificación de clados y patrones epidemiológicos (Page et al., 2016).

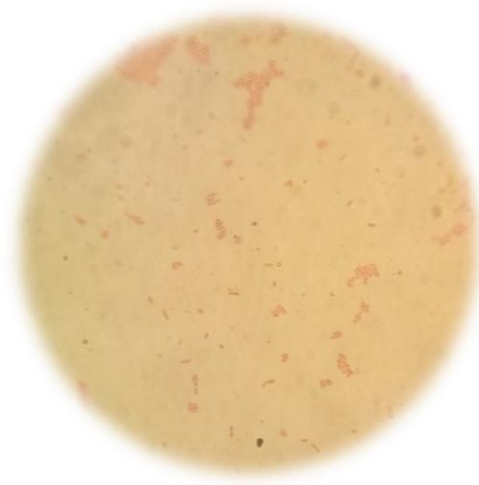
Una vez obtenido el archivo con los SNPs, se procedió a construir el árbol con la herramienta IQ-Tree (Galaxy v2.4.0) mediante el método de máxima similitud (Minh et al., 2020). Dentro de los parámetros se incluyeron parámetros de *bootstrap*, con mil réplicas, mil iteraciones, y también el algoritmo de Shimodaira-Hasegawa (SH-aLRT) con mil réplicas (Shimodaira & Hasegawa, 1999). La visualización y personalización del árbol obtenido se llevó a cabo en iTOL v7 (Interactive Tree of Life) (<https://itol.embl.de/>), donde se incluyó la metadata, como año de obtención de muestra, país de origen, ST y resistoma de cada cepa (Letunic & Bork, 2021).

## RESULTADOS

- 1. Determinar los perfiles de susceptibilidad a antibióticos e identificar los genes de carbapenemasas en cepas del complejo *Citrobacter freundii* aisladas en hospitales de Chile**

### **1.2 Caracterización microscópica y perfil bioquímico**

Para determinar la pureza de las cepas se realizaron dos técnicas de microbiología convencional. De la tinción de Gram, se pudo observar que las 29 cepas incluidas en este estudio corresponden a cepas Gram negativas, con morfología de bacilos y agrupación individual o en pares (fig. 3).



**Figura 3.** Caracterización microscópica del complejo *Citrobacter freundii* mediante tinción de Gram.

Con respecto a la escala bioquímica, de los resultados obtenidos se encontraron 2 cepas mal identificadas, que corresponden a *E. coli* y *K. oxytoca*, y fueron descartadas para los siguientes análisis. De las 27 cepas restantes, se destacan características tales como lisina descarboxilasa y desaminasa negativa, al igual que indol (Koneman, 2006). Por otro lado, los medios TSI y LIA demostraron la capacidad de fermentación de sacarosa y lactosa, lo cual está asociado también a la producción de gas y de H<sub>2</sub>S, donde más del 70% de las cepas dieron positivas a estas pruebas, tal como se observa en la tabla 3, y está relacionado con la capacidad de utilizar estos sustratos como fuente de energía.

**Tabla 3.** Características Bioquímicas de cepas del complejo *Citrobacter freundii* utilizadas en este estudio

<b>Prueba Bioquímica</b>	<b>Resultados positivos</b>
<b>Indol</b>	0/27
<b>Citrato</b>	17/27
<b>Lisina descarboxilasa</b>	0/27
<b>Ornitina descarboxilasa</b>	1/27

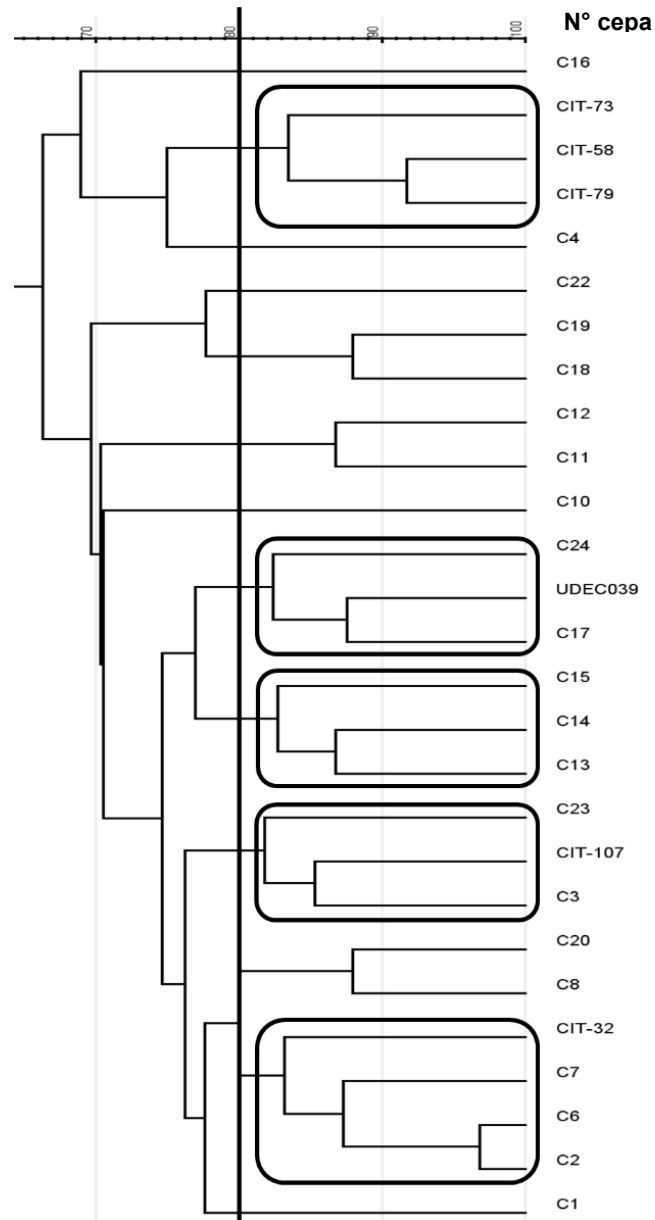
<b>Motilidad</b>	17/27
<b>Lisina desaminasa</b>	0/27
<b>Urea</b>	20/27
<b>H<sub>2</sub>S</b>	25/27
<b>Gas</b>	26/27
<b>Lactosa</b>	20/27
<b>Sacarosa</b>	20/27

---

Por otro lado, 17 cepas presentaron movilidad en el medio MIO. Así también, estas 17 cepas utilizan citrato como única fuente de carbono para su desarrollo, lo cual fue visualizado con el medio citrato de Simmons, donde ocurre un cambio de color de verde a azul. Finalmente, con respecto al medio urea, más del 70% de las cepas producen la enzima ureasa, el cual es un factor de virulencia importante para la colonización de los tejidos, lo cual puede favorecer la colonización en el estómago o el tracto urinario (Konieczna et al., 2012; Maroncle et al., 2006; H. L. T. Mobley, 2001; Steyert & Kaper, 2012).

### **1.3 Relación genética mediante ERIC-PCR**

Para determinar la clonalidad de las cepas, se llevó a cabo el análisis mediante la técnica de ERIC-PCR. Como se observa en la figura 4, se generó un dendrograma para analizar los resultados.



**Figura 4. Análisis de clonalidad mediante ERIC-PCR.** La línea denota el 80% de similitud genética según el criterio de Tenover (Tenover et al., 1995)

En el análisis del dendrograma (fig. 4), se consideró un 80% de similitud para establecer si las cepas se encuentran genéticamente relacionadas (Rezaei et al., 2016; Tenover et al., 1995) A partir de este valor, se generaron 5 clústeres que se

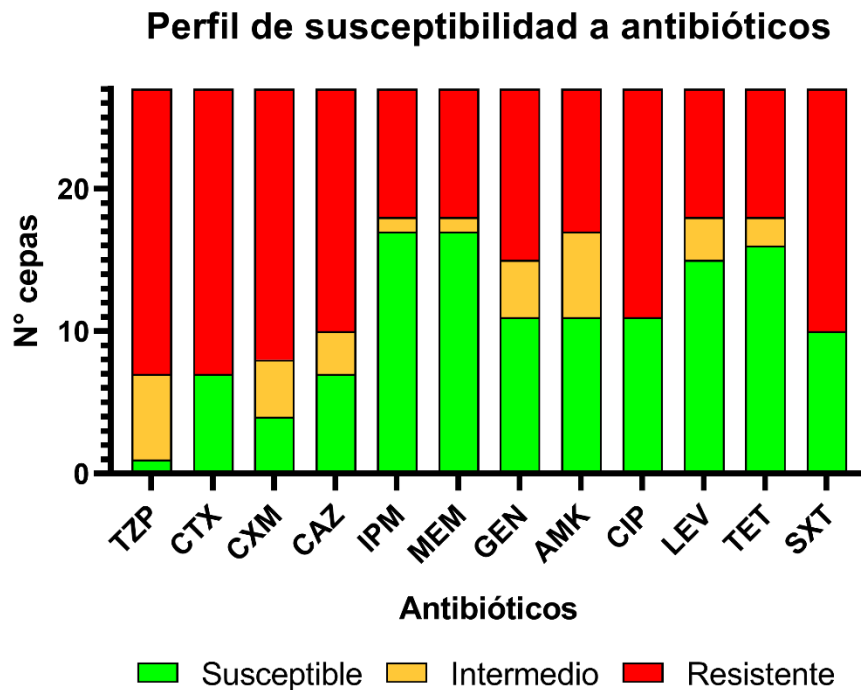
encuentran marcados en la figura 4, conformados por 3 y 4 cepas respectivamente, las cuales, si bien no son idénticas genéticamente, comparten sobre un 80% de similitud.

#### **1.4 Perfiles de susceptibilidad antibiótica**

Con el fin de evaluar el perfil de susceptibilidad de las 27 cepas aisladas, se llevó a cabo el método de difusión en disco en agar según los estándares del CLSI (CLSI, 2024).

De los resultados obtenidos (fig 5), en primer lugar, se puede observar que la mayoría de las muestras son resistentes a la combinación de  $\beta$ -lactámicos (PIP) y un inhibidor de  $\beta$ -lactamasas (TZP) piperacilina-tazobactam (TZP). En este sentido, 20 de las 27 cepas analizadas resultaron resistentes, sugiriendo que las

cepas presentan mecanismos de resistencia, principalmente producción de  $\beta$ -lactamasas, permitiendo inactivar la actividad del antibiótico (Tabla S2).



**Figura 5. Perfil de susceptibilidad a antibióticos de cepas del complejo *Citrobacter freundii*.** Los antibióticos utilizados fueron Piperacilina-tazobactam (TZP), Cefotaxima (CTX), Cefuroxima (CXM), Ceftazidima (CAZ), Imipenem (IPM), Meropenem (MEM), Gentamicina (GEN), Amikacina (AMK) Ciprofloxacina (CIP), Levofloxacina (LEV), Tetraciclina (TE) y Cotrimoxazol (SXT). (n = 27)

Con respecto a las cefalosporinas, se observa mayor susceptibilidad a las cefalosporinas de tercera (CTX y CAZ) que de segunda generación (CXM). Este hallazgo es consistente con las propiedades farmacológicas de las cefalosporinas de tercera generación, las cuales presentan un espectro más amplio frente a *Enterobacteriaceae*, y una mayor estabilidad frente a la hidrólisis por  $\beta$ -lactamasas (Arumugham VB et al., 2024). Sin embargo, nuestros

resultados indican que, al igual que en otros casos reportados (L. Liu et al., 2021; Park et al., 2005; Spanu et al., 2002) estas cepas presentan mecanismos más efectivos para evadir la acción de estos fármacos.

Otro grupo de antibióticos de amplio espectro corresponden a los carbapenémicos, tales como IMP y MEM, que actúan incluso en infecciones graves causadas por bacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o bacterias Gram negativas (Gutiérrez-Gutiérrez & Rodríguez-Baño, 2019; Kaniga et al., 2010; Smith et al., 2024; Son et al., 2018; Vardakas et al., 2012). Como se puede observar en la figura 5, 9 cepas presentan resistencia a estos antibióticos (tabla S3).

Además de los ya mencionados anteriormente, los aminoglucósidos se utilizan para tratar infecciones por bacterias Gram negativas, como las *Enterobacteriaceae*, los cuales presentan una actividad bactericida, impidiendo la síntesis de proteínas necesarias para crecer y multiplicarse (Block & Blanchard, 2024). Los antibióticos utilizados en este trabajo corresponden a GEN y AMK, que se utiliza para tratar infecciones por cepas

Gram negativas resistentes. De los resultados obtenidos, alrededor del 44% de las cepas son resistentes, lo cual sugiere la presencia de mecanismos que confieren resistencia a este grupo, como por ejemplo capacidad de inactivación de aminoglucósidos, o modificación de la subunidad ribosomal 30S (Doi et al., 2016).

Con respecto a las fluoroquinolonas (CIP y LEV), estas corresponden también a antibióticos de amplio espectro, y actúan inhibiendo la replicación del ADN, actuando sobre las enzimas girasas (Baggio & Ananda-Rajah, 2021). De este grupo, se observa una variabilidad en la susceptibilidad, siendo alrededor del 50% de las cepas susceptibles, lo cual, si bien no es alarmante, al haber cepas resistentes sugiere una limitación en el uso de antibióticos que se recetan como primer tratamiento, como es el caso de estos.

Finalmente, al analizar los resultados obtenidos utilizando TET y SXT, se observa que entre el 40-50% de las cepas son resistentes, sugiriendo limitaciones en los tratamientos para infecciones por *C. freundii*. Cabe destacar que cotrimoxazol corresponde a una combinación sinérgica de los

antibióticos trimetoprim y sulfametoxazol, lo que confiere una eficacia terapéutica superior frente a diversas infecciones bacterianas, por lo tanto, la detección de cepas resistentes a esta combinación resulta particularmente preocupante, ya que compromete una opción antimicrobiana de amplio uso clínico (Kemnic & Coleman, 2024).

### **1.5 Prueba Blue Carba para identificación de carbapenemasas**

Una vez realizados los antibiogramas, se procedió a determinar si la resistencia a carbapenémicos está asociada a la producción de enzimas de tipo carbapenemasas, utilizando la prueba de Blue Carba, la cual es una técnica colorimétrica en donde el cambio de color de la solución indica presencia de estas enzimas.

**Tabla 4.** Detección de actividad enzimática de carbapenemasas por Blue Carba en 27 cepas del complejo *C. freundii*.

<b>Resultado</b>	<b>N° de cepas</b>
<b>No produce carbapenemasas</b>	18
<b>Produce carbapenemasas</b>	9

Como resultado, se observó que 9 cepas son productoras de carbapenemasas (tabla 4), lo cual es concordante con los resultados obtenidos de los perfiles de susceptibilidad (tabla S3).

### **1.6 Detección rápida de carbapenemasas mediante inmunocromatografía**

Debido a que no todas las cepas productoras de carbapenemasas fueron secuenciadas, se procedió a determinar la presencia de carbapenemasas mediante el inmunoensayo NG-Test® CARBA 5 (NG Biotech Laboratoires, Guipry, Francia) el cual es un inmunoensayo cualitativo de flujo lateral para detectar y diferenciar las familias de carbapenemasas más prevalentes.

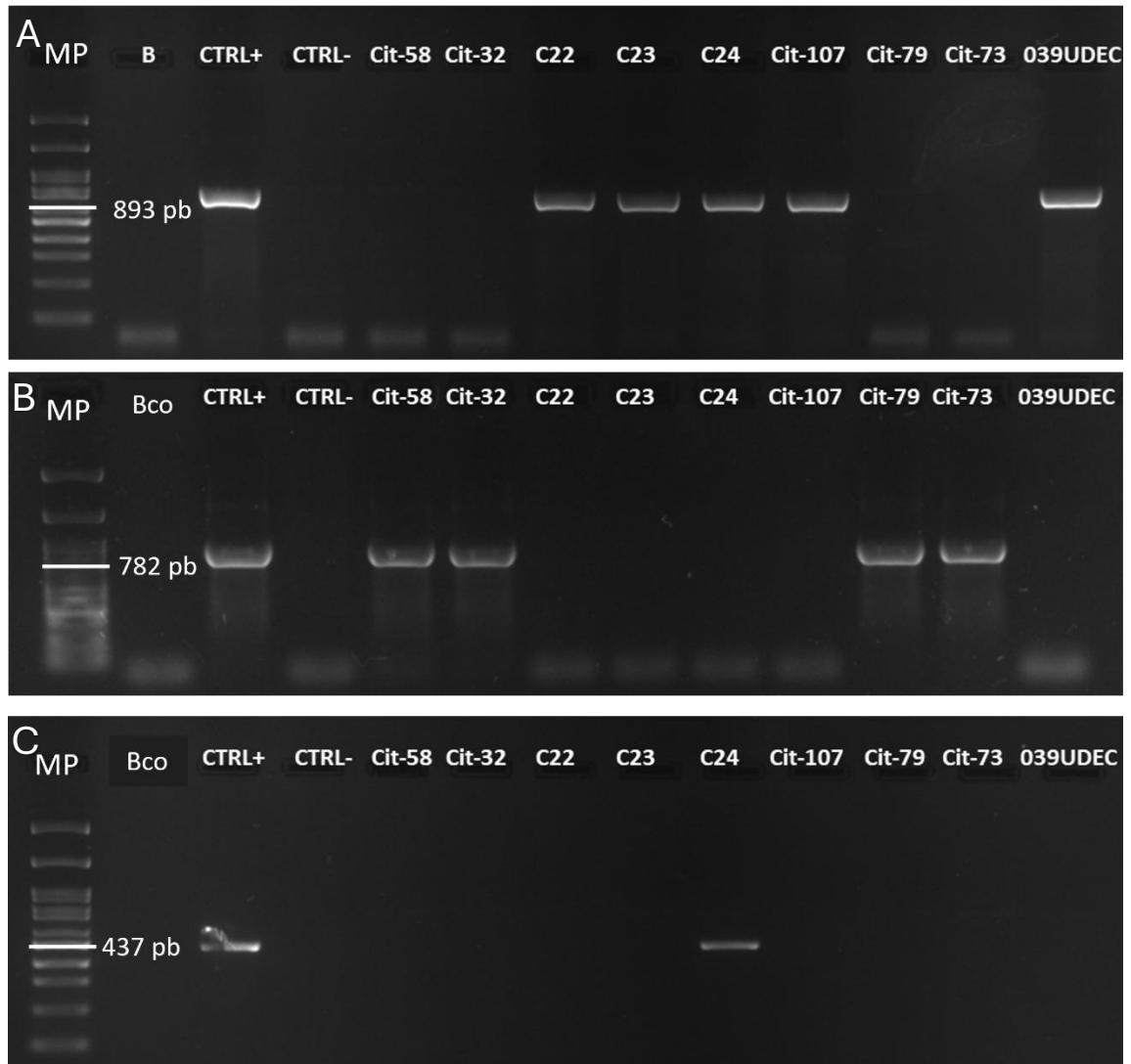
**Tabla 5.** Detección de carbapenemasas mediante NG-test CARBA®

<b>Cepa</b>	<b>Tipo de carbapenemasa</b>
C22	NDM
Cit-58	KPC
Cit-32	KPC

De los resultados obtenidos (tabla 5), se observa que 2 cepas producen carbapenemasas del tipo KPC, mientras que la C22 producen enzimas del tipo NDM. Si bien esta prueba no permite identificar la variante específica de la enzima, sí permite determinar el tipo de carbapenemasas que produce cada cepa, lo cual facilita la elección de las pruebas moleculares complementarias y permite orientar el análisis epidemiológico, optimizando el estudio de los mecanismos y resistencia presentes.

## 1.7 Detección molecular de carbapenemasas mediante PCR

Para confirmar la presencia de los genes que codifican para las carbapenemasas en las cepas no incluidas en el punto 1.5, se realizó PCR para los grupos de carbapenemasas *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>, seleccionados en función de los reportes preliminares proporcionados por el hospital de origen. Esta detección se aplicó a las 9 cepas productoras de carbapenemasas, utilizando los *primers* detallados en la tabla 1.



**Figura 6. Detección de genes que codifican carbapenemasas mediante PCR convencional para *bla*<sub>KPC</sub> (A) *bla*<sub>NDM</sub> (B) y *bla*<sub>VIM</sub> (C).** Los productos amplificados se separaron en un gel de agarosa al 2%, y fueron visualizados con el sistema de documentación de geles Cambridge UVITEC.

Luego de visualizar los geles de agarosa (fig. 6), se puede observar que las cepas CIT-79, 73, 58 y 32 portan el gen *bla*<sub>KPC</sub>-like, mientras que las C22, C23, C24, CIT-107 y 039UDEC portan *bla*<sub>NDM</sub>-like. Además, se encontró una co-producción de

carbapenemasas en la cepa C24, la cual además portaba un gen de la familia *bla*<sub>VIM-like</sub>.

### 1.8 Pruebas de susceptibilidad a tigeciclina y colistín

Considerando que se está trabajando con una cepa multirresistente que corresponde a CIT-107, colistín y tigeciclina son algunas alternativas terapéuticas (Kagami et al., 2021; Karageorgopoulos et al., 2008; Levin et al., 1999). Por esto, se evaluó la CMI para estos dos antibióticos.

**Tabla 6.** Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para colistín y tigeciclina

Antibiótico	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )	Susceptibilidad
Colistín	<0.25	S
Tigeciclina	0.5	S

CMI: concentración mínima inhibitoria; S: susceptible.

De los resultados obtenidos (tabla 6), se observa que la cepa es susceptible para ambas alternativas, destacando el potencial como opciones terapéuticas viables para infecciones causadas por esta cepa.

Una vez finalizadas las actividades experimentales, se procedió a realizar los análisis bioinformáticos. Para esto es importante considerar que los controles de calidad de las secuencias fueron los adecuados para proceder con el ensamble.

### **1.9 Control de calidad de ensamblajes de genomas completos de las cepas del complejo *C. freundii***

Luego de ensamblar las secuencias con Shovill (Galaxy Version 1.1.0) (<https://github.com/tseemann/shovill>) se realizó el control de calidad de los ensamblajes. En primer lugar, se emitieron los reportes de calidad mediante la herramienta QUAST (Galaxy Version 5.3.0 ) (Mikheenko et al., 2018)(tabla 7).

Al analizar los reportes, se puede observar en primer lugar que la cepa 039UDEC contiene un menor número de contigs, lo que sugiere un ensamblaje más continuo, a diferencia de CIT-107 y CIT-73, que contienen un mayor número de contigs (~ 180 contigs) (Gurevich et al., 2013; Mikheenko et al., 2018). Por otro lado, el tamaño de genoma es similar entre ellas, y además se encuentra dentro del rango de tamaño de genoma de *C. freundii*, que corresponde a 5.2 Mb, a excepción de CIT-107.

**Tabla 7.** Reporte de calidad de ensamblajes obtenido con la herramienta QUAST

<i>Estadísticas</i>	<i>C23</i>	<i>C24</i>	<i>CIT-107</i>	<i>CIT-79</i>	<i>CIT-73</i>	<i>CIT-58</i>	<i>CIT-32</i>	<i>039UDEC</i>
<b><i>N° contigs</i></b>	93	136	187	156	187	117	96	64
<b><i>Largo total</i></b>	5364360	5384390	6105324	5167939	5140211	5091207	5125805	5025279
<b><i>N50</i></b>	211705	111833	120972	99614	91331	166832	151106	268272
<b><i>N90</i></b>	48309	30487	20325	30351	20258	33395	40425	55387
<b><i>L50</i></b>	9	17	15	18	18	11	10	5
<b><i>L90</i></b>	27	53	64	55	66	35	34	19
<b><i>GC (%)</i></b>	51.74	51.81	51.51	51.61	51.58	51.66	51.69	51.82

GC (%): contenido Guanina-Citosina.

Con respecto a las métricas, los valores de N<sub>50</sub> y N<sub>90</sub> indican el número mínimo de contigs necesarios para cubrir el 50% y el 90% del ensamblaje respectivamente (Karam et al., 2022). De los resultados, la cepa UDEC039 presenta los valores de N<sub>50</sub> y N<sub>90</sub> más altos, lo cual reafirma un ensamblaje continuo en comparación a los otros genomas. Por otro lado, las cepas CIT-32 a CIT-107 tienen los valores de N<sub>50</sub> o N<sub>90</sub> más bajos, lo que sugiere un menor tamaño de los contigs, por lo tanto, el ensamblaje es menos continuo y sugiere una

menor calidad. Sumado a esto, se encuentran las métricas  $L_{50}$  y  $L_{90}$ , que indican el número mínimo de contigs necesarios para cubrir el 50% y el 90% del ensamblaje (Karam et al., 2022). Entre los genomas analizados, 039UDEC presentó los valores más bajos de  $L_{50}$  y  $L_{90}$ , mientras que CIT-107 y CIT-73 mostraron los valores más altos de  $L_{50}$  y  $L_{90}$  (Tabla 7).

En lo que respecta al porcentaje GC, este parámetro permite identificar organismos o distinguir entre género y/o especies, ya que constituye una característica genómica conservada que varía entre distintos taxones bacterianos (Mitchell, 2007). En este sentido, el %GC de los genomas es homogéneo, por lo que no hay variaciones que sugieren contaminación en el ensamble.

Estos resultados en conjunto permiten inferir que el genoma 039UDEC presenta el ensamblaje de mayor calidad en comparación con los demás genomas analizados, los cuales exhiben una calidad de ensamblaje baja o intermedia.

Además, se evaluó la calidad de ensamblaje mediante integridad en función de la presencia de genes ortólogos conservados, con la herramienta BUSCO (Galaxy Version 5.8.0) (Manni et al., 2021) (tabla 8), del cual en primer lugar se observa que el número de BUSCOS completos fluctúa entre 437 y 439, lo que sugiere que los ensamblajes son casi completos y contienen la mayoría de los genes esperados, los cuales corresponden a 440 (Total BUSCOs).

**Tabla 8.** Evaluación de completitud genómica mediante BUSCO

	C23	C24	CIT-107	CIT-79	CIT-73	CIT-58	CIT-32	039UDEC
<b>COMPLETE BUSCOS</b>	438	438	439	439	437	438	439	439
<b>SINGLE-COPY BUSCOS</b>	433	437	438	438	436	437	438	438
<b>DUPLICATED BUSCOS</b>	5	1	1	1	1	1	1	1
<b>FRAGMENTED BUSCOS</b>	0	0	0	0	2	1	0	0
<b>MISSING BUSCOS</b>	2	2	1	1	1	1	1	1
<b>TOTAL BUSCOS</b>	440	440	440	440	440	440	440	440

En cuanto a los otros parámetros evaluados por BUSCO, C23 presenta 5 genes duplicados, lo cual puede asociarse a regiones redundantes. Por otro lado, los genes faltantes indican que se encuentran casi todos los genes esenciales, pero la ausencia de uno o dos genes sugiere que podrían existir pequeñas regiones genómicas faltantes, lo que podría tener un impacto en la detección precisa de genes de resistencia. Sin embargo, los resultados en general sugieren una baja fragmentación y ausencia de genes, lo cual destaca la calidad de los ensamblajes en general.

Sumado a esto, se analizó la completitud y contaminación de los genomas, con la herramienta CheckM (Galaxy Version 1.2.3) (Parks et al., 2015). De este análisis se observó que los 8 genomas presentan una completitud mayor al 99% y una contaminación menor a 3%, sugiriendo una alta calidad de los ensamblajes.

A pesar de que los parámetros muestran variaciones considerables entre los diferentes análisis, al integrar todos los resultados, sugieren una buena calidad general del ensamblaje, lo cual respalda su uso para análisis posteriores (Aguilar-Bultet & Falquet, 2015; Gurevich et al., 2013).

## **1.10 Identificación bacteriana**

Para confirmar la especie con la que se está trabajando, se llevaron a cabo análisis de taxonomía, empleando la búsqueda de tetracorrelación (TCS) en

JSpeciesWS (Richter et al., 2016), y el cálculo de identidad de nucleótidos promedio (ANI) con la herramienta FastANI (Jain et al., 2018).

Los resultados obtenidos de ANI sugieren una alta similitud con el genoma de referencia de *C. freundii* MSB1\_1H, con valores de ANI superiores al 98%, lo cual indica una alta probabilidad de pertenecer a la misma especie. Con respecto al TCS, este refuerza la conclusión anterior, en donde se obtuvo un z-score de 0.999 en todos los genomas, asignando la taxonomía: Bacteria – Pseudomonadota – Gammaproteobacteria - *Enterobacterales* – *Enterobacteriaceae*.

## **1.11 Anotación de genes**

Luego de ensamblar y verificar los parámetros de calidad, se procedió con la anotación de los genes, en donde se generó una tabla resumen con los parámetros claves que dan una idea del contenido funcional de los genomas, la cual corresponde a la tabla 9.

En primer lugar, los genomas contienen entre 4 y 6 mil secuencias codificantes (CDS), que corresponden a genes que codifican proteínas y desempeñan un papel crucial, los cuales pueden corresponder a enzimas, proteínas de unión, de señalización, entre otros (Furuno et al., 2003) (tabla 9). Como se observa en la tabla 9, hay una gran variación entre genomas, lo cual se puede asociar a diferencias en el contenido genético de las cepas. Además, se puede observar en la tabla, que los genomas no presentan *gaps* o interrupciones en las secuencias, lo cual indica una buena calidad en la secuenciación y continuidad de estos.

Por otro lado, se encontraron entre 31 y 80 proteínas hipotéticas. Estas corresponden a proteínas cuya función no ha sido determinada (Ijaq et al., 2019). Considerando que el total de CDS está entre 4 mil y 6 mil, el número de proteínas hipotéticas fluctúa entre un 0.5% y 1.6% del total, lo cual es una proporción considerablemente baja y estimada para los genomas bacterianos. Junto a esto, se encuentra presencia de pseudogenes, los que corresponden a segmentos de ADN que han perdido su función debido a mutaciones a lo largo de su evolución (Balakirev & Ayala, 2003). De los genomas analizados, se identificaron entre 1 y 6 pseudogenes, siendo el genoma de CIT-107 el que presentó mayor cantidad.

La presencia de estos elementos podría estar asociada a una historia evolutiva más diversa o a procesos de adaptación a condiciones ambientales específicas.

**Tabla 9.** Anotación funcional de genes con Bakta

	<b>C23</b>	<b>C24</b>	<b>CIT-107</b>	<b>CIT-79</b>	<b>CIT-73</b>	<b>CIT-58</b>	<b>CIT-32</b>	<b>039UDEC</b>
<b>tRNAs</b>	83	86	82	65	59	80	92	84
<b>tmRNAs</b>	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>rRNAs</b>	11	11	8	2	1	12	11	6
<b>ncRNAs</b>	93	102	110	93	94	103	100	82
<b>REGIONES ncRNA</b>	60	63	63	56	57	59	57	57
<b>CDS</b>	5102	5164	6072	4903	4843	4782	4832	4689
<b>PSEUDOGENES</b>	3	1	6	5	4	3	4	1
<b>HIPOTEICAS</b>	54	68	80	73	71	60	53	31
<b>GAPS</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>oriC</b>	5	4	4	3	4	2	3	4
<b>oriV</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>oriT</b>	2	2	8	3	4	4	4	3

Continuando con la tabla 9, se identificaron distintos tipos de ARNs, los cuales permiten comprender la regulación genética, síntesis proteica, traducción, entre otros (Waters & Storz, 2009). En este sentido, la cantidad de genes que codifican para ARN de transferencia (tRNAs) y ribosomal (rRNAs) varían significativamente, lo cual se asocia a una variación en la capacidad para traducir y sintetizar proteínas. Con respecto al tmRNA, que corresponde al ARN transferente-mensajero, el cual es fundamental para la degradación de mRNAs defectuosos (Mehta et al., 2006), los genomas presentan solo 1, lo cual indica que todas poseen un gen codificante para este tipo de ARN. En cuanto a los ARN no codificantes (ncRNAs y regiones ncRNAs), estos son relevantes para ciertas funciones biológicas tales como la regulación génica (Narunsky et al., 2024), en

donde a partir del análisis, se identificaron entre 82 y 110 ncRNAs, lo cual destaca diferencias con respecto a las funciones regulatorias entre las cepas.

Por último, se identificaron distintos tipos de orígenes de replicación (oriV) y transferencia (oriT), los cuales son cruciales para la replicación de plásmidos y transferencia horizontal de genes entre bacterias (Coupland et al., 1987; Pancu et al., 2021). En relación a los resultados, se encontraron entre 2 y 5 oriC (origen de replicación cromosomal) y entre 2 a 8 oriTs (origen de transferencia), lo cual, si bien es esperable, las bacterias en general contienen un solo oriC (Trojanowski et al., 2018). En contraste, los genomas no presentan origen de replicación de plásmidos (oriV).

## 1.12 Identificación de genes de resistencia

Por último, se procedió a identificar los genes de resistencia a antibióticos de los genomas ensamblados y anotados. Si bien este trabajo se enfoca en los antibióticos carbapenémicos, se puede observar en la tabla 10 que la herramienta ABRicate (Seemann, 2014/2024) hace una detección masiva de genes de resistencia.

En este sentido, se encontraron genes de resistencia a 12 grupos y/o antibióticos, tales como  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas, carbapenémicos, penicilinas), macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas, colistín, entre otros (Tabla S4). Estos genes codifican proteínas o enzimas involucradas en diversos mecanismos de resistencia a antibióticos, donde destacan la inactivación del antibiótico por hidrólisis o modificación química, modificación del sitio blanco, bombas de expulsión y *bypass* metabólico (Tabla 10).

**Tabla 10.** Genes de resistencia a antibióticos identificados en complejo *Citrobacter freundii* mediante ABRicate.

<b>Mecanismo de resistencia</b>		<b>Genes</b>	<b>Número</b>
<b>Inactivación del antibiótico</b>	<b>Hidrólisis</b>	<i>bla<sub>CMY-48</sub></i>	6
		<i>bla<sub>CMY-75</sub></i>	1
		<i>bla<sub>CMY-6</sub></i>	2
		<i>bla<sub>CMY-65</sub></i>	1
		<i>bla<sub>CTX-M-30</sub></i>	2
		<i>bla<sub>SHV-12</sub></i>	1
		<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	1
		<i>bla<sub>OXA-9</sub></i>	2
		<i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	1
		<i>bla<sub>TEM-150</sub></i>	1
	<b>Carbapenemasas</b>	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	2
		<i>bla<sub>NDM-7</sub></i>	1
		<i>bla<sub>VIM-2</sub></i>	1
		<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	4
	<b>Esterasas</b>	<i>ere(A)</i>	1
	<b>Acetiltransferasas</b>	<i>aac(6')-Ib-cr5</i>	1
		<i>aac(6')-Ib-cr7</i>	2
		<i>aac(6')-Ilc</i>	1
		<i>aac(6')-Ib</i>	4
		<i>aac(3)-II</i>	1
<i>aac(3)-IId</i>		4	
<i>sat2</i>		2	
<i>catb3</i>		1	
<b>Modificación química</b>		type A-9 chloramphenicol O-acetyltransferase	1
		<b>Fosfotransferasas</b>	<i>mph(A)</i>
	<i>mph(E)</i>	1	
	<b>Nucleotidiltransferasas</b>	<i>ANT(3'')-Ia AadA1</i>	3
		<i>ANT(3'')-Ia AadA2</i>	3
		<i>ANT(3'')-Ia aadA16</i>	4
	<b>ADP-Ribosiltransferasas</b>	<i>arr-3</i>	5
<i>variante de NAD(+)--rifampin ADP-ribosyltransferase</i>	1		
<b>Bloqueo de antibiótico</b>	<i>ble<sub>MBL</sub></i>	3	
<b>Modificación sitio blanco</b>	<b>Metiltransferasas</b>	<i>erm(B)</i>	1
	<i>arm(A)</i>	1	
	<i>rmt(C)</i>	1	
<b>Fosfoetanolamina transferasas</b>	<i>mcr9.1</i>	1	
<b>Protección sitio blanco</b>	<b>Protección ribosomal</b>	<i>msr(E)</i>	1
	<b>Protección topoisomerasas</b>	<i>qnrB19</i>	6
<b>Bombas de expulsión</b>	<i>qnrB38</i>	1	
	<i>tet(A)</i>	1	
	<i>tet(D)</i>	1	
	<i>tet(G)</i>	1	
	<i>FloR</i>	R	
<b>Bypass metabólico</b>	<i>sul1</i>	5	

<i>sul2</i> ,	1
<i>dfra1</i>	2
<i>dfra12</i>	2
<i>dfra27</i>	4

Con respecto a los mecanismos asociados a la resistencia a carbapenémicos, se identificaron 3 carbapenemasas: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>, con las variantes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub> y dos de *bla*<sub>NDM</sub> que corresponden a *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>NDM-7</sub>.

Si se consideran los resultados experimentales obtenidos (tabla 4-5, fig. 6), lo obtenido *in silico* es concordante, pero existen discrepancias en los hallazgos, dado que ciertos genes no fueron identificados con la herramienta ABRicate. Sin embargo, al unir los resultados, se puede concluir que 4 cepas portan el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, 2 cepas portan *bla*<sub>NDM-1</sub>, C23 porta *bla*<sub>NDM-7</sub> y C24 presenta una co-producción de *bla*<sub>NDM-like</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>, lo cual recalca la complejidad del problema de la resistencia a antibióticos, ya que la diversidad de mecanismos y co-producción de carbapenemasas sugiere un desarrollo de múltiples estrategias para evadir el efecto de los antibióticos (Doi et al., 2014; Quesille-Villalobos et al., 2024; Yamada et al., 2022).

## **2. Determinar la epidemiología molecular de las cepas del complejo *Citrobacter freundii* resistentes a carbapenémicos, aisladas en hospitales de Chile**

Posterior a la fase experimental y bioinformática para la identificación de genes de resistencia a antibióticos, se procedió finalmente a realizar los análisis para determinar la epidemiología molecular mediante la asignación de ST y construcción de un árbol filogenético.

### **2.1 Determinación de secuenciotipos (STs)**

En primer lugar, se determinó el ST de los genomas ensamblados en el objetivo 1. Para esto se utilizó la herramienta pubMLST (<https://pubmlst.org/cfreundii>), de la cual se obtiene un perfil único basado en la combinación de alelos presentes

en 7 genes *housekeeping* analizados (tabla 11). Los genes establecidos universalmente para la asignación de STs para cepas de *C. freundii* están involucrados en funciones necesarias para la supervivencia y proliferación.

**Tabla 11.** Determinación de ST utilizando el esquema MLST de *C. freundii* basada en 7 genes housekeeping: *asp*, *clpX*, *fadD*, *mdh*, *arcA*, *dnaG* y *lysP*.

<b>Cepa</b>	<b>ST</b>	<b><i>asp(C)</i></b>	<b><i>clpX</i></b>	<b><i>fadD</i></b>	<b><i>mdh</i></b>	<b><i>arcA</i></b>	<b><i>dnaG</i></b>	<b><i>lysP</i></b>
<i>C23</i>	22	15	12	20	15	5	11	17
<i>C24</i>	661	15	12	20	15	5	11	218
<i>039UDEC</i>	169	80	10	56	13	7	6	61
<i>CIT-107</i>	112	26	5	69	15	5	54	17
<i>CIT-79</i>	22	15	12	20	15	5	11	17
<i>CIT-73</i>	22	15	12	20	15	5	11	17
<i>CIT-58</i>	22	15	12	20	15	5	11	17
<i>CIT-32</i>	22	15	12	20	15	5	11	17

Como se observa en la tabla 11, las cepas pertenecen a distintos STs, donde destaca el ST22. Además, se determinó un ST no descrito anteriormente para *C. freundii*, que corresponde al ST661.

## 2.2 Alineamiento del core-genome

Para la construcción del árbol filogenético, en primer lugar, se realizó la construcción del *core-genome*. Para esto, se utilizaron los 8 genomas

ensamblados previamente, junto con 50 genomas obtenidos de bases de datos, y un genoma de referencia, y esto se llevó a cabo empleando la herramienta Roary (Galaxy Version 3.13.0) del cual se obtuvo una tabla resumen de estadísticas (Page et al., 2015) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Distribución de genes en el pangenoma de genomas del complejo *C. freundii*.

<b>GENES</b>	<b>N°</b>
<b>CORE GENES</b>	(99% <= strains <= 100%) 2229
<b>SOFT CORE GENES</b>	(95% <= strains < 99%) 644
<b>SHELL GENES</b>	(15% <= strains < 95%) 3424
<b>CLOUD GENES</b>	(0% <= strains < 15%) 19560
<b>TOTAL GENES</b>	(0% <= strains <= 100%) 25857

De la construcción, se categorizaron 4 grupos de genes, lo cual permite identificar cuales están presentes en todas las cepas (*core*) y los que corresponden a grupos específicos de ciertas cepas o fueron adquiridos, y conforman el genoma accesorio (*shell* y *cloud*). Con respecto al *core-genome*, este se compone de 2229 genes, que corresponden a los genes alineados que se emplearon para la identificación de SNPs a partir del archivo de salida del alineamiento del *core-genome*, empleando la herramienta FindSNPs (Galaxy Version 2.5.1) (Page et al., 2016).

## 2.3 Construcción de árbol filogenético

Luego de identificar los SNPs, se construyó el árbol filogenético con IQ-TREE para posteriormente visualizarlo con iTOL (Letunic & Bork, 2021; Minh et al., 2020). Al igual que los genomas procesados previamente, los genomas descargados para la construcción del árbol fueron sometidos al procesamiento que abarcó la anotación, asignación de STs e identificación de genes de resistencia a antibióticos (Tabla S5-S6).

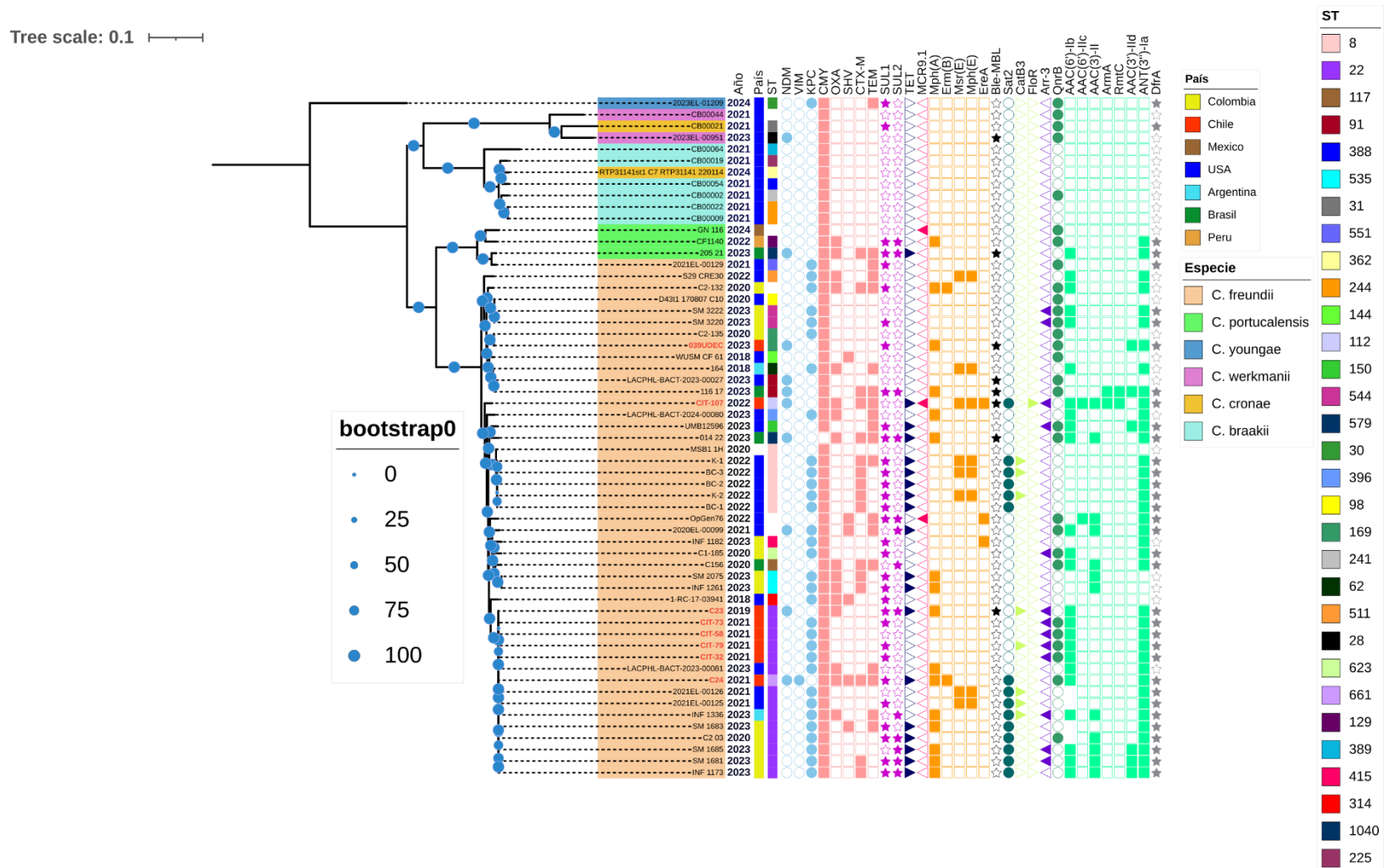
Como se observa en la figura 7, el árbol filogenético revela las relaciones evolutivas entre las cepas analizadas, y proporciona una representación clara de cómo se relacionan entre sí. Previo al análisis del árbol, se revisaron los parámetros estadísticos, donde los valores de los *bootstraps*, que indican cuán confiables son los nodos, presentaron valores de 100, lo que implica un fuerte respaldo para la mayoría de los clados (Hoang et al., 2018; Minh et al., 2013).

La construcción del árbol permitió también presentar una amplia variedad de metadata disponible, lo cual es fundamental para englobar los resultados obtenidos. Dentro de estos datos, se encuentra el año, donde se observa que los genomas analizados fueron publicados entre los años 2019 y 2023. Si bien el año en que se aislaron las muestras no es exacta, permiten relacionar la evolución con la adquisición de genes y la diseminación, ya que además se están comparando genomas provenientes de 7 países de América, donde en azul se remarcan las cepas trabajadas en esta investigación, que corresponden a los 8 genomas provenientes de Chile.

Con respecto a los clados, en el árbol se forma un clúster que está compuesto por cepas que corresponden al ST22 (en rojo), junto con la cepa C24, que es ST661, las cuales provienen de Chile, Argentina, Colombia y Estados Unidos, respectivamente, lo cual sugiere una posible diseminación de esta variante genética entre poblaciones. Por otro lado, la cepa C24 difiere de las otras en cuanto a su ST.

De los genes de resistencia, los genomas utilizados presentan también una gran cantidad de genes de resistencia a distintos antibióticos, desde  $\beta$ -lactámicos hasta colistín, y se destaca que la mayoría de estos portan *bla*<sub>KPC</sub>, mientras que las cepas más recientes portan metalo- $\beta$ -lactamasas. Esto remarca la alta prevalencia de cepas productoras de *bla*<sub>KPC</sub>, y también sugiere un posible aumento reciente en la frecuencia de metalo- $\beta$ -lactamasas, principalmente *bla*<sub>NDM</sub>.

En contraste, 2 cepas analizadas en este estudio, que corresponden a las cepas CIT-107 y 039UDEC, se encuentran separadas en diferentes clados. 039UDEC está agrupada con una proveniente de Colombia en un mismo clúster y corresponden al ST169. Con respecto a CIT-107, forma parte de un clado más interno y se genera una sola rama. Al comparar los resistomas, se observa que la cepa CIT-107 presenta la mayor cantidad de genes de resistencia con respecto a los otros genomas, denotando una alta posibilidad de que esa es la razón por la cual no se agrupó con otras cepas.



**Figura 7. Árbol filogenético basado en polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs).** El alineamiento se ejecutó en Roary, la construcción del árbol el análisis se llevó a cabo por el método de máxima similitud en IQ-Tree, utilizando MSB1\_1H como genoma de referencia. La visualización se realizó con la herramienta iTOL.

## DISCUSIÓN

La resistencia a antibióticos es una de las mayores preocupaciones para la salud a nivel mundial, razón por la cual la OMS publica el listado de patógenos prioritarios resistentes a antibióticos. Dentro de este, en el grupo crítico destacan las Enterobacterales resistentes a carbapenémicos, orden donde se encuentra *Citrobacter freundii*, especie de la cual se han reportado cepas resistentes a carbapenémicas portadoras de carbapenemasas en diversos países del mundo.

Como se menciona anteriormente, a la fecha, en nuestro país no hay data publicada o reportes sobre *C. freundii* resistente a carbapenémicos, a pesar de su creciente relevancia como patógeno oportunista. Por esta razón los objetivos de este trabajo contemplan un análisis microbiológico, molecular y genómico, con el fin de aportar información para la vigilancia y manejo clínico de estas.

En este estudio, se analizaron 27 cepas del complejo *C. freundii* provenientes de muestras de vigilancia realizada en 13 hospitales de Chile (tabla S1), aisladas entre los años 1998 y 2023. Los análisis de ERIC-PCR revelaron patrones de agrupamiento, generando 5 clústeres compuestos por 3 a 4 cepas con un nivel de similitud genética superior al 80%. Si bien no se consideran clones, estas pueden estar relacionadas con un ancestro común, y las modificaciones en los patrones de bandas se puede asociar a diferencias genéticas por mutaciones o adquisición de elementos genéticos móviles. Cabe destacar que 4 de los clústeres generados están compuestos por cepas provenientes de hospitales diferenciados que incluso corresponden a distintas regiones del país, y además algunas fueron aisladas en años diferentes. Si bien esta técnica no es el “*gold standard*” y tiene menor resolución que otras técnicas para la tipificación, es una herramienta útil para proporcionar una base inicial de las relaciones genéticas entre las cepas (Ranjbar et al., 2017). En este sentido, los hallazgos son relevantes, ya que sugieren una circulación continua, reintroducción de estas o incluso la adquisición de genes de resistencia, y también una posible cadena epidemiológica compleja que refleja la movilidad y propagación.

De las cepas analizadas en este estudio, ocho habían sido reportadas como productoras de carbapenemasas, por lo tanto, los perfiles de susceptibilidad

obtenidos por antibiograma frente a carbapenémicos son consistentes con los informes previos. Por otro lado, el alto porcentaje de cepas resistentes a cefalosporinas se puede asociar al uso excesivo de cefalosporinas de segunda y tercera generación a lo largo de los años. Sin embargo, la resistencia a IMP y MEM es relevante, puesto que las cepas que son resistentes a estos son las cepas más actuales (aisladas en 2021-2023), lo cual remarca la presión de selección asociada al uso de antibióticos y la adquisición de genes de resistencia.

Si bien con el antibiograma se obtiene información relevante sobre el perfil de susceptibilidad, lo que interesa para este estudio son los mecanismos de resistencia a carbapenémicos, principalmente la producción de carbapenemasas (Queenan & Bush, 2007). Por esta razón, se realizaron pruebas colorimétricas y moleculares para identificarlas, y se logra observar una concordancia entre los resultados obtenidos del antibiograma y Blue Carba, donde las cepas resistentes a carbapenémicos fueron carbapenemasa positivas. Si bien esta técnica es poco usada debido a menor sensibilidad, su especificidad permite obtener resultados confiables.

Por otro lado, se realizaron test de cromatografía y PCR convencional para finalmente determinar qué gen codificador de esta carbapenemasa porta cada cepa, y se encontraron 3 carbapenemasas, de las cuales 2 corresponden a metalo- $\beta$ -lactamasas: *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>NDM</sub>, y otra correspondiente a una carbapenemasa de clase A, *bla*<sub>KPC</sub>. Estos resultados en primer lugar respaldan el informe previo recibido, donde se reportaba la producción de estas carbapenemasas, y también coinciden con la literatura, donde si bien los estudios realizados en Chile no se enfocan en *C. freundii*, corresponden a investigaciones de distintas especies portadoras de este tipo de carbapenemasas, como por ejemplo, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (Elena et al., 2024, 2024; Gálvez-Silva et al., 2024; Opazo-Capurro et al., 2019, 2024; Veloso et al., 2023). En Chile, se ha observado que las carbapenemasas de mayor prevalencia corresponden a variantes de KPC y VIM, las cuales están circulando en nuestro país desde el 2012 (ISP, 2023), y han ido en aumento hasta la actualidad. Por lo tanto, este estudio recalca la persistencia de carbapenemasas prevalentes a lo largo del tiempo, además de la existencia de patrones de diseminación entre especies y la relevante variabilidad de enzimas carbapenemasas circulantes en nuestro país.

Sumado a esto, las PCR revelaron la co-producción de metalo- $\beta$ -lactamasas en la cepa C24, lo cual confiere resistencia a un mayor espectro de antibióticos, limitando las opciones terapéuticas. Además, facilita la transmisión horizontal de genes, por lo que aumenta el riesgo de propagarse, y también implica una mayor capacidad de adaptación. Si bien este no es un evento común, en los últimos años se han reportado diversas cepas de este tipo, principalmente en el ambiente hospitalario (Doi et al., 2014; Yamada et al., 2022).

Una vez analizados los resultados del antibiograma, se observó que la cepa CIT-107 corresponde a una cepa multirresistente (MDR), ya que es resistente a  $\beta$ -lactámicos, combinación de  $\beta$ -lactámicos con inhibidor, aminoglucósidos, fluoroquinolonas y cotrimoxazol (Magiorakos et al., 2012). Aunque los carbapenémicos se consideran como tratamiento de última línea, existen otras opciones para casos extremos, que corresponden a tigeciclina y colistín. Considerando el perfil de resistencia de esta cepa, se realizó la determinación de CMI para ambos. De los resultados obtenidos, la cepa es susceptible a ambos, con una CMI menor a 0.5 y 0.25  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente (tabla 6). En el caso de tigeciclina, si se compara la CMI de la cepa con el control, se calcula un aumento de 4 veces la CMI, pero sigue siendo susceptible al antibiótico, por lo tanto, la cepa se encuentra dentro de los límites de susceptibilidad establecidos. Cabe

destacar, que los rangos establecidos por las guías clínicas pueden ser modificados, por lo cual siempre es importante monitorear la susceptibilidad.

En este estudio, además de técnicas experimentales, se emplearon herramientas bioinformáticas para, en primer lugar, identificar los genes de resistencia que portan las cepas. Los genomas con los que se llevó a cabo el análisis tienen un tamaño de 5-6 Mb aproximadamente. Al comparar con genomas disponibles en bases de datos como GenBank, se determina que son de tamaño similar, lo cual en primera instancia indica que la secuenciación se llevó a cabo de manera correcta y que no hubo presencia de material genético extraño en las muestras procesadas. Con respecto al ensamble, los valores de N<sub>50</sub> son variados y van desde los 99 a 268 Kb, denotando una diferencia en la calidad de ensamble de cada genoma, lo cual también se refleja en el número de contigs de cada genoma, donde un mayor N<sub>50</sub> denota menor fragmentación, por lo que los contigs son más largos. Con respecto al %GC, los obtenidos coinciden con los de genomas disponibles en bases de datos, y también con el genoma de referencia de *C. freundii*, MSB1\_1H. Considerando que los análisis de contaminación, fastANI y JspeciesWS dieron resultados positivos, con una contaminación menor al 3%, similitud de 98% con el genoma de referencia y un

TCS con z-score de 0.999, estos indican una buena calidad de ensamble en general.

Sin embargo, al identificar los genes de resistencia con ABRicate, hubo genomas donde no se lograron encontrar los genes que codifican carbapenemasas, que sí fueron determinados con las PCR. Los genomas corresponden a las cepas C24, y CIT-32, donde los parámetros de calidad indican una calidad media. Sumado a esto, al revisar los resultados de BUSCO, se observa que los genomas presentan BUSCOS fragmentados o perdidos. Esto se puede asociar a diversos factores, tales como la eliminación de regiones de baja calidad en el proceso de *trimming*, algún error durante el ensamble o incluso un fallo en la secuenciación, ya que, si bien la contaminación y completitud de los genomas es adecuado, se plantea la posibilidad de que en ese reducido porcentaje se haya producido una pérdida de información genética relevante. En este sentido, las técnicas moleculares permitieron corroborar la información obtenida de los análisis bioinformáticos, y también obtener información relevante para esta investigación.

Con respecto a los genes de resistencia identificados con ABRicate, en primera instancia los resultados coinciden con lo observado *in vitro* referente a las carbapenemasas. De los resistomas obtenidos, estos varían entre cada genoma, donde estos portan entre 6 a 21 genes asociados a distintos mecanismos de resistencia. En el caso de CIT-107, esta tiene el resistoma más grande, y con el antibiograma se categorizó como MDR, por lo cual el resultado es consistente con lo previsto.

De las carbapenemasas identificadas, estas corresponden a las variantes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-7</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub>. Como se menciona anteriormente, estas son altamente relevantes, ya que se encuentran entre las carbapenemasas más prevalentes no solo en Chile, sino a nivel mundial, principalmente en clínica, donde *bla*<sub>KPC-2</sub> es una de las más comunes, mientras que *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>NDM-7</sub> se asocian con una capacidad de propagación rápida. Con respecto a *bla*<sub>VIM-2</sub>, su detección remarca la diversidad de mecanismos que se pueden encontrar en cepas del complejo *C. freundii*. Sumado a esto, se encontró una cepa co-portadora de dos metalo-β-lactamasas, *bla*<sub>VIM-2</sub> y *bla*<sub>NDM-like</sub>, lo cual es poco común, puesto que hay más reportes de cepas co-productoras de *bla*<sub>NDM-KPC</sub> o *bla*<sub>KPC-VIM</sub> (Gálvez-Silva et al., 2024; Mojica et al., 2023.; Quesille-Villalobos et al., 2024). Sin embargo, esta co-producción puede conferir resistencia a la mayoría

de los  $\beta$ -lactámicos, y si se considera también su alta capacidad de propagación, es una posible amenaza para la salud. Por otro lado, cabe destacar que, si bien se destaca una diversidad de mecanismos, cada grupo de carbapenemasas presenta una capacidad de hidrólisis diferente para los antibióticos, donde, por ejemplo, *bla*<sub>KPC</sub> tiene capacidad de hidrolizar antibióticos como aztreonam, mientras que las MBL no actúan sobre aztreonam ni ácido clavulánico (Queenan & Bush, 2007). Además, los fenotipos resistentes requieren combinación de mecanismos de resistencia que no son considerados en este estudio, tales como la permeabilidad de la membrana externa y la expresión de bombas de eflujo (Aurilio et al., 2022), por lo tanto, conocer el tipo de carbapenemasa y variante es relevante para la comprensión del comportamiento de las cepas, pero también es necesario profundizar en otros mecanismos que contribuyan a la resistencia a carbapenémicos y otros  $\beta$ -lactámicos.

Para realizar el análisis epidemiológico, en primer lugar, se determinaron los STs de los genomas. Como se puede observar en la tabla 11, destaca el ST22, el cual ha sido descrito previamente por diversos autores, al igual que el ST169 y ST112, los cuales han sido reportados en múltiples regiones del mundo, incluyendo países de Asia, Europa y África (fig.1) (Biez et al., 2023; Jolivet et al., 2024; Lalaoui et al., 2019; Nobrega et al., 2023; Riccobono et al., 2023), donde las

cepas portan distintas carbapenemasas, principalmente *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>KPC</sub>. Tal como describe Nobrega y colaboradores en el estudio de epidemiología molecular, ST22 circula en casi todo el mundo, excepto Estados Unidos. Considerando que en este trabajo el ST22 predomina dentro de los genomas analizados, los análisis sugieren una fuerte diseminación global, que además se respalda con los genes que portan estos clones, donde al igual que en el estudio, predomina el ST22 con *bla*<sub>KPC-2</sub>. Cabe destacar, que debido a su alta diseminación global y multirresistencia, ST22 se considera un clon de alto riesgo, lo cual, es sumamente relevante para esta investigación.

Por otro lado, la cepa C24 pertenece al ST661, del cual no hay data publicada que describa este ST para este género y especie, lo cual es un hallazgo relevante para esta investigación. Sumado a esto, al analizar el árbol filogenético, se observa que C24 se encuentra en el clado junto a 5 genomas estudiados en este trabajo y genomas provenientes de USA, Colombia y Argentina, que también son clon ST22. Considerando que son de STs diferentes, al revisar los alelos de los genes *housekeeping*, se observa que esta cepa difiere solo en el alelo *lysP* con el ST22, lo cual sugiere diversidad alélica que se puede asociar a alguna mutación puntual o transferencia horizontal de genes.

Con respecto a los otros 2 genomas estudiados, se observan dos situaciones que difieren de lo anterior, en donde 039UDEEC conforma un clado con otra cepa proveniente de Colombia, que si bien fueron obtenidas en años distintos, corresponden al mismo ST, pero portan distintas carbapenemasas (*bla<sub>KPC</sub>* y *bla<sub>NDM</sub>*), lo cual si bien remarca una vez más la propagación de estos clones, la divergencia en los genes refleja la diseminación de los genes y la capacidad de adquisición de estos por transferencia horizontal de genes. Además, la diferencia en el origen de estas cepas se puede asociar a las diferencias en el manejo clínico en estos países, lo cual lleva a la presión selectiva dependiendo de los tratamientos que se utilizan en los establecimientos clínicos, según lo instaurado por las entidades correspondientes de cada nación.

Por otro lado, se tiene CIT-107 que se encuentra en una rama que surge de un nodo más interno. Esta cepa es ST112, y es la única del árbol que corresponde a ese ST. Por otra parte, además de portar *bla<sub>NDM</sub>*, esta cepa porta el gen *mcr9.1*, un gen móvil de resistencia a colistín, variante descrita en 2019 (Carroll et al., 2019). De los reportes con respecto a esta variante, se ha observado un aumento significativo en la CMI al clonar cepas susceptibles, hecho que no se detectó en este estudio. Sin embargo, la relevancia de este hallazgo es la capacidad de las cepas de adquirir este gen, ya que se encuentra en plásmidos, y es necesario

estudiar la transferencia horizontal de estos genes y el impacto en la CMI (Kieffer et al., 2019; Ling et al., 2020). Por otro lado, su posición en el árbol filogenético sugiere que proviene de un ancestro común más antiguo, o que ha tenido una evolución independiente, lo cual se puede asociar a diversos factores, tales como mutaciones puntuales, presión selectiva, transferencia horizontal de genes, entre otros.

En conjunto, este estudio proporciona una visión detallada sobre la resistencia a carbapenémicos en cepas del complejo *Citrobacter freundii* aisladas en hospitales de nuestro país, destacando la prevalencia de carbapenemasas *bla*<sub>KPC</sub> y *bla*<sub>NDM</sub>, basándose en técnicas de microbiología convencional, biología molecular y herramientas bioinformáticas, lo cual recalca la importancia de la multidisciplinariedad al momento de realizar un estudio epidemiológico. Además, este estudio refuerza la importancia de monitorear la evolución de estos patógenos, y corresponde al primer reporte enfocado en *C. freundii* resistente a carbapenémicos en nuestro país.

## CONCLUSIÓN

Este estudio proporciona una caracterización detallada de las cepas del complejo *C. freundii* aisladas en hospitales de Chile, revelando la presencia de genes de carbapenemasas *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>VIM</sub>, asociadas a una notable diversidad genética y patrones de resistencia a múltiples antibióticos, donde los mecanismos son complejos, haciendo indispensable la implementación de técnicas moleculares y de herramientas bioinformáticas para su identificación. Además, este es el primer estudio epidemiológico, donde se identificaron múltiples secuenciotipos, destacando el ST22, que ha sido reportado previamente como clon de alto riesgo a nivel internacional, y también, mediante la construcción del árbol filogenético, se puede observar la relación genética entre cepas aisladas en Chile y otros países de América, información crucial para comprender la evolución y variabilidad genética asociada a la propagación de genes. Con base en estos resultados, **se acepta parcialmente la hipótesis planteada.**

Estos hallazgos subrayan la importancia de la vigilancia epidemiológica para monitorizar la diseminación y evolución de las cepas y perfiles de resistencia, lo

cual es crucial para mejorar las estrategias de control y vigilancia de infecciones hospitalarias.

Finalmente, se requieren más investigaciones para analizar en profundidad los plásmidos presentes en estas cepas, los genes presentes en ellos y su capacidad para ser transferidos, ya que esto es clave para comprender la dinámica de la resistencia y la propagación horizontal de genes. Además, los resultados abren nuevas perspectivas para futuras investigaciones sobre la epidemiología molecular de *Citrobacter freundii*, destacando la necesidad de continuar monitoreando estas cepas para conocer su impacto en la salud pública.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acman, M., Wang, R., van Dorp, L., Shaw, L. P., Wang, Q., Luhmann, N., Yin, Y., Sun, S., Chen, H., Wang, H., & Balloux, F. (2022). Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene bla<sub>NDM</sub>. *Nature Communications*, 13, 1131. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28819-2>
- Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & S Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the «Enterobacteriales»: Proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12), 5575-5599. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>
- Aguilar-Bultet, L., & Falquet, L. (2015). Secuenciación y ensamblaje de novo de genomas bacterianos: Una alternativa para el estudio de nuevos patógenos. *Revista de Salud Animal*, 37(2), 125-132.
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh,

- B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D517-D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Andrews, S. (2010). *FASTQC. A quality control tool for high throughput sequence data* | *BibSonomy*. <https://www.bibsonomy.org/bibtex/f230a919c34360709aa298734d63dca3>
- Arana, D. M., Ortega, A., González-Barberá, E., Lara, N., Bautista, V., Gómez-Ruíz, D., Sáez, D., Fernández-Romero, S., Aracil, B., Pérez-Vázquez, M., Campos, J., Oteo, J., & Spanish Antibiotic Resistance Surveillance Programme Collaborating Group. (2017). Carbapenem-resistant *Citrobacter* spp. Isolated in Spain from 2013 to 2015 produced a variety of carbapenemases including VIM-1, OXA-48, KPC-2, NDM-1 and VIM-2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3283-3287. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx325>
- Arens, S., & Verbist, L. (1997). Differentiation and susceptibility of *Citrobacter* isolates from patients in a university hospital. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 3(1), 53-57. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.1997.tb00251.x>
- Arumugham VB, Gujarathi R, & Cascella M. (2024). Third generation Cephalosporins. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>

- Aurilio, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L. G., Coppolino, F., Barbarisi, A., Passavanti, M. B., & Pace, M. C. (2022). Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics*, *11*(3), 421. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030421>
- Baggio, D., & Ananda-Rajah, M. R. (2021). Fluoroquinolone antibiotics and adverse events. *Australian Prescriber*, *44*(5), 161-164. <https://doi.org/10.18773/austprescr.2021.035>
- Balakirev, E. S., & Ayala, F. J. (2003). Pseudogenes: Are They “Junk” or Functional DNA? *Annual Review of Genetics*, *37*(Volume 37, 2003), 123-151. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.040103.103949>
- Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L., Arias Andrés, M., Barrantes Jiménez, K., Chacón Jiménez, L., & Arias Andrés, M. (2022). El impacto de la resistencia a los antibióticos en el desarrollo sostenible. *Población y Salud en Mesoamérica*, *19*(2), 305-329. <https://doi.org/10.15517/psm.v0i19.47590>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Research*, *41*(Database issue), D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Biez, L., Bonnin, R. A., Emeraud, C., Birer, A., Jousset, A. B., Naas, T., & Dortet, L. (2023). Nationwide molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Citrobacter* spp. in France in 2019 and 2020. *mSphere*, *8*(6), e0036623. <https://doi.org/10.1128/msphere.00366-23>
- Block, M., & Blanchard, D. L. (2024). Aminoglycosides. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541105/>

- 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>
- Brenner, D. J., Grimont, P. A., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Ageron, E., & Riddle, C. F. (1993). Classification of citrobacteria by DNA hybridization: Designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *43*(4), 645-658. <https://doi.org/10.1099/00207713-43-4-645>
- Brescini, L., Morroni, G., Valeriani, C., Castelletti, S., Mingoia, M., Simoni, S., Masucci, A., Montalti, R., Vivarelli, M., Giacometti, A., & Barchiesi, F. (2019). Clinical and epidemiological characteristics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in a tertiary referral center in Italy. *BMC Infectious Diseases*, *19*, 611. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4268-9>
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(6), 1211-1233.
- Carrasco-Anabalón, S., Conceição Neto, C. O., D'Alincourt Carvalho-Assef, A. P., Lima, C. A., Cifuentes, M., Silva, F., Barrera, B., Domínguez, M., González-Rocha, G., & Bello-Toledo, H. (2019). Introduction of NDM-1 and OXA-370 from Brazil into Chile in strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a single patient. *International Journal of Infectious Diseases: IJID: Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, *81*, 28-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.051>

- Carroll, L. M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L. O., & Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*, *10*(3), e00853-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.00853-19>
- Chen, R., Wang, G., Wang, Q., Zhang, M., Wang, Y., Wan, Z., Si, Z., Bai, Y., Song, Z., Lu, X., & Hao, Y. (2023). Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* from urinary tract infections in Shandong, China. *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, *26*(4), 1157-1166. <https://doi.org/10.1007/s10123-023-00369-7>
- Chi, X., Guo, J., Zhou, Y., Xiao, T., Xu, H., Lv, T., Chen, C., Chen, J., & Zheng, B. (2020). Complete-Genome Sequencing and Comparative Genomic Characterization of an IMP-4 Producing *Citrobacter freundii* Isolate from Patient with Diarrhea. *Infection and Drug Resistance*, *13*, 1057-1065. <https://doi.org/10.2147/IDR.S244683>
- Chinemerem Nwobodo, D., Ugwu, M. C., Oliseloke Anie, C., Al-Ouqaili, M. T. S., Chinedu Ikem, J., Victor Chigozie, U., & Saki, M. (2022). Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, *36*(9), e24655. <https://doi.org/10.1002/jcla.24655>
- Chow, J. W., Yu, V. L., & Shlaes, D. M. (1994). Epidemiologic perspectives on *Enterobacter* for the infection control professional. *American Journal of Infection Control*, *22*(4), 195-201. [https://doi.org/10.1016/0196-6553\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0196-6553(94)90067-1)
- Clermont, D., Motreff, L., Passet, V., Fernandez, J.-C., Bizet, C., & Brisse, S. (2015). Multilocus sequence analysis of the genus *Citrobacter* and description of

- Citrobacter pasteurii sp. Nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(Pt 5), 1486-1490. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000122>
- CLSI. (2024). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 12th ed.
- CLSI. (2024). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 34th ed. Clinical & Laboratory Standards Institute. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
- Codjoe, F. S., Brown, C. A., Smith, T. J., Miller, K., & Donkor, E. S. (2019). Genetic relatedness in carbapenem-resistant isolates from clinical specimens in Ghana using ERIC-PCR technique. *PLoS ONE*, 14(9), e0222168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222168>
- Coupland, G. M., Brown, A. M. C., & Willetts, N. S. (1987). The origin of transfer (oriT) of the conjugative plasmid R46: Characterization by deletion analysis and DNA sequencing. *Molecular and General Genetics MGG*, 208(1), 219-225. <https://doi.org/10.1007/BF00330445>
- de Lamballerie, X., Zandotti, C., Vignoli, C., Bollet, C., & de Micco, P. (1992). A one-step microbial DNA extraction method using “Chelex 100” suitable for gene amplification. *Research in Microbiology*, 143(8), 785-790. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(92\)90107-Y](https://doi.org/10.1016/0923-2508(92)90107-Y)
- Di Giovanni GD, null, Watrud, L. S., Seidler, R. J., & Widmer, F. (1999). Comparison of Parental and Transgenic Alfalfa Rhizosphere Bacterial Communities Using Biolog GN Metabolic Fingerprinting and Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

Sequence-PCR (ERIC-PCR). *Microbial Ecology*, 37(2), 129-139.

<https://doi.org/10.1007/s002489900137>

Doern, C. D. (2024). Chapter 2—Classification of medically important bacteria. En Y.-W.

Tang, M. Y. Hindiye, D. Liu, A. Sails, P. Spearman, & J.-R. Zhang (Eds.), *Molecular Medical Microbiology (Third Edition)* (pp. 9-21). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818619-0.00029-0>

Doi, Y., O'Hara, J. A., Lando, J. F., Query, A. M., Townsend, B. M., Pasculle, A. W., & Muto,

C. A. (2014). Co-Production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*.

*Emerging Infectious Diseases*, 20(1), 163-165.

<https://doi.org/10.3201/eid2001.130904>

Doi, Y., Wachino, J., & Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside Resistance. *Infectious disease*

*clinics of North America*, 30(2), 523-537. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>

Dos Santos, P. A. S., Rodrigues, Y. C., Marcon, D. J., Lobato, A. R. F., Cazuza, T. B.,

Gouveia, M. I. M., Silva, M. J. A., Souza, A. B., Lima, L. N. G. C., Quaresma, A. J. P.

G., Brasiliense, D. M., & Lima, K. V. B. (2023). Endemic High-Risk Clone ST277 Is

Related to the Spread of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* during the

COVID-19 Pandemic Period in Northern Brazil. *Microorganisms*, 11(8), 2069.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11082069>

Doyle, R. M., O'Sullivan, D. M., Aller, S. D., Bruchmann, S., Clark, T., Coello Pelegrin, A.,

Cormican, M., Diez Benavente, E., Ellington, M. J., McGrath, E., Motro, Y., Phuong

Thuy Nguyen, T., Phelan, J., Shaw, L. P., Stabler, R. A., van Belkum, A., van Dorp, L.,

Woodford, N., Moran-Gilad, J., ... Harris, K. A. (2020). Discordant bioinformatic

predictions of antimicrobial resistance from whole-genome sequencing data of

bacterial isolates: An inter-laboratory study. *Microbial Genomics*, 6(2), e000335.  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.000335>

Dziri, R., Kuşkuçcu, M. A., Arfaoui, A., Fethi, M., Ifaoui, S., Bellaaj, R., Ouzari, I., Saltoğlu, N., & Klibi, N. (2022). Whole Genome Sequencing of a *Citrobacter freundii* Strain Isolated from the Hospital Environment: An Extremely Multiresistant NDM-1 and VIM-48 Coproducing Isolate. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 28(1), 18-22. <https://doi.org/10.1089/mdr.2020.0417>

Ederer, G. M., & Clark, M. (1970). Motility-Indole-Ornithine Medium. *Applied Microbiology*, 20(5), 849-850.

Elena, A., Cejas, D., Gutkind, G., & Radice, M. (2024). Genomic characterization of *bla*VIM-11-harboring plasmids recovered from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 36, 190-192.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.12.014>

Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241-263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>

Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., & Klimke, W. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, 11(1), 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>

Feldgarden, M., Brover, V., Haft, D. H., Prasad, A. B., Slotta, D. J., Tolstoy, I., Tyson, G. H., Zhao, S., Hsu, C.-H., McDermott, P. F., Tadesse, D. A., Morales, C., Simmons, M.,

- Tillman, G., Wasilenko, J., Folster, J. P., & Klimke, W. (2019). Validating the AMRFinder Tool and Resistance Gene Database by Using Antimicrobial Resistance Genotype-Phenotype Correlations in a Collection of Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(11), e00483-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00483-19>
- Felici, A., Amicosante, G., Oratore, A., Strom, R., Ledent, P., Joris, B., Fanuel, L., & Frère, J. M. (1993). An overview of the kinetic parameters of class B beta-lactamases. *Biochemical Journal*, 291(Pt 1), 151-155.
- Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., & Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, 8(1), 000748. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>
- François, M., Hanslik, T., Dervaux, B., Le Strat, Y., Souty, C., Vaux, S., Maugat, S., Rondet, C., Sarazin, M., Heym, B., Coignard, B., & Rossignol, L. (2016). The economic burden of urinary tract infections in women visiting general practices in France: A cross-sectional survey. *BMC Health Services Research*, 16, 365. <https://doi.org/10.1186/s12913-016-1620-2>
- Furuno, M., Kasukawa, T., Saito, R., Adachi, J., Suzuki, H., Baldarelli, R., Hayashizaki, Y., & Okazaki, Y. (2003). CDS Annotation in Full-Length cDNA Sequence. *Genome Research*, 13(6b), 1478-1487. <https://doi.org/10.1101/gr.1060303>
- Gaibani, P., Ambretti, S., Farruggia, P., Bua, G., Berlingeri, A., Tamburini, M. V., Cordovana, M., Guerra, L., Mazzetti, M., Roncarati, G., Tenace, C., Moro, M. L., Gagliotti, C., Landini, M. P., & Sambri, V. (2013). Outbreak of *Citrobacter freundii* carrying VIM-1

in an Italian Hospital, identified during the carbapenemases screening actions, June 2012. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(9), e714-e717.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.02.007>

Galan-Sanchez, F., Ruiz del Castillo, B., Marin-Casanova, P., & Rodriguez-Iglesias, M.

(2012). Caracterización de blaOXA-48 detectada en cepas clínicas de *Enterobacter cloacae* aisladas en el sur de España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(9), 584-585. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.05.002>

Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Rossolini, G. M., Spencer, J., Dideberg, O., Frère, J.-M., &

Group†, T. M.-β-L. W. (2001). Standard Numbering Scheme for Class B β-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(3), 660.

<https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.660-663.2001>

Gálvez-Silva, M., Arros, P., Berríos-Pastén, C., Villamil, A., Rodas, P. I., Araya, I., Iglesias,

R., Araya, P., Hormazábal, J. C., Bohle, C., Chen, Y., Gan, Y.-H., Chávez, F. P.,

Lagos, R., & Marcoleta, A. E. (2024). Carbapenem-resistant hypervirulent ST23

*Klebsiella pneumoniae* with a highly transmissible dual-carbapenemase plasmid

in Chile. *Biological Research*, 57, 7. <https://doi.org/10.1186/s40659-024-00485-2>

García-Betancur, J. C., Appel, T. M., Esparza, G., Gales, A. C., Levy-Hara, G., Cornistein,

W., Vega, S., Nuñez, D., Cuellar, L., Bavestrello, L., Castañeda-Méndez, P. F.,

Villalobos-Vindas, J. M., & Villegas, M. V. (2021). Update on the epidemiology of

carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-*

*infective Therapy*, 19(2), 197-213. <https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813023>

- Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QAST: Quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Gutiérrez-Gutiérrez, B., & Rodríguez-Baño, J. (2019). Current options for the treatment of infections due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in different groups of patients. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(8), 932-942. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.030>
- Hajna, A. A. (1945). Triple-Sugar Iron Agar Medium for the Identification of the Intestinal Group of Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 49(5), 516-517.
- Hall, B., & Barlow, M. (2006). Phylogenetic Analysis as a Tool in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. *Annals of epidemiology*, 16, 157-169.  
<https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2005.04.010>
- Hammoudi Halat, D., & Ayoub Moubareck, C. (2020). The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 9(4), 186.  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9040186>
- Hardiman, C. A., Weingarten, R. A., Conlan, S., Khil, P., Dekker, J. P., Mathers, A. J., Sheppard, A. E., Segre, J. A., & Frank, K. M. (2016). Horizontal Transfer of Carbapenemase-Encoding Plasmids and Comparison with Hospital Epidemiology Data. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4910-4919.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00014-16>
- Heather, J. M., & Chain, B. (2016). The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*, 107(1), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>

- Heljanko, V., Johansson, V., Räisänen, K., Anttila, V.-J., Lyytikäinen, O., Jalava, J., Weijo, I., Lehtinen, J.-M., Lehto, K.-M., Lipponen, A., Oikarinen, S., Pitkänen, T., & Heikinheimo, A. (2023). Genomic epidemiology of nosocomial carbapenemase-producing *Citrobacter freundii* in sewerage systems in the Helsinki metropolitan area, Finland. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1165751.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1165751>
- Hendriksen, R. S., Bortolaia, V., Tate, H., Tyson, G. H., Aarestrup, F. M., & McDermott, P. F. (2019). Using Genomics to Track Global Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Public Health*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00242>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2015). GeU – a tool for analyzing DNA fingerprint gel images. *BMC Bioinformatics*, *16*(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0703-0>
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2016). A survey of tools for analysing DNA fingerprints. *Briefings in Bioinformatics*, *17*(6), 903-911. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv016>
- Hillis, D. M. (1997). Phylogenetic analysis. *Current Biology*, *7*(3), R129-R131.  
[https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(97\)70070-8](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(97)70070-8)
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(2), 518-522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, *17*(8), 754-755.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>

- Ijaq, J., Malik, G., Kumar, A., Das, P. S., Meena, N., Bethi, N., Sundararajan, V. S., & Suravajhala, P. (2019). A model to predict the function of hypothetical proteins through a nine-point classification scoring schema. *BMC Bioinformatics*, 20, 14. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2554-y>
- Ilabaca-Carrasco, F., Peña-Raddatz, C., Torres-Bustos, C., Hernández-Cea, M., Nourdin-Galindo, G., Saldivia-Flandez, P., Vargas, C., Koch, E., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., & Opazo-Capurro, A. (2025). Detection of KPC-producing Enterobacterales species in wastewater samples from the Gran Concepción Metropolitan area, Chile. *Biological Research*, 58, 35. <https://doi.org/10.1186/s40659-025-00612-7>
- Íñigo, M., & Pozo, J. L. D. (2022). Treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacterales. *Revista Española de Quimioterapia*, 35(Suppl 3), 46-50. <https://doi.org/10.37201/req/s03.11.2022>
- ISP. (2018, agosto). *Vigilancia de carbapenemasas en bacterias que pueden producir Infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), Chile 2014-2017*. [https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinCarbapenemasas-02042019A%20\(1\).pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinCarbapenemasas-02042019A%20(1).pdf)
- ISP. (2022). *BOLETÍN DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA*. [https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2022/09/BoletinRAM\\_FINAL-1-1.pdf](https://www.ispch.cl/wp-content/uploads/2022/09/BoletinRAM_FINAL-1-1.pdf)
- ISP. (2023). *Vigilancia de laboratorio para Carbapenemasas en Chile*. <https://www.ispch.gob.cl/wp-content/uploads/2023/05/36-Juan-Carlos-Hormazabal.pdf>

- Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. *Nature Communications*, 9(1), 5114. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9>
- Jeon, J. H., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Lee, C.-R., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2015). Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 9654-9692. <https://doi.org/10.3390/ijms16059654>
- Johnson, J. G., Kunz, L. J., Barron, W., & Ewing, W. H. (1966). Biochemical Differentiation of the Enterobacteriaceae with the Aid of Lysine-Iron-Agar. *Applied Microbiology*, 14(2), 212-217.
- Jolivet, S., Couturier, J., Le Neindre, K., Ehmig, M., Dortet, L., Emeraud, C., & Barbut, F. (2024). Persistence of OXA-48-producing ST-22 *Citrobacter freundii* in patients and the hospital environment, Paris, France, 2016 to 2022. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 29(49), 2400262. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.49.2400262>
- Judd, W. R., Ratliff, P. D., Hickson, R. P., Stephens, D. M., & Kennedy, C. A. (2016). Clinical and economic impact of meropenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*-infected patients. *American Journal of Infection Control*, 44(11), 1275-1279. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2016.04.218>
- Kagami, K., Ishiguro, N., Yamada, T., Niinuma, Y., Iwasaki, S., Taki, K., Fukumoto, T., Hayasaka, K., Oyamada, R., Watanabe, T., Nishida, M., Sugita, J., Teshima, T.,

- Sugawara, M., & Takekuma, Y. (2021). Efficacy and safety of colistin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 27(3), 473-479. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.10.024>
- Kaniga, K., Flamm, R., Tong, S.-Y., Lee, M., Friedland, I., & Redman, R. (2010). Worldwide Experience with the Use of Doripenem against Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing and Ciprofloxacin-Resistant Enterobacteriaceae: Analysis of Six Phase 3 Clinical Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2119-2124. <https://doi.org/10.1128/AAC.01450-09>
- Karageorgopoulos, D. E., Kelesidis, T., Kelesidis, I., & Falagas, M. E. (2008). Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) Acinetobacter infections: A review of the scientific evidence. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(1), 45-55. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn165>
- Karam, Q., Kumar, V., Shajan, A. B., Al-Nuaimi, S., Sattari, Z., & El-Dakour, S. (2022). De-novo genome assembly and annotation of sobaity seabream Sparidentex hasta. *Frontiers in Genetics*, 13, 988488. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.988488>
- Karsisiotis, A. I., Damblon, C. F., & Roberts, G. C. K. (2014). A variety of roles for versatile zinc in metallo- $\beta$ -lactamases. *Metallomics: Integrated Biometal Science*, 6(7), 1181-1197. <https://doi.org/10.1039/c4mt00066h>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>

- Kemnic, T. R., & Coleman, M. (2024). Trimethoprim Sulfamethoxazole. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513232/>
- Kieffer, N., Royer, G., Decousser, J.-W., Bourrel, A.-S., Palmieri, M., Ortiz De La Rosa, J.-M., Jacquier, H., Denamur, E., Nordmann, P., & Poirel, L. (2019). Mcr-9, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(9), e00965-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00965-19>
- Koneman, E. W. (2006). *Koneman diagnóstico microbiológico: Texto y atlas en color*. Ed. Médica Panamericana.
- Konieczna, I., Żarnowiec, P., Kwinkowski, M., Kolesińska, B., Frączyk, J., Kamiński, Z., & Kaca, W. (2012). Bacterial Urease and its Role in Long-Lasting Human Diseases. *Current Protein & Peptide Science*, 13(8), 789-806. <https://doi.org/10.2174/138920312804871094>
- Krco, S., Davis, S. J., Joshi, P., Wilson, L. A., Monteiro Pedroso, M., Douw, A., Schofield, C. J., Hugenholtz, P., Schenk, G., & Morris, M. T. (2023). Structure, function, and evolution of metallo- $\beta$ -lactamases from the B3 subgroup—Emerging targets to combat antibiotic resistance. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1196073. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1196073>
- Lalaoui, R., Djukovic, A., Bakour, S., Hadjadj, L., Sanz, J., Salavert, M., López-Hontangas, J. L., Sanz, M. A., Ubeda, C., & Rolain, J.-M. (2019). Genomic characterization of *Citrobacter freundii* strains coproducing OXA-48 and VIM-1 carbapenemase enzymes isolated in leukemic patient in Spain. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, 167. <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0630-3>

- Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(4), 1355-1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Lee, H. K., Park, Y.-J., Kim, J.-Y., Chang, E., Cho, S. G., Chae, H. S., & Kang, C. S. (2005). Prevalence of decreased susceptibility to carbapenems among *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, and *Citrobacter freundii* and investigation of carbapenemases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *52*(4), 331-336. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2005.04.012>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Levin, A. S., Barone, A. A., Penço, J., Santos, M. V., Marinho, I. S., Arruda, E. A. G., Manrique, E. I., & Costa, S. F. (1999). Intravenous Colistin as Therapy for Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Infectious Diseases*, *28*(5), 1008-1011. <https://doi.org/10.1086/514732>
- Ling, Z., Yin, W., Shen, Z., Wang, Y., Shen, J., & Walsh, T. R. (2020). Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *75*(11), 3087-3095. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa205>
- Lipsky, B. A., Hook, E. W., Smith, A. A., & Plorde, J. J. (1980). *Citrobacter* Infections in Humans: Experience at the Seattle Veterans Administration Medical Center and a

Review of the Literature. *Clinical Infectious Diseases*, 2(5), 746-760.

<https://doi.org/10.1093/clinids/2.5.746>

Liu, H., Tu, Y., He, J., Xu, Q., Zhang, X., Mu, X., Chen, M., Zhou, H., & Li, X. (2024).

Emergence and plasmid cointegration-based evolution of NDM-1-producing ST107

*Citrobacter freundii* high-risk resistant clone in China. *International Journal of*

*Antimicrobial Agents*, 63(2), 107069.

<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.107069>

Liu, L., Chen, D., Liu, L., Lan, R., Hao, S., Jin, W., Sun, H., Wang, Y., Liang, Y., & Xu, J.

(2018). Genetic Diversity, Multidrug Resistance, and Virulence of *Citrobacter*

*freundii* From Diarrheal Patients and Healthy Individuals. *Frontiers in Cellular and*

*Infection Microbiology*, 8, 233. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00233>

Liu, L., Lan, R., Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, Y., & Xu, J. (2017). Antimicrobial

Resistance and Cytotoxicity of *Citrobacter* spp. In Maanshan Anhui Province,

China. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1357.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01357>

Liu, L., Qin, L., Hao, S., Lan, R., Xu, B., Guo, Y., Jiang, R., Sun, H., Chen, X., LV, X., Xu, J., &

Zhao, C. (2020). Lineage, Antimicrobial Resistance and Virulence of *Citrobacter*

spp. *Pathogens*, 9(3), 195. <https://doi.org/10.3390/pathogens9030195>

Liu, L., Zhang, L., Zhou, H., Yuan, M., Hu, D., Wang, Y., Sun, H., Xu, J., & Lan, R. (2021).

Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Citrobacter* spp.

Causing Extraintestinal Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*,

11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.737636>

- Lowe, C. F., Matic, N., Champagne, S., Romney, M. G., Leung, V., & Ritchie, G. (2020). The Brief Case: IMP, the Uncommonly Common Carbapenemase. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(4), 10.1128/jcm.01094-19. <https://doi.org/10.1128/jcm.01094-19>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, *18*(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Majewski, P., Wieczorek, P., Łapuć, I., Ojdana, D., Sieńko, A., Sacha, P., Kłoczko, J., & Tryniszewska, E. (2017). Emergence of a multidrug-resistant *Citrobacter freundii* ST8 harboring an unusual VIM-4 gene cassette in Poland. *International Journal of Infectious Diseases*, *61*, 70-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.05.016>
- Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO: Assessing Genomic Data Quality and Beyond. *Current Protocols*, *1*(12), e323. <https://doi.org/10.1002/cpz1.323>
- Maroncle, N., Rich, C., & Forestier, C. (2006). The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Research in Microbiology*, *157*(2), 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.006>
- Mazumder, R., Hussain, A., Abdullah, A., Islam, Md. N., Sadique, Md. T., Muniruzzaman, S. M., Tabassum, A., Halim, F., Akter, N., Ahmed, D., & Mondal, D. (2021). International High-Risk Clones Among Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-

- Producing *Escherichia coli* in Dhaka, Bangladesh. *Frontiers in Microbiology*, 12, 736464. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736464>
- Mehta, P., Richards, J., & Karzai, A. W. (2006). tmRNA determinants required for facilitating nonstop mRNA decay. *RNA*, 12(12), 2187-2198. <https://doi.org/10.1261/rna.247706>
- Meletis, G. (2016). Carbapenem resistance: Overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, 3(1), 15-21. <https://doi.org/10.1177/2049936115621709>
- Mendoza Brito, L. M. (2015). *Costos económicos directos de la resistencia bacteriana en la atención de pacientes hospitalizados en el Hospital Universitario Fernando Troconis de Santa Marta 2010-2011*. <https://manglar.uninorte.edu.co/handle/10584/10029>
- Metri, B. C., Jyothi, P., & Peerapur, B. V. (2013). Antibiotic resistance in *Citrobacter* spp. Isolated from urinary tract infection. *Urology Annals*, 5(4), 312-313. <https://doi.org/10.4103/0974-7796.120295>
- Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., & Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUASt-LG. *Bioinformatics*, 34(13), i142-i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>
- Minh, B. Q., Nguyen, M. A. T., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Molecular Biology and Evolution*, 30(5), 1188-1195. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst024>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods

- for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- MINSAL. (2020). *Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud 2020*. <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2024/01/Informe-vigilancia-2020.pdf>
- Mitchell, D. (2007). GC content and genome length in Chargaff compliant genomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(1), 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.008>
- Mobley, H. L. T. (2001). Urease. En H. L. Mobley, G. L. Mendz, & S. L. Hazell (Eds.), *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. ASM Press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2417/>
- Mohanty, S., Singhal, R., Sood, S., Dhawan, B., Kapil, A., & Das, B. K. (2007). Citrobacter infections in a tertiary care hospital in Northern India. *Journal of Infection*, 54(1), 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2006.01.015>
- Mojica, M. F., De La Cadena, E., García-Betancur, J. C., Porras, J., Novoa-Caicedo, I., Páez-Zamora, L., Pallares, C., Appel, T. M., Radice, M. A., Castañeda-Méndez, P., Gales, A. C., Munita, J. M., & Villegas, M. V. (2023). Molecular Mechanisms of Resistance to Ceftazidime/Avibactam in Clinical Isolates of Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in Latin American Hospitals. *mSphere*, 8(2), e00651-22. <https://doi.org/10.1128/msphere.00651-22>
- Morrill, H. J., Pogue, J. M., Kaye, K. S., & LaPlante, K. L. (2015). Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. *Open Forum Infectious Diseases*, 2(2), ofv050. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv050>

- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Narunsky, A., Higgs, G. A., Torres, B. M., Yu, D., de Andrade, G. B., Kavita, K., & Breaker, R. R. (2024). The discovery of novel noncoding RNAs in 50 bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 52(9), 5152-5165. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae248>
- NCBI. (2013). Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 41(Database issue), D8-D20. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1189>
- NG Biotech. (s. f.). CARBAPENEMASE RESISTANCE DETECTION. *NG Biotech*. Recuperado 2 de septiembre de 2024, de <https://www.ngbiotech.com/ng-test-carba-5/>
- Nguyen, L.-T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268-274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nobrega, D., Peirano, G., Matsumura, Y., & Pitout, J. D. D. (2023). Molecular Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Citrobacter* spp. (2015–2017). *Microbiology Spectrum*, 11(2), e04144-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04144-22>
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J.,

- Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2022). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): A resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D678-D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
- Opazo-Capurro, A., San Martín, I., Quezada-Aguiluz, M., Morales-León, F., Domínguez-Yévenes, M., Lima, C. A., Esposito, F., Cerdeira, L., Bello-Toledo, H., Lincopan, N., & González-Rocha, G. (2019). Evolutionary dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in Chilean hospitals. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 73, 93-97. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.022>
- Opazo-Capurro, A., Xanthopoulou, K., Arazo del Pino, R., González-Muñoz, P., Matus-Köhler, M., Amsteins-Romero, L., Jerez-Olate, C., Hormazábal, J. C., Vera, R., Aguilera, F., Fuller, S., Higgins, P. G., & González-Rocha, G. (2024). Co-Occurrence of Two Plasmids Encoding Transferable bla<sub>NDM-1</sub> and tet(Y) Genes in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter bereziniae*. *Genes*, 15(9), 1213. <https://doi.org/10.3390/genes15091213>
- Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691-3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>
- Page, A. J., Taylor, B., Delaney, A. J., Soares, J., Seemann, T., Keane, J. A., & Harris, S. R. (2016). SNP-sites: Rapid efficient extraction of SNPs from multi-FASTA alignments. *Microbial Genomics*, 2(4), e000056. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000056>

- Paliwal, D. K., & Randhawa, H. S. (1977). Rapid method for detection of urea hydrolysis by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, *33*(2), 219-220.
- Pancu, D. F., Scurtu, A., Macaso, I. G., Marti, D., Mioc, M., Soica, C., Coricovac, D., Horhat, D., Poenaru, M., & Dehelean, C. (2021). Antibiotics: Conventional Therapy and Natural Compounds with Antibacterial Activity—A Pharmaco-Toxicological Screening. *Antibiotics*, *10*(4), 401. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040401>
- Papp, M., & Solymosi, N. (2022). Review and Comparison of Antimicrobial Resistance Gene Databases. *Antibiotics*, *11*(3), 339. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030339>
- Park, Y.-J., Park, S. Y., Oh, E.-J., Park, J.-J., Lee, K.-Y., Woo, G.-J., & Lee, K. (2005). Occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among chromosomal AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens* in Korea and investigation of screening criteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *51*(4), 265-269. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2004.11.009>
- Parks, D. H., Imelfort, M., Skennerton, C. T., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2015). CheckM: Assessing the quality of microbial genomes recovered from isolates, single cells, and metagenomes. *Genome Research*, *25*(7), 1043-1055. <https://doi.org/10.1101/gr.186072.114>
- Pepperell, C., Kus, J. V., Gardam, M. A., Humar, A., & Burrows, L. L. (2002). Low-Virulence *Citrobacter* Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(11), 3555-3560. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3555-3560.2002>

- Pires, J., Novais, Â., & 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. <https://doi.org/10.1128/JCM.01634-13>
- Poudel, A. N., Zhu, S., Cooper, N., Little, P., Tarrant, C., Hickman, M., & Yao, G. (2023). The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 18(5), e0285170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0285170>
- Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. *Current Protocols in Bioinformatics*, 70(1), e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Puchter, L., Chaberny, I. F., Schwab, F., Vonberg, R.-P., Bange, F.-C., & Ebadi, E. (2018). Economic burden of nosocomial infections caused by vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7, 1. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0291-z>
- Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-458, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>
- Quesille-Villalobos, A. M., Solar, C., Martínez, J. R. W., Rivas, L., Quiroz, V., González, A. M., Riquelme-Neira, R., Ugalde, J. A., Peters, A., Ortega-Recalde, O., Araos, R., García, P., Lebreton, F., Munita, J. M., & Diaz, L. (2024). Multispecies emergence of dual blaKPC/NDM carbapenemase-producing Enterobacterales recovered from invasive infections in Chile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, e0120524. <https://doi.org/10.1128/aac.01205-24>

- Ramsamy, Y., Mlisana, K. P., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Ismail, A., Allam, M., Mbang, J., Singh, R., & Essack, S. Y. (2022). Mobile genetic elements-mediated Enterobacterales-associated carbapenemase antibiotic resistance genes propagation between the environment and humans: A One Health South African study. *Science of The Total Environment*, 806, 150641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150641>
- Ranjan, K. P., & Ranjan, N. (2013). Citrobacter: An emerging health care associated urinary pathogen. *Urology Annals*, 5(4), 313-314.
- Ranjbar, R., Tabatabaee, A., Behzadi, P., & Kheiri, R. (2017). Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) Genotyping of Escherichia coli Strains Isolated from Different Animal Stool Specimens. *Iranian Journal of Pathology*, 12(1), 25-34.
- Rezaei, M., Aky, A., Elahi, A., Ghadiri, K., & Jafari, S. (2016). The clonal relationship among the Citrobacter freundii isolated from the main hospital in Kermanshah, west of Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, 8(3), 175-180.
- Riccobono, E., Salvetti, S., Coppi, M., Montenora, I., Di Pilato, V., & Rossolini, G. M. (2023). Citrobacter freundii resistant to novel  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations and cefiderocol, co-producing class A, B and D carbapenemases encoded by transferable plasmids. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 78(7), 1677-1682. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad150>
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2016). JSpeciesWS: A web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome

comparison. *Bioinformatics*, 32(6), 929-931.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv681>

- Roope, L. S. J., Smith, R. D., Pouwels, K. B., Buchanan, J., Abel, L., Eibich, P., Butler, C. C., Tan, P. S., Walker, A. S., Robotham, J. V., & Wordsworth, S. (2019). The challenge of antimicrobial resistance: What economics can contribute. *Science (New York, N.Y.)*, 364(6435), eaau4679. <https://doi.org/10.1126/science.aau4679>
- Roschanski, N., Guenther, S., Vu, T. T. T., Fischer, J., Semmler, T., Huehn, S., Alter, T., & Roesler, U. (2017). VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from retail seafood, Germany 2016. *Eurosurveillance*, 22(43), 17-00032. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.43.17-00032>
- Salam, Md. A., Al-Amin, Md. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare*, 11(13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
- Samantray, D., Tanwar, A. S., Murali, T. S., Brand, A., Satyamoorthy, K., & Paul, B. (2023). A Comprehensive Bioinformatics Resource Guide for Genome-Based Antimicrobial Resistance Studies. *Omic: A Journal of Integrative Biology*, 27(10), 445-460. <https://doi.org/10.1089/omi.2023.0140>
- 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>

- Schwengers, O., Jelonek, L., Dieckmann, M. A., Beyvers, S., Blom, J., & Goesmann, A. (2021). Bakta: Rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, 7(11), 000685. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Seemann, T. (2024). *Tseemann/abricate* [Perl]. <https://github.com/tseemann/abricate> (Obra original publicada en 2014)
- Seemann, T. (2024). *Tseemann/shovill* [Perl]. <https://github.com/tseemann/shovill> (Obra original publicada en 2016)
- Segerman, B. (2012). The genetic integrity of bacterial species: The core genome and the accessory genome, two different stories. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 116. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00116>
- Seoane, A., & Bou, G. (2021). Bioinformatics approaches to the study of antimicrobial resistance. *Revista Española de Quimioterapia*, 34(Suppl1), 15-17. <https://doi.org/10.37201/req/s01.04.2021>
- Shelenkov, A., Akimkin, V., & Mikhaylova, Y. (2023). International Clones of High Risk of *Acinetobacter Baumannii*-Definitions, History, Properties and Perspectives. *Microorganisms*, 11(8), 2115. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082115>
- Shimodaira, H., & Hasegawa, M. (1999). Multiple Comparisons of Log-Likelihoods with Applications to Phylogenetic Inference. *Molecular Biology and Evolution*, 16(8), 1114-1116. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026201>

- Simmons, J. S. (1926). A Culture Medium for Differentiating Organisms of Typhoid-Colon Aerogenes Groups and for Isolation of Certain Fungi. *The Journal of Infectious Diseases*, 39(3), 209-214.
- Smith, H. Z., Hollingshead, C. M., & Kendall, B. (2024). Carbapenem-Resistant Enterobacterales. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551704/>
- Sommer, J., Reiter, H., Sattler, J., Cacace, E., Einfeld, J., Gatermann, S., Hamprecht, A., & Göttig, S. (2024). Emergence of OXA-48-like producing Citrobacter species, Germany, 2011 to 2022. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 29(15), 2300528.  
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.15.2300528>
- Son, S. K., Lee, N. R., Ko, J.-H., Choi, J. K., Moon, S.-Y., Joo, E. J., Peck, K. R., & Park, D. A. (2018). Clinical effectiveness of carbapenems versus alternative antibiotics for treating ESBL-producing Enterobacteriaceae bacteraemia: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(10), 2631-2642.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dky168>
- Souvorov, A., Agarwala, R., & Lipman, D. (2018). SKESA: Strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biology*, 19. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1540-z>
- Spanu, T., Luzzaro, F., Perilli, M., Amicosante, G., Toniolo, A., & Fadda, G. (2002). Occurrence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae in Italy: Implications for Resistance to  $\beta$ -Lactams and Other

- Antimicrobial Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 196-202.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.46.1.196-202.2002>
- Steyert, S. R., & Kaper, J. B. (2012). Contribution of Urease to Colonization by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 80(8), 2589-2600.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.00210-12>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.33.9.2233-2239.1995>
- Teufel, A., Krupp, M., Weinmann, A., & Galle, P. R. (2006). Current bioinformatics tools in genomic biomedical research (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 17(6), 967-973.
- Thaden, J. T., Li, Y., Ruffin, F., Maskarinec, S. A., Hill-Rorie, J. M., Wanda, L. C., Reed, S. D., & Fowler, V. G. (2017). Increased Costs Associated with Bloodstream Infections Caused by Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria Are Due Primarily to Patients with Hospital-Acquired Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(3), e01709-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01709-16>
- The Galaxy Community. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W345-W351. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac247>
- Theriault, N., Tillotson, G., & Sandrock, C. E. (2021). Global travel and Gram-negative bacterial resistance; implications on clinical management. *Expert Review of Anti-*

*Infective Therapy*, 19(2), 181-196.

<https://doi.org/10.1080/14787210.2020.1813022>

Tripathi, N., & Sapra, A. (2025). Gram Staining. En *StatPearls*. StatPearls Publishing.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562156/>

Trojanowski, D., Hołówka, J., & Zakrzewska-Czerwińska, J. (2018). Where and When Bacterial Chromosome Replication Starts: A Single Cell Perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02819>

Vardakas, K. Z., Tansarli, G. S., Rafailidis, P. I., & Falagas, M. E. (2012). Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(12), 2793-2803. <https://doi.org/10.1093/jac/dks301>

Veloso, M., Arros, P., Acosta, J., Rojas, R., Berríos-Pastén, C., Varas, M., Araya, P., Hormazábal, J. C., Allende, M. L., Chávez, F. P., Lagos, R., & Marcoleta, A. E. (2023). Antimicrobial resistance, pathogenic potential, and genomic features of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in Chile: High-risk ST25 clones and novel mobile elements. *Microbiology Spectrum*, 11(5), e00399-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00399-23>

Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS ONE*, 9(11), e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>

- Wang, L., Li, Z., Xiao, N., Tang, J., He, Y., Guo, J., & Zhao, X. (2022). Genetic Characterization of bla<sub>NDM-1</sub>-Carrying *Citrobacter portucalensis* Sequence Type 328 and *Citrobacter freundii* Sequence Type 98. *Infection and Drug Resistance*, 15, 2235-2242. <https://doi.org/10.2147/IDR.S361761>
- Warren, J. R., Farmer, J. J., Dewhirst, F. E., Birkhead, K., Zembower, T., Peterson, L. R., Sims, L., & Bhattacharya, M. (2000). Outbreak of Nosocomial Infections Due to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Strains of Enteric Group 137, a New Member of the Family Enterobacteriaceae Closely Related to *Citrobacter farmeri* and *Citrobacter amalonaticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 3946-3952.
- Waters, L. S., & Storz, G. (2009). Regulatory RNAs in Bacteria. *Cell*, 136(4), 615-628. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.043>
- Wei, W.-J., Yang, H.-F., Ye, Y., & Li, J.-B. (2015). New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-Mediated Carbapenem Resistance: Origin, Diagnosis, Treatment and Public Health Concern. *Chinese Medical Journal*, 128(14), 1969-1976. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.160566>
- WHO. (2017, febrero 27). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO. (2024). *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>

- Willems, R. J. L., Hanage, W. P., Bessen, D. E., & Feil, E. J. (2011). Population biology of Gram-positive pathogens: High-risk clones for dissemination of antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 872-900.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00284.x>
- Woodford, N., Turton, J. F., & Livermore, D. M. (2011). Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 736-755. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>
- Yamada, A. Y., de Souza, A. R., Lima, M. de J. de C., Reis, A. D., Campos, K. R., Bertani, A. M. de J., de Araujo, L. J. T., Sacchi, C. T., Tiba-Casas, M. R., & Camargo, C. H. (2022). Co-production of Classes A and B Carbapenemases BKC-1 and VIM-2 in a Clinical *Pseudomonas Putida* Group Isolate from Brazil. *Current Microbiology*, 79(9), 250. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02945-y>
- Yang, X., Man, M.-Y., Heng, H., Chan, B. K.-W., Hu, Q., Chan, E. W.-C., Shum, H.-P., & Chen, S. (2024). Molecular epidemiology and clinical impact of *Klebsiella* spp. Causing bloodstream infections in Hong Kong. *eBioMedicine*, 101, 104998.  
<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2024.104998>
- Yao, Y., Falgenhauer, L., Falgenhauer, J., Hauri, A. M., Heinmüller, P., Domann, E., Chakraborty, T., & Imirzalioglu, C. (2021). Carbapenem-Resistant *Citrobacter* spp. as an Emerging Concern in the Hospital-Setting: Results From a Genome-Based Regional Surveillance Study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 744431. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.744431>

- Zhang, G., Zhao, Q., Ye, K., Ye, L., Ma, Y., & Yang, J. (2023). Molecular analysis of clinical *Citrobacter* spp. isolates: Acquisition of the *Yersinia* high-pathogenicity island mediated by ICE<sub>kp</sub> in *C. freundii*. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1056790. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1056790>
- Zhang, R., Yang, L., Cai, J. C., Zhou, H. W., & Chen, G.-X. (2008). High-level carbapenem resistance in a *Citrobacter freundii* clinical isolate is due to a combination of KPC-2 production and decreased porin expression. *Journal of Medical Microbiology*, *57*(Pt 3), 332-337. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47576-0>
- Zhen, X., Chen, Y., Hu, X., Dong, P., Gu, S., Sheng, Y. Y., & Dong, H. (2017). The difference in medical costs between carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and non-resistant groups: A case study from a hospital in Zhejiang province, China. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *36*(10), 1989-1994. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3088-3>
- Zurita, J., Sevillano, G., Solís, M. B., Paz y Miño, A., Alves, B. R., Changuan, J., & González, P. (2024). *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with multidrug-resistant. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *38*, 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.07.003>

## ANEXOS

**Tabla S1.** Listado de cepas trabajadas en este estudio.

CEPA	MUESTRA	AÑO	ORIGEN
C1-98 (159)	Pus	1998	HGGB
C2-98 (130)	secreción senos paranasales	1998	HGGB
C3-98 (127)	herida operatoria	1998	HGGB
C4-00 (218)	desgarro	2000	HGGB
C6-00 (2493)	LCR	2000	H. San Juan de Dios
C7-00 (1943970)	secreción bronquial	2000	H. U católica
C8-00 (37)	herida	2000	H. Ancud
C10-00 (8)	secreción herida	2000	H. Higuera
C11-00 (V238)	herida operatoria	2000	H. Pto Montt
C12-00 (V107)	Herida operatoria	2000	H. Pto Montt
C13-03 (10)	Deposición	2003	EMSA
C14-08 (12607233)	Colección intrabdominal		H. U católica
C15-08 (12642904)	Sangre		H. U católica
C16-08 (22)	Herida operatoria	2008	H. San Borja
C17-08 (136301)	Aspirado bronquial		H. Sótero del río
C18-09 (1230)	Herida - cirugía	2009	H. Antofagasta
C19-09 (1233)	Herida - cirugía	2009	H. Antofagasta
C20-08 (503)	Orina		H. San Borja
C21-13 (20857061)	Orina	2012	Red salud UC
C22	NA	2019	H. Regional temuco
C23 (5748 MICROB-R)	Sangre	2019	H. La Florida
C24	Hisopado rectal	2021	HGGB
039UDEC	Urocultivo	2023	HGGB
CIT-107	Hisopado rectal	2022	HGGB
CIT-79	Hisopado rectal	2021	HGGB
CIT-73	Hisopado rectal	2021	HGGB
CIT-58	Hisopado rectal	2021	HGGB
CIT-32	Hisopado rectal	2021	HGGB

**Tabla S2.** Genomas obtenidos de base de datos *Bacterial and viral bioinformatics resource center* para análisis filogenético.

NOMBRE GENOMA	ESPECIE	AÑO	PAÍS	ACCESO GENBANK	TAMAÑO (MB)
MSB1_1H	<i>C. freundii</i>	2020	Australia	GCA_904859905.1	5.2
014_22	<i>C. freundii</i>	2022	Brasil	JAPKJP000000000	4.9
205_21	<i>C. portucalensis</i>	2017	Brasil	JAPKJO000000000	5.1
CF1140	<i>C. portucalensis</i>	2017	Perú	JANHEJ000000000	4.9
164	<i>C. freundii</i>	2017	Argentina	QCWX000000000	4.9
116_17	<i>C. freundii</i>	2017	Brasil	JAPKJQ000000000	4.8
INF_1336	<i>C. freundii</i>	2017	Argentina	JAQPFL000000000	5.1

SM_3220	<i>C. freundii</i>	2017	Colombia	JAQPCP000000000	5.2
SM_3222	<i>C. freundii</i>	2017	Colombia	JAQPCO000000000	5.3
C156	<i>C. freundii</i>	2022	Brasil	JAACYU000000000	5.3
INF_1261	<i>C. freundii</i>	2017	Colombia	JAQPFN000000000	5.3
SM_1685	<i>C. freundii</i>	2021	Colombia	JAQPD000000000	5.7
SM_1681	<i>C. freundii</i>	2021	Colombia	JAQPDV000000000	5.7
SM_2075	<i>C. freundii</i>	2021	Colombia	JAQPDO000000000	5.7
INF_1173	<i>C. freundii</i>	2015	Colombia	JAQFPF000000000	5.2
SM_1683	<i>C. freundii</i>	2015	Colombia	JAQPDU000000000	5.3
INF_1182	<i>C. freundii</i>	2015	Colombia	JAQPFO000000000	5.6
C1-185	<i>C. freundii</i>	2016	Colombia	SWFY000000000	5.3
C2-132	<i>C. freundii</i>	2021	Colombia	SWHZ000000000	5.7
C2-135	<i>C. freundii</i>	2021	Colombia	SWHY000000000	5.7
C2-03	<i>C. freundii</i>	2023	Colombia	SWFX000000000	4.8
2023EL-00951	<i>C. werkmanii</i>	2023	USA	JAVRFM000000000	5.6
LACPHL-BACT-2023-00027	<i>C. freundii</i>	2023	USA	JAVDMG000000000	5.4
LACPHL-BACT-2023-00081	<i>C. freundii</i>	2017	USA	JAVVNU000000000	5.2
LACPHL-BACT-2024-00080	<i>C. freundii</i>	2017	USA	JBAKVN000000000	5.5
2023EL-01209	<i>C. youngae</i>	2015	USA	JBDUUG000000000	5.3
RTP31141ST1_C7_RT P31141_220114	<i>C. braakii</i>	2015	USA	JBCITX000000000	5.5
GN-116	<i>C. portucalensis</i>	2015	México	JBAJJK000000000	4.9
K-1	<i>C. freundii</i>	2015	USA	JAMXKM000000000	5.6
BC-3	<i>C. freundii</i>	2016	USA	JAMXKO000000000	5.3
BC-1	<i>C. freundii</i>	2016	USA	JAMXKQ000000000	5.3
BC-2	<i>C. freundii</i>	2017	USA	JAMXKP000000000	5.2
K-2	<i>C. freundii</i>	2017	USA	JAMXKN000000000	5.3
UMB12596	<i>C. freundii</i>	2020	USA	JASORD000000000	5.1
2021EL-00129	<i>C. freundii</i>	2020	USA	JAGKLJ000000000	5.4
2021EL-00126	<i>C. freundii</i>	2020	USA	JAGKLM000000000	5.7
2021EL-00125	<i>C. freundii</i>	2021	USA	JAGKLN000000000	5.1
2020EL-00099	<i>C. freundii</i>	2015	USA	JAGKML000000000	5.6
WUSM_CF_61	<i>C. freundii</i>	2016	USA	QIWN000000000	5.1
1-RC-17-03941	<i>C. freundii</i>	2013	USA	QRBL000000000	5.5
OPGEN76	<i>C. freundii</i>	2015	USA	JAGYTK000000000	5.4
S29_CRE30	<i>C. freundii</i>	2015	USA	JAHBNX000000000	5.1
CB00021	<i>C. cronae</i>	2017	USA	JADWNH000000000	5.3
CB00064	<i>C. braakii</i>	2017	USA	JADVIA000000000	5
CB00054	<i>C. braakii</i>	2021	USA	JADVIK000000000	5.2
CB00022	<i>C. braakii</i>	2021	USA	JADVJL000000000	5.5
CB00019	<i>C. braakii</i>	2020	USA	JADVJM000000000	5.2
CB00002	<i>C. braakii</i>	2022	USA	JADVJX000000000	5.1
CB00009	<i>C. braakii</i>	2023	USA	JADVJT000000000	5.1
D43T1_170807_C10	<i>C. freundii</i>	2017	USA	JADPDG000000000	5
CB00044	<i>C. werkmanii</i>	2023	USA	JADVIS000000000	5.3

**Tabla S3.** Resultado de pruebas de susceptibilidad de 27 cepas del complejo *C. freundii*.

<b>ATB</b>	<b>TZP</b>	<b>CTX</b>	<b>CXM</b>	<b>CAZ</b>	<b>IPM</b>	<b>MEM</b>	<b>CN</b>	<b>AK</b>	<b>TE</b>	<b>CIP</b>	<b>LEV</b>	<b>SXT</b>
<b>CEPA</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>	<b>Susc.</b>
<b>C1-98 (159)</b>	SDD	S	I	S	S	S	S	S	I	S	S	S
<b>C2-98 (130)</b>	SDD	R	R	R	S	S	S	R	S	R	I	R
<b>C3-98 (127)</b>	R	S	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R
<b>C4-00 (218)</b>	R	R	R	I	S	S	S	R	S	S	S	S
<b>C6-00 (2493)</b>	R	R	R	R	S	S	R	I	R	S	S	R
<b>C7-00 (1943970)</b>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>C8-00 (37)</b>	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	R
<b>C10-00 (8)</b>	SDD	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
<b>C11-00 (V238)</b>	R	S	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R
<b>C12-00 (V107)</b>	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R
<b>C13-03 (10)</b>	SDD	R	I	R	I	S	S	S	S	S	S	S
<b>C14-08 (12607233)</b>	SDD	R	R	I	S	S	R	I	S	S	S	S
<b>C15-08 (12642904)</b>	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>C16-08 (22)</b>	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	S	S
<b>C17-08 (136301)</b>	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>C18-09 (1230)</b>	R	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	R
<b>C19-09 (1233)</b>	R	R	R	I	S	S	R	R	I	R	R	R
<b>C20-08 (503)</b>	SDD	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>C22</b>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R
<b>C23 (5748 MICROB-R)</b>	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R
<b>C24</b>	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
<b>039UDEC</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
<b>CIT-107</b>	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
<b>CIT-79</b>	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	S	R
<b>CIT-73</b>	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	S	R
<b>CIT-58</b>	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	S	R
<b>CIT-32</b>	R	R	R	R	R	R	I	I	S	R	S	R

**Tabla S4.** Perfil de resistencia de cepas del complejo *C. freundii*

ATB	GEN	N°	CEPAS
<b>CEFALOSPORINAS</b>	class C beta-lactamase CMY-48	6	C23 - C24 - CIT-79 - CIT-73 - CIT-58 - CIT-32
	class A extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-30	2	C24 - CIT-107
	class A extended-spectrum beta-lactamase SHV-12	1	C24
	class C beta-lactamase CMY-75	1	CIT-107
	class C beta-lactamase CMY-6	2	CIT-107 - UDEC039
	class C beta-lactamase CMY-65	1	UDEC039
	oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-1	1	C23
<b>CARBAPENEMICOS</b>	subclass B1 metallo-beta-lactamase NDM-7	1	C23
	subclass B1 metallo-beta-lactamase VIM-2	1	C24
	subclass B1 metallo-beta-lactamase NDM-1	2	CIT-107 - UDEC039
	carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase KPC-2	4	CIT-79 - CIT-73 - CIT-58 - CIT-32
<b>BETA-LACTAMICOS</b>	oxacillin-hydrolyzing class D beta-lactamase OXA-9	2	C24 - CIT-107
	class A beta-lactamase TEM-150	1	C24
	class A broad-spectrum beta-lactamase TEM-1	1	CIT-107
<b>SULFONAMIDAS</b>	sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul2	1	C23
	sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul1	5	C24 - CIT-79 - CIT-73 - CIT-32 - UDEC039
<b>MACROLIDOS</b>	Mph(A) family macrolide 2'-phosphotransferase	3	C23 - C24 - UDEC039
	23S rRNA (adenine(2058)-N(6))-methyltransferase Erm(B)	1	C24
	ABC-F type ribosomal protection protein Msr(E)	1	CIT-107
	Mph(E) family macrolide 2'-phosphotransferase	1	CIT-107
	EreA family erythromycin esterase	1	CIT-107
<b>TETRACICLINA</b>	tetracycline efflux MFS transporter Tet(A)	1	C23
	tetracycline efflux MFS transporter Tet(D)	1	C24
	tetracycline efflux MFS transporter Tet(G)	1	CIT-107
<b>BLEOMICINA</b>	bleomycin binding protein Ble-MBL	3	C23 - CIT-107 - UDEC039

<b>AMINOGLUCOSIDOS</b>	fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr5	1	C23	
	fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr7	2	C24 - CIT-107	
	aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(6')-IIc	1	CIT-107	
	AAC(3)-II family aminoglycoside N-acetyltransferase	1	CIT-107	
	ArmA family 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase	1	CIT-107	
	RmtC family 16S rRNA (guanine(1405)-N(7))-methyltransferase	1	CIT-107	
	AAC(6')-Ib family aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase	4	CIT-79 - CIT-73 - CIT-58 - CIT-32	
	aminoglycoside N-acetyltransferase AAC(3)-IId	4	UDEC039	
	ANT(3'')-Ia family aminoglycoside nucleotidyltransferase AadA1	3	C23 - C24 - CIT-107	
	ANT(3'')-Ia family aminoglycoside nucleotidyltransferase AadA2	3	C24 - CIT-107 - UDEC039	
	ANT(3'')-Ia family aminoglycoside nucleotidyltransferase AadA16	4	CIT-79 - CIT-73 - CIT-58 - CIT-32	
	<b>ESTREPTOTRICINA</b>	streptothricin N-acetyltransferase Sat2	2	C24 - CIT-107
	<b>QUINOLONAS/ FLUOROQUINOLONAS</b>	fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr5	1	C23
		fluoroquinolone-acetylating aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase AAC(6')-Ib-cr7	2	C24 - CIT-107
quinolone resistance pentapeptide repeat protein QnrB19		6	C24 - CIT-79 - CIT-73 - CIT-58 - CIT-32 - UDEC039	
quinolone resistance pentapeptide repeat protein QnrB38		1	UDEC039	
<b>TRIMETOPRIM</b>		trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase DfrA1	2	C23 - CIT-107
trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase DfrA12	2	C24 - UDEC039		
trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase DfrA27	4	CIT-79 - CIT-73 - CIT-58 - CIT-32		
<b>CLORANFENICOL</b>	type B-3 chloramphenicol O-acetyltransferase CatB3	1	C23	
	chloramphenicol/florfenicol efflux MFS transporter FloR	1	CIT-107	
	type A-9 chloramphenicol O-acetyltransferase	1	CIT-79	

<b>RIFAMICINA</b>	NAD(+)--rifampin ADP-ribosyltransferase Arr-3	5	C23 - CIT-79 - CIT-73 - CIT-58 - CIT-32
	NAD(+)--rifampin ADP-ribosyltransferase	1	CIT-107
<b>COLISTIN</b>	phosphoethanolamine--lipid A transferase MCR-9.1	1	CIT-107

**Tabla S5.** ST de genomas obtenidos de bv-brc para análisis filogenético

CEPA	ST	ASP(C)	CLPX	FADD	MDH	ARCA	DNAG	LYSP
<b>MSB1_1H</b>	8	aspC(5)	clpX(5)	fadD(7)	mdh(6)	arcA(5)	dnaG(5)	lysP(5)
<b>014_22</b>	579	aspC(16)	clpX(12)	fadD(243)	mdh(10)	arcA(5)	dnaG(55)	lysP(5)
<b>205_21</b>	1040	aspC(9)	clpX(11)	fadD(117)	mdh(303)	arcA(47)	dnaG(66)	lysP(310)
<b>CF1140</b>	129	aspC(7)	clpX(6)	fadD(76)	mdh(45)	arcA(3)	dnaG(45)	lysP(63)
<b>164</b>	62	aspC(48)	clpX(10)	fadD(14)	mdh(13)	arcA(32)	dnaG(6)	lysP(45)
<b>116_17</b>	91	aspC(48)	clpX(10)	fadD(14)	mdh(13)	arcA(32)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>INF_1336</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>SM_3220</b>	544	aspC(54)	clpX(55)	fadD(229)	mdh(52)	arcA(7)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>SM_3222</b>	544	aspC(54)	clpX(55)	fadD(229)	mdh(52)	arcA(7)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>C156</b>	117	aspC(26)	clpX(53)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(6)	lysP(58)
<b>INF_1261</b>	535	aspC(51)	clpX(53)	fadD(228)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(6)	lysP(5)
<b>SM_1685</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>SM_1681</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>SM_2075</b>	535	aspC(51)	clpX(53)	fadD(228)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(6)	lysP(5)
<b>INF_1173</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>SM_1683</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>INF_1182</b>	415	aspC(151)	clpX(14)	fadD(33)	mdh(29)	arcA(18)	dnaG(9)	lysP(11)
<b>C1-185</b>	623	aspC(16)	clpX(78)	fadD(13)	mdh(6)	arcA(12)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>C2-132</b>	-	aspC(127)	clpX(10)	fadD(14)	mdh(~183)	arcA(7)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>C2-135</b>	169	aspC(80)	clpX(10)	fadD(56)	mdh(13)	arcA(7)	dnaG(6)	lysP(61)
<b>C2-03</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>2023EL-00951</b>	28	aspC(21)	clpX(234)	fadD(~131)	mdh(207)	arcA(15)	dnaG(86)	lysP(21)
<b>LACPHL-BACT-2023-00027</b>	91	aspC(48)	clpX(10)	fadD(14)	mdh(13)	arcA(32)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>LACPHL-BACT-2023-00081</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>LACPHL-BACT-2024-00080</b>	396	aspC(16)	clpX(12)	fadD(70)	mdh(15)	arcA(88)	dnaG(6)	lysP(50)
<b>2023EL-01209</b>	30	aspC(23)	clpX(20)	fadD(26)	mdh(18)	arcA(14)	dnaG(19)	lysP(23)
<b>RTP31141ST1_C7_RTP31141_220114</b>	362	aspC(45)	clpX(140)	fadD(164)	mdh(40)	arcA(38)	dnaG(119)	lysP(42)
<b>GN-116</b>	-	aspC(7)	clpX(31)	fadD(8)	mdh(73)	arcA(1)	dnaG(1)	lysP(6)
<b>K-1</b>	8	aspC(5)	clpX(5)	fadD(7)	mdh(6)	arcA(5)	dnaG(5)	lysP(5)
<b>BC-3</b>	8	aspC(5)	clpX(5)	fadD(7)	mdh(6)	arcA(5)	dnaG(5)	lysP(5)
<b>BC-1</b>	8	aspC(5)	clpX(5)	fadD(7)	mdh(6)	arcA(5)	dnaG(5)	lysP(5)

<b>BC-2</b>	8	aspC(5)	clpX(5)	fadD(7)	mdh(6)	arcA(5)	dnaG(5)	lysP(5)
<b>K-2</b>	8	aspC(5)	clpX(5)	fadD(7)	mdh(6)	arcA(5)	dnaG(5)	lysP(5)
<b>UMB12596</b>	8	aspC(5)	clpX(5)	fadD(7)	mdh(6)	arcA(5)	dnaG(5)	lysP(5)
<b>2021EL-00129</b>	551	aspC(9)	clpX(208)	fadD(193)	mdh(11)	arcA(47)	dnaG(66)	lysP(194)
<b>2021EL-00126</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>2021EL-00125</b>	22	aspC(15)	clpX(12)	fadD(20)	mdh(15)	arcA(5)	dnaG(11)	lysP(17)
<b>2020EL-00099</b>	-	aspC(16)	clpX(177)	fadD(13)	mdh(54)	arcA(7)	dnaG(~141)	lysP(5)
<b>WUSM_CF_61</b>	144	aspC(75)	clpX(75)	fadD(35)	mdh(13)	arcA(7)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>1-RC-17-03941</b>	314	aspC(28)	clpX(12)	fadD(7)	mdh(107)	arcA(5)	dnaG(9)	lysP(7)
<b>OpGen76</b>	-	aspC(110)	clpX(167)	fadD(~17)	mdh(13)	arcA(5)	dnaG(54)	lysP(5)
<b>S29_CRE30</b>	511	aspC(93)	clpX(26)	fadD(13)	mdh(183)	arcA(7)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>CB00021</b>	31	aspC(24)	clpX(18)	fadD(27)	mdh(21)	arcA(11)	dnaG(20)	lysP(15)
<b>CB00064</b>	389	aspC(152)	clpX(163)	fadD(188)	mdh(150)	arcA(86)	dnaG(148)	lysP(158)
<b>CB00054</b>	388	aspC(45)	clpX(162)	fadD(39)	mdh(149)	arcA(38)	dnaG(40)	lysP(157)
<b>CB00022</b>	244	aspC(106)	clpX(44)	fadD(111)	mdh(40)	arcA(30)	dnaG(93)	lysP(94)
<b>CB00019</b>	225	aspC(82)	clpX(38)	fadD(43)	mdh(37)	arcA(24)	dnaG(32)	lysP(37)
<b>CB00002</b>	241	aspC(105)	clpX(108)	fadD(93)	mdh(81)	arcA(66)	dnaG(97)	lysP(109)
<b>CB00009</b>	244	aspC(106)	clpX(44)	fadD(111)	mdh(40)	arcA(30)	dnaG(93)	lysP(94)
<b>D43T1_170807_C10</b>	98	aspC(54)	clpX(55)	fadD(60)	mdh(52)	arcA(7)	dnaG(6)	lysP(11)
<b>CB00044</b>	-	aspC(~136)	clpX(~91)	fadD(~177)	mdh(~25)	arcA(92)	dnaG(171)	lysP(~166)

**Tabla S6.** Genes de resistencia de genomas descargados de bv-brc para análisis filogenético.

<b>NOMBRE GENOMA</b>	<b>GENES DE RESISTENCIA</b>
<b>MSB1_1H</b>	<i>blaCMY-48, aac(6)-If</i>
<b>014_22</b>	<i>qnrB35, qnrB1, dfrA14, blaCMY-135, sul1, aadA2, dfrA12, aadA1, blaOXA-1, aac(6)-Ib-cr, aph(6)-Ib, aph(3)-Ib, sul2, qnrS1, aph(3)-VI, blaTEM-1, blaOXA-9, blaCTX-M-15, tet(A), aac(3)-Ile, blaNDM-1, ble-MBL, mph(A)</i>
<b>205_21</b>	<i>tet(A), blaCMY-2, tet(A), aph(3)-VI, blaNDM-1, ble-MBL, dfrA14, aadA1, sul1, sul2, aph(3)-Ib, aph(6)-Ib, blaTEM-1, blaCTX-M-15, blaOXA-1, aac(6)-Ib-D181Y, dfrA25</i>
<b>CF1140</b>	<i>mph(A), qnrB13, dfrA12, AADa12, aadA2, slu1, cmlA5, blaOXA-10, blaCMY-86, blaOXA-181, qnrS1, sul2</i>
<b>164</b>	<i>blaCTX-M-8, blaPER-2, qnrE1, blaTEM-150, blaCMY-150, arr-3, dfrA27, aadA16, sul1, qnrB38</i>
<b>116_17</b>	<i>qnrB38, blaCMY-150, sul1, aadA2, dfrA12, sul2, aph(3)-Ib, aph(6)-Ib, blaTEM-1, blaCTX-M-15, qnrS1, aph(3)-VI, blaNDM-1, ble-MBL, mph(A)</i>
<b>INF_1336</b>	<i>blaCMY-48, sul2, blaKPC-2, aadA1, sat2_gen, dfrA1, mph(A), aac(6)-Ib-cr5, blaOXA-1, catB3, arr-3, aac(3)-Ile, blaTEM-1</i>
<b>SM_3220</b>	<i>qnrB38, sul1, qnrB6, sul1, aadA16, dfrA27, arr-3, aac(6)-Ib-D181Y, blaKPC-2, blaCMY-109</i>
<b>SM_3222</b>	<i>qnrB38, blaCMY-109, blaKPC-2, aadA16, dfrA27, arr-3, aac(6)-Ib-D181Y</i>
<b>C156</b>	<i>qnrB1, sul2, aph(3)-Ib, aph(6)-Ib, blaTEM-1, dfrA14, aac(3)-Ile, blaOXA-1, aac(6)-Ib-D181Y, aadA1, catA1, blaCMY-152, blaCTX-M-15</i>
<b>INF_1261</b>	<i>blaCTX-M-12, aph(3)-Ib, aac(3)-Ile, blaKPC-2, aph(6)-Ib, aac(6)-Ib, blaCMY-51, sul1, blaOXA-2, tet(B), mph(A), qnrA7</i>
<b>SM_1685</b>	<i>blaKPC-2, blaCMY-48, sul2, aadA1, sat2_gen, dfrA1, aac(3)-Ile, aadA16, dfrA27, arr-3, aac(6)-Ib-D181Y, tet(D), mph(A), catA2</i>

<b>SM_1681</b>	<i>blaCMY-48, blaKPC-2, dfrA1, sat2_gen, aadA1, sul1, aadA16, dfrA27, arr-3, aac(6')-Ib-D181Y, aac(3)-Iid, sul2, tet(D), mph(A), blaCTX-M-12, catA2</i>
<b>SM_2075</b>	<i>blaCTX-M-12, aph(3')-Ib, aac(3)-Iie, aph(6)-Id, aac(6')-Ilan, blaCMY-51, blaOXA-2, sul1, tet(B), mph(A), qnrA7, blaKPC-2</i>
<b>INF_1173</b>	<i>blaCMY-48, blaKPC-2, dfrA1, sat2_gen, aadA1, aac(6')-Ib-D181Y, arr-3, dfrA27, aadA16, sul1, aac(3)-Iid, sul2, blaCTX-M-12, tet(D), mph(A), catA2</i>
<b>SM_1683</b>	<i>blaSHV-158, blaKPC-3, dfrA1, sat2_gen, aadA1, mph(A), sul1, aadA2, dfrA12, tet(D), blaCMY-48, blaTEM-1</i>
<b>INF_1182</b>	<i>blaCMY-48, sul1, aadA16, blaKPC-2, ant(2'')-Ia</i>
<b>C1-185</b>	<i>blaCMY-110, qnrB6, blaKPC-2, aadA16, dfrA27, arr-3, aac(6')-Ib-D181Y, sul1</i>
<b>C2-132</b>	<i>blaTEM-235, blaOXA-1, aac(6')-Ib-D181Y, blaCTX-M-15, erm(B), aph(6)-Id, aph(3')-Ib, blaCMY-65, qnrB38, ant(2'')-Ia, aadA1, cmlA6, sul1, blaKPC-2, aac(3)-Iie, mph(A)</i>
<b>C2-135</b>	<i>blaKPC-2, blaCMY-165, qnrB38</i>
<b>C2-03</b>	<i>dfrA1, sat2_gen, aadA1, blaKPC-2, aac(3)-Iie, qnrB19, aac(6')-Ilan, tet(D), sul2, sul1, aadA10, aph(6)-Id, aph(3')-Ib, tet(B), aph(3')-Ia, catA2, blaCMY-48</i>
<b>2023EL-00951</b>	<i>ble-MBL, blaNDM-5, qnrB69, blaCMY-159</i>
<b>LACPHL-BACT-2023-00027</b>	<i>qnrB38, blaCMY-150, ble-MBL, blaNDM-1, aac(6')-If</i>
<b>LACPHL-BACT-2023-00081</b>	<i>blaCMY-48, mph(A), sul1, blaKPC-2, qnrB2, blaOXA-2, aadA5, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib', aadA1, blaOXA-9</i>
<b>LACPHL-BACT-2024-00080</b>	<i>blaCMY-78, fosA7.2, blaKPC-3, aph(3')-Ia, blaTEM-150, mph(A), aac(6')-Ib', aadA1, blaOXA-9</i>
<b>2023EL-01209</b>	<i>blaKPC-4, aph(3')-Ia, sul1, qnrB2, aac(3)-Ib, sul2, aph(3')-Ib, aph(6)-Id, tet(D), blaCMY-157, dfrA1</i>
<b>RTP31141ST1_C7_RTP31141_220114</b>	<i>blaCMY-70</i>
<b>GN-116</b>	<i>qnrB3, mcr-10.1, blaCMY-71</i>
<b>K-1</b>	<i>catB3, ant(2'')-Ia, msr(E), mph(E), blaKPC-3, blaCARB-2, aadA2, cmlA6, catB11, qnrA1, aadA1, sat2_gen, dfrA1, aac(6')-If, blaCMY-116, tet(B), blaCTX-M-39, dfrA19 sul1</i>
<b>BC-3</b>	<i>dfrA1, sat2_gen, aadA1, sul1, ant(2'')-Ia, catB3, dfrA19, qnrA1, blaCMY-116, aac(6')-If, blaCTX-M-39, blaKPC-3, catB11, cmlA6, aadA2, blaCARB-2, tet(B), msr(E), mph(E)</i>
<b>BC-1</b>	<i>aac(6')-If sul1 blaCMY-116 aadA1 sat2_gen dfrA1 tet(B) blaKPC-3 blaCTX-M-39</i>
<b>BC-2</b>	<i>blaCMY-116, dfrA1, sat2_gen, aadA1, aac(6')-If, sul1, blaCTX-M-39, tet(B), blaKPC-3</i>
<b>K-2</b>	<i>msr(E), mph(E), dfrA19, ant(2'')-Ia, catB3, qnrA1, aac(6')-If, catB11, cmlA6, aadA2, blaCARB-2, blaKPC-3, blaCMY-116, blaCTX-M-39, tet(B), aadA1, sat2_gen, dfrA1, sul1</i>
<b>UMB12596</b>	<i>sul1, tet(E), blaCMY-116, aac(3)-Iid, blaTEM-1, aac(6')-Ib-D181Y, arr-3, dfrA27, aadA16, qnrB6</i>
<b>2021EL-00129</b>	<i>blaKPC-4, blaTM-150, aph(3')-Ia, qnrB9, qnrB2, aac(3)-Ib, dfrA14, sul1, blaCMY-2E</i>
<b>2021EL-00126</b>	<i>blaCMY-48, blaKPC-3, blaFOX-5, catB11, cmlA6, aadA2, blaCARB-2, dfrA19, msr(E), mph(E), ant(2'')-Ia, catB3, dfrA1, sat2_gen, aadA1</i>
<b>2021EL-00125</b>	<i>blaKPC-3, blaFOX-5, blaCARB-2, aadA2, cmlA6, catB11, dfrA19, msr(E), mph(E), ant(2'')-Ia, catB3, sul1, qnrA1, aadA1, sat2_gen, dfrA1, blaCMY-48</i>
<b>2020EL-00099</b>	<i>blaCMY-97, dfrA14, sul2, aph(3')-Ib, aph(6)-Id, blaTEM-150, blaOXA-9, aadA1, aac(6')-Ib-AKT, blaKPC-3, tet(A), qnrB1, aac(3)-Ile</i>
<b>WUSM_CF_61</b>	<i>blaCMY-135, blaSHV-105, ant(2'')-Ia, qnrB38</i>
<b>1-RC-17-03941</b>	<i>aac(6')-If, blaCMY-75, blaKPC-2, aphA16, ant(2'')-Ia, sul1, blaOXA-2, blaSHV-14, aac(6')-If</i>
<b>OPGEN76</b>	<i>blaTEM-1, sul2, sul1, dfrA19, ere(A), arr-269927220, aac(3)-II, aac(6')-Iic, aadA2, qnrB2, blaCMY-78, catA2, blaSHV-12, mcr-9.1, aph(3')-Ib, aph(6)-Id</i>

<b>S29_CRE30</b>	<i>blaKPC-2, blaTEM-150, blaOXA-9, aadA1, aac(6)-Ib-AGKT, blaTEM-150, blaCMY-135, msr(E), mph(E)</i>
<b>CB00021</b>	<i>blaCMY-159, qnrB11, dfrA15, sul1</i>
<b>CB00064</b>	<i>aac(6)-Ib, blaCMY-101</i>
<b>CB00054</b>	<i>blaCMY-82</i>
<b>CB00022</b>	<i>blaCMY-100</i>
<b>CB00019</b>	<i>blaCMY-101</i>
<b>CB00002</b>	<i>blaCMY-82, qnrB70</i>
<b>CB00009</b>	<i>blaCMY-100</i>
<b>D43T1_170807_C10</b>	<i>blaCMY-109, qnrB38</i>
<b>CB00044</b>	<i>qnrB65, blaCMY-159</i>