



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Programa de Magíster en Ciencias con mención en Microbiología

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO DE LAS AGUAS SERVIDAS DEL  
GRAN CONCEPCIÓN, EN LA CARGA DE *ENTEROBACTERALES*  
RESISTENTES A CEFALOSPORINAS DE TERCERA  
GENERACIÓN Y/O CARBAPENÉMICOS, Y DE GENES  
CODIFICANTES DE  $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO  
Y/O CARBAPENEMASAS**

Tesis presentada a la Dirección de Postgrado para optar al grado  
académico de Magíster en Ciencias con mención en Microbiología.

FRANCO AMILCAR ILABACA CARRASCO.  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2025

Profesor Guía: Dr. Gerardo González Rocha  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Laboratorio de Investigación de Agentes Antibacterianos (LIAA), perteneciente al Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Guía:

---

Dr. Gerardo González Rocha  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Profesora Co-guía:

---

Dra. Helia Bello Toledo  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dr. Andrés Opazo Capurro  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dra. Celia Fernández de Lima  
Facultad de Odontología  
Universidad de Concepción

---

Dr. Jorge Olivares Pacheco  
Instituto de Biología  
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

Director de Programa:

---

Dr. Gerardo González Rocha  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

***A mi familia, a mis princesas gatunas Hilda y Aspergilla,  
a los hongos, y al Heavy Metal.***

## **AGRADECIMIENTOS.**

Esta tesis fue financiada a través del FONDEF ID23I10264

Quisiera agradecer en primer lugar, a los docentes Gerardo González Rocha y Helia Bello Toledo, por aceptarme en su laboratorio, así como a guiar esta tesis. También al profesor Andrés Opazo Capurro por su orientación en la ejecución de análisis bioinformáticos. A Carlos Peña Raddatz por su cooperación en la etapa de siembras seriadas de muestras de aguas servidas, así como a Claudia Torres Bustos en el procesamiento de dichas muestras, y en la extracción directa de ADN desde las mismas. Agradezco en general a todos los miembros del Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA), por otorgarme las facilidades para llevar a cabo, los experimentos necesarios para completar esta tesis.

De igual manera quisiera agradecer a MELISA Institute, por efectuar la secuenciación genómica completa de 3 aislados productores de carbapenemasas, y a Néstor Herrera Chávez por amablemente haber identificado otros 3 aislados mediante MALDI-TOF.

Finalmente, agradezco al LIAA por permitirme efectuar estudios de manera autodidacta en hongos, y a los profesores Patricio Godoy Martínez e Ítalo Fernández Fonseca, por su instrucción en Micología y Parasitología, respectivamente. Pues si bien, tales actividades no formaron parte del desarrollo de esta tesis, contribuyeron fuertemente a mi formación académica interdisciplinaria.



## TABLA DE CONTENIDOS.

|                                                                                                    |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....                                                                      | X     |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                                                                     | XII   |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....                                                                          | XVII  |
| <b>RESUMEN</b> .....                                                                               | XVIII |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                                                              | XXI   |
| <br>                                                                                               |       |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....                                                                       | 1     |
| 1.1. Resistencia antibiótica (RA).....                                                             | 1     |
| 1.2. Bacterias resistentes a antibióticos (BRA) de prioridad global.....                           | 2     |
| 1.3. Cefalosporinas de tercera generación (C3G).....                                               | 5     |
| 1.4. Carbapenémicos.....                                                                           | 8     |
| 1.5. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....                                         | 11    |
| 1.6. Carbapenemasas.....                                                                           | 13    |
| 1.7. Epidemiología de BLEE y carbapenemasas en Chile.....                                          | 18    |
| 1.8. Aguas servidas (AS).....                                                                      | 21    |
| 1.9. Tratamiento de AS.....                                                                        | 24    |
| 1.9.1. Antecedentes.....                                                                           | 24    |
| 1.9.2. Tratamiento preliminar.....                                                                 | 26    |
| 1.9.3. Tratamiento primario.....                                                                   | 26    |
| 1.9.4. Tratamiento secundario.....                                                                 | 27    |
| 1.9.5. Desinfección.....                                                                           | 28    |
| 1.9.6. Digestión y eliminación de lodos.....                                                       | 29    |
| 1.10. PTAS del Gran Concepción.....                                                                | 30    |
| 1.11. Grupos bacterianos, antibióticos (ATBs) y genes de resistencia antibiótica (GRAs) en AS..... | 36    |
| 1.12. Métodos de estudio de la RA en AS.....                                                       | 38    |
| 1.13. RA en AS en Chile.....                                                                       | 41    |
| 1.14. Hipótesis y Objetivos.....                                                                   | 43    |

|                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>                                                                                                         | <b>45</b> |
| 2.1. Muestras de AS                                                                                                                    | 45        |
| 2.1.1. Obtención y almacenamiento de muestras                                                                                          | 45        |
| 2.1.2. Procesamiento de muestras para aislamiento bacteriano                                                                           | 46        |
| 2.2. Recuento bacteriano aeróbico                                                                                                      | 46        |
| 2.3. Selección y almacenamiento de colonias bacterianas                                                                                | 47        |
| 2.4. Identificación bacteriana                                                                                                         | 47        |
| 2.4.1. Observación de características microbiológicas e identificación fenotípica                                                      | 47        |
| 2.4.2. Identificación molecular de los aislados                                                                                        | 48        |
| 2.4.2.1. Extracción de ADN genómico (ADNg)                                                                                             | 48        |
| 2.4.2.2. PCR convencional                                                                                                              | 48        |
| 2.4.2.3. Electroforesis en gel de agarosa                                                                                              | 49        |
| 2.4.2.4. Secuenciación tipo Sanger                                                                                                     | 49        |
| 2.5. Susceptibilidad antibiótica de <i>Enterobacterales</i> aislados de AS                                                             | 50        |
| 2.6. Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas en <i>Enterobacterales</i> aislados de AS                                         | 51        |
| 2.6.1. Detección de BLEE mediante sinergia por combinación de discos                                                                   | 51        |
| 2.6.2. Detección de carbapenemasas                                                                                                     | 52        |
| 2.6.2.1. Prueba de <i>Blue Carba</i>                                                                                                   | 52        |
| 2.6.2.2. Inmunoensayo <i>NG-Test® CARBA-5</i>                                                                                          | 52        |
| 2.7. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) a Imipenem (IPM) en <i>Enterobacterales</i> productores de carbapenemasas | 52        |
| 2.8. Detección e identificación de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en <i>Enterobacterales</i> aislados de AS             | 53        |
| 2.8.1. Extracción de ADNg                                                                                                              | 53        |
| 2.8.2. PCR convencional                                                                                                                | 53        |
| 2.8.3. Digestión enzimática de <i>bla<sub>SHV</sub></i>                                                                                | 54        |
| 2.8.3.1. PCR convencional                                                                                                              | 54        |
| 2.8.3.2. Ensayo de digestión enzimática                                                                                                | 54        |
| 2.8.4. Secuenciación tipo Sanger                                                                                                       | 55        |

|                                                                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.9. Secuenciación genómica completa (SGC) y análisis <i>in silico</i> de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.....                            | 57        |
| 2.10. Detección e Identificación de genes codificantes BLEE y/o carbapenemasas en muestras de AS.....                                                       | 60        |
| 2.10.1. Procesamiento de muestras para obtención directa de ADNg desde AS.....                                                                              | 60        |
| 2.10.2. Extracción de ADNg.....                                                                                                                             | 60        |
| 2.10.3. PCR convencional.....                                                                                                                               | 61        |
| 2.10.4. Secuenciación tipo Sanger.....                                                                                                                      | 61        |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                   | <b>62</b> |
| 3.1. Recuentos bacterianos.....                                                                                                                             | 62        |
| 3.2. Identificación de bacterias procedentes de AS .....                                                                                                    | 65        |
| 3.2.1. Aislamiento de Bacilos Gram negativos (BGN).....                                                                                                     | 65        |
| 3.2.2. Identificación de BGN-F-Ox[-].....                                                                                                                   | 67        |
| 3.3. Susceptibilidad antibiótica de cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS.....                                                                    | 76        |
| 3.3.1. Prevalencia de <i>Enterobacterales</i> resistentes a antibióticos.....                                                                               | 76        |
| 3.3.2. Perfiles de resistencia antibiótica e índice de multirresistencia (MAR) a los antibióticos.....                                                      | 78        |
| 3.4. Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS.....                                                | 83        |
| 3.4.1. Detección de BLEE.....                                                                                                                               | 82        |
| 3.4.2. Detección de carbapenemasas.....                                                                                                                     | 86        |
| 3.5. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) a Imipenem (IPM) en <i>Enterobacterales</i> productores de carbapenemasas.....                 | 89        |
| 3.6. Detección e identificación de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS.....                    | 90        |
| 3.6.1. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>SHV</sub> de espectro extendido.....                                                                          | 90        |
| 3.6.2. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> de espectro extendido.....                                                                          | 92        |
| 3.6.3. Detección molecular de grupos de <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....                                                                                   | 97        |
| 3.6.4. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , y <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> ..... | 101       |

|                                                                                                                                           |         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 3.7. Secuenciación genómica completa (SGC) y análisis <i>in silico</i> de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.....          | 102     |
| 3.8. Prevalencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas.....                                                                    | 109     |
| 3.9. Asociación entre detección fenotípica y molecular de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS..... | 112     |
| 3.10. Detección directa e identificación de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en muestras de AS.....                          | 115     |
| 3.10.1. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>SHV</sub> de espectro extendido.....                                                       | 115     |
| 3.10.2. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> de espectro extendido.....                                                       | 116     |
| 3.10.3. Detección molecular de grupos de <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....                                                                | 119     |
| 3.10.4. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....                                                                            | 120     |
| 3.10.5. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>NDM</sub> .....                                                                            | 123     |
| 3.10.6. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>VIM</sub> .....                                                                            | 126     |
| 3.10.7. Detección molecular de <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> .....                                                                    | 131     |
| 3.10.8. Prevalencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas.....                                                                 | 135     |
| <br>4. DISCUSIÓN.....                                                                                                                     | <br>136 |
| <br>5. CONCLUSIONES.....                                                                                                                  | <br>152 |
| <br>6. PROYECCIONES.....                                                                                                                  | <br>154 |
| <br>7. REFERENCIAS.....                                                                                                                   | <br>155 |

|                                                                                                                                                          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>ANEXO 1.</b> Características fisicoquímicas de muestras de AS.....                                                                                    | 181 |
| <b>ANEXO 2.</b> Protocolo de extracción de ADNg desde bacterias.....                                                                                     | 182 |
| <b>ANEXO 3.</b> Partidores utilizados en PCR convencional.....                                                                                           | 183 |
| <b>ANEXO 4.</b> Condiciones de amplificación utilizadas en PCR convencional.....                                                                         | 184 |
| <b>ANEXO 5.</b> Protocolo de extracción de ADNg desde muestras de AS.....                                                                                | 185 |
| <b>ANEXO 6.</b> Concentraciones de ADNg en muestras de AS.....                                                                                           | 187 |
| <b>ANEXO 7.</b> Cepas control utilizadas en esta tesis.....                                                                                              | 188 |
| <b>ANEXO 8.</b> Matriz de recuentos bacterianos generada en GraphPad Prism para cálculo de ANOVA de dos vías y de comparaciones múltiples de Turkey..... | 189 |
| <b>ANEXO 9.</b> Resultados de comparaciones múltiples de Turkey realizadas en GraphPad Prism.....                                                        | 190 |

## INDICE DE TABLAS.

|                                                                                                                                                                               |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 1.</b> Patógenos resistentes prioritarios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la investigación y desarrollo de nuevos antibacterianos.....             | 4   |
| <b>Tabla 2.</b> Fechas y horas de obtención de las muestras de AS.....                                                                                                        | 45  |
| <b>Tabla 3.</b> Recuentos bacterianos (UFC/ml) obtenidos en muestras de AF y de EF, de la PTAS del Gran Concepción.....                                                       | 63  |
| <b>Tabla 4.</b> Distribución de <i>Enterobacterales</i> de las familias <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Morganellaceae</i> identificados en AS.....                            | 73  |
| <b>Tabla 5A.</b> Distribución por muestreo de <i>Enterobacterales</i> de las familias <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Morganellaceae</i> aislados desde AS.....                | 74  |
| <b>Tabla 5B.</b> Distribución por muestreo de <i>Enterobacterales</i> de las familias <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Morganellaceae</i> aislados desde AS (Continuación)..... | 75  |
| <b>Tabla 6A.</b> Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AF de AS.....                                                         | 79  |
| <b>Tabla 6B.</b> Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AF de AS (Continuación).....                                          | 80  |
| <b>Tabla 7.</b> Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de EF de AS.....                                                          | 81  |
| <b>Tabla 8.</b> Prevalencia de perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AF de AS.....                                           | 82  |
| <b>Tabla 9A.</b> Detección de BLEE y AmpC en cepas <i>Enterobacterales</i> aisladas de AF.....                                                                                | 84  |
| <b>Tabla 9B.</b> Detección de BLEE y AmpC en cepas <i>Enterobacterales</i> aisladas de AF (Continuación).....                                                                 | 85  |
| <b>Tabla 10.</b> Detección de BLEE y AmpC en cepas de <i>Enterobacterales</i> de EF.....                                                                                      | 85  |
| <b>Tabla 11.</b> Identificación genómica bacteriana de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.....                                                                 | 104 |

|                                                                                                                                                                                            |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabla 12.</b> Características genómicas de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.....                                                                                       | 105 |
| <b>Tabla 13A.</b> Presencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS.....                                                       | 110 |
| <b>Tabla 13B.</b> Presencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS (Continuación).....                                        | 111 |
| <b>Tabla 14A.</b> Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas v/s detección molecular de sus genes codificantes en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS .....               | 113 |
| <b>Tabla 14B.</b> Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas v/s detección molecular de sus genes codificantes en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS (continuación)..... | 114 |
| <b>Tabla 15.</b> Resumen de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas detectados en muestras de AS del Gran Concepción .....                                                           | 135 |

## INDICE DE FIGURAS.

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Rutas de transmisión de la RA entre humanos, animales y el ambiente.....                                                                   | 3  |
| <b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción de antibacterianos $\beta$ -lactámicos.....                                                                            | 5  |
| <b>Figura 3.</b> Estructura química de cefalosporinas.....                                                                                                  | 7  |
| <b>Figura 4.</b> Estructura química básica de un carbapenémico.....                                                                                         | 9  |
| <b>Figura 5.</b> Estructura química de imipenem, meropenem y ertapenem.....                                                                                 | 10 |
| <b>Figura 6.</b> Correlación simplificada entre nomenclatura molecular y funcional centrada en las $\beta$ -lactamasas de mayor relevancia clínica.....     | 11 |
| <b>Figura 7.</b> Árbol filogenético que muestra la similitud entre enzimas del linaje CTX-M y la agrupación de miembros de diferentes grupos CTX-M.....     | 13 |
| <b>Figura 8.</b> Representaciones graficas de los ambientes genéticos que albergan a los genes <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....                            | 14 |
| <b>Figura 9.</b> Representación gráfica del ambiente genético que alberga a <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> .....                                               | 15 |
| <b>Figura 10.</b> Representaciones graficas de los ambientes genéticos que albergan a los genes codificantes de carbapenemasas de la clase B de Ambler..... | 16 |
| <b>Figura 11.</b> Representaciones graficas de los ambientes genéticos que albergan a los genes codificantes de carbapenemasas de la clase D de Ambler..... | 17 |
| <b>Figura 12.</b> Componentes de las AS.....                                                                                                                | 22 |
| <b>Figura 13.</b> Fuentes de generación de AS y sus características.....                                                                                    | 23 |
| <b>Figura 14.</b> Distribución por zonas geográficas de las tecnologías de tratamiento de AS disponibles en Chile.....                                      | 25 |
| <b>Figura 15.</b> Tratamiento de AS empleando sistema de lodos activados.....                                                                               | 28 |
| <b>Figura 16.</b> Representación de sistema de lodos activados.....                                                                                         | 29 |
| <b>Figura 17.</b> Pre-tratamiento de AS.....                                                                                                                | 31 |
| <b>Figura 18.</b> Tratamiento primario de AS.....                                                                                                           | 32 |
| <b>Figura 19.</b> Tratamiento secundario de AS.....                                                                                                         | 33 |
| <b>Figura 20.</b> Desinfección de AS tratadas.....                                                                                                          | 34 |
| <b>Figura 21.</b> Digestor anaerobio para tratamiento de lodos.....                                                                                         | 35 |



|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 22.</b> Prensa de banda para deshidratación de lodos digeridos.....                                                                                        | 35 |
| <b>Figura 23.</b> Canchas para secado de lodos.....                                                                                                                  | 36 |
| <b>Figura 24.</b> Representación en escala logarítmica de recuentos bacterianos<br>(UFC/ml) obtenidos en muestras de AF y de EF, de la PTAS del Gran Concepción..... | 64 |
| <b>Figura 25.</b> Distribución de BGN-F-Ox[-] obtenidos de muestras de AF y EF .....                                                                                 | 66 |
| <b>Figura 26.</b> Distribución de BGN-F-Ox[+] obtenidos de muestras de AF y EF.....                                                                                  | 66 |
| <b>Figura 27A.</b> Amplificación del gen <i>ARNr16S</i> en cepa de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS.....                                                       | 68 |
| <b>Figura 27B.</b> Amplificación del gen <i>ARNr16S</i> en cepa de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS (continuación).....                                        | 68 |
| <b>Figura 28.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen <i>ARNr16S</i> del aislado M1/A/C/27. ....                                      | 69 |
| <b>Figura 29.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen <i>ARNr16S</i> del aislado M2/A/MCC/41. ....                                    | 70 |
| <b>Figura 30.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen <i>ARNr16S</i> del aislado M2/A/MCC/42. ....                                    | 71 |
| <b>Figura 31.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen <i>ARNr16S</i> del aislado M3/A/MCC/51. ....                                    | 72 |
| <b>Figura 32A.</b> Distribución de cepas de <i>Enterobacterales</i> resistentes a antibacterianos $\beta$ -lactámicos aisladas de AF .....                           | 76 |
| <b>Figura 32B.</b> Distribución de cepas de <i>Enterobacterales</i> resistentes a antibacterianos no $\beta$ -lactámicos aisladas de AF .....                        | 77 |
| <b>Figura 33.</b> Distribución de cepas de <i>Enterobacterales</i> resistentes a antibacterianos aisladas de EF.....                                                 | 77 |
| <b>Figura 34.</b> Controles de calidad usados para detección fenotípica de BLEE y AmpC. ....                                                                         | 83 |
| <b>Figura 35.</b> Detección de carbapenemasas mediante <i>Blue Carba</i> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AF. ....                                    | 87 |
| <b>Figura 36.</b> Identificación de carbapenemasas mediante <i>NG-Test® CARBA-5</i> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas AF.....                             | 88 |

|                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 37.</b> Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) a IPM en cepas de <i>Enterobacterales</i> productoras de carbapenemasas..... | 89  |
| <b>Figura 38A.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>SHV</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS. ....                           | 90  |
| <b>Figura 38B.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>SHV</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS. (Continuación). ....           | 91  |
| <b>Figura 39.</b> Digestión enzimática con <i>NheI</i> de cepa <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/23.....                                             | 91  |
| <b>Figura 40.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS.....                             | 93  |
| <b>Figura 41.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de β-lactamasa tipo TEM producida por la cepa <i>E. coli</i> M2/A/C/29.....      | 94  |
| <b>Figura 42.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de β-lactamasa tipo TEM producida por la cepa <i>E. coli</i> M4/A/C/19.....      | 95  |
| <b>Figura 43.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de β-lactamasa tipo TEM producida por la cepa <i>E. coli</i> M4/A/C/26.....      | 96  |
| <b>Figura 44A.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS. ....                  | 98  |
| <b>Figura 44B.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS (Continuación). ....   | 99  |
| <b>Figura 44C.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS (Continuación). ....   | 99  |
| <b>Figura 45.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-2-like</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS. ....                   | 100 |
| <b>Figura 46.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-8-like</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS .....                   | 100 |
| <b>Figura 47.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS. ....                   | 101 |
| <b>Figura 48.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS .....                            | 102 |

|                                                                                                                                                                                                                                           |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 49.</b> Árbol filogenómico de máxima verosimilitud que muestra la relación entre <i>K. pasteurii</i> M2/A/C/34 y otras 38 cepas de la misma especie recolectadas alrededor del mundo.....                                       | 107 |
| <b>Figura 50.</b> Árbol filogenómico de máxima verosimilitud que muestra la relación entre <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> M3/A/M/3 ST273 y otras 138 cepas de la misma especie y STs recolectadas alrededor del mundo..... | 108 |
| <b>Figura 51.</b> Prevalencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de <i>Enterobacterales</i> aisladas de AS. ....                                                                                                   | 109 |
| <b>Figura 52.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>SHV</sub> en muestras de AS .....                                                                                                                                                | 115 |
| <b>Figura 53.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> en muestras de AS.....                                                                                                                                                 | 116 |
| <b>Figura 54.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de $\beta$ -lactamasa tipo TEM detectada en la muestra de AS 2A. ....                                                                                               | 117 |
| <b>Figura 55.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de $\beta$ -lactamasa tipo TEM detectada en la muestra de AS 2E. ....                                                                                               | 118 |
| <b>Figura 56.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub> en muestras de AS .....                                                                                                                                       | 119 |
| <b>Figura 57.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de $\beta$ -lactamasa tipo CTX-M-1-like detectada en la muestra de AS 3E. ....                                                                                      | 121 |
| <b>Figura 58.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de $\beta$ -lactamasa tipo CTX-M-1-like detectada en la muestra de AS 4A. ....                                                                                      | 122 |
| <b>Figura 59.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> en muestras de AS .....                                                                                                                                                | 123 |
| <b>Figura 60.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo KPC detectada en la muestra de AS 3A. ....                                                                                                    | 124 |
| <b>Figura 61.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo KPC detectada en la muestra de AS 3E. ....                                                                                                    | 125 |
| <b>Figura 62.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>VIM</sub> en muestras de AS. ....                                                                                                                                                | 127 |
| <b>Figura 63.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo VIM detectada en la muestra de AS 2A. ....                                                                                                    | 128 |
| <b>Figura 64.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo VIM detectada en la muestra de AS 3A. ....                                                                                                    | 129 |
| <b>Figura 65.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo VIM detectada en la muestra de AS 4A. ....                                                                                                    | 130 |

|                                                                                                                                               |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Figura 66.</b> Detección molecular de <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> en muestras de AS .....                                            | 132 |
| <b>Figura 67.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo OXA-48-like detectada en la muestra de AS 3E..... | 133 |
| <b>Figura 68.</b> Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo OXA-48-like detectada en la muestra de AS 4A..... | 134 |

## ABREVIATURAS.

AS: Aguas servidas

ALN: Agua libre de nucleasas

PTAS: Planta de tratamiento de aguas servidas

AF: Afluente

EF: Efluente

C3G: Cefalosporinas de tercera generación

BLEE:  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido

BGN: Bacilos Gram negativos

GRAs: Genes de resistencia antibiótica

RA: Resistencia antibiótica

THG: Transferencia horizontal genética

MDR: Multirresistente

XDR: Extensivamente resistente

PDR: Pan-resistente

SC: Serotipo capsular

ST: Secuencio tipo

ATBs: Antibióticos

EGMs: Elementos genéticos móviles

SGC: Secuenciación genómica completa

rMLST: *Ribosomal Multi Locus Sequence Typing*

ANIb%: Porcentaje de identidad nucleotídica promedio con algoritmo BLAST+

DDH%: Porcentaje de hibridación ADN-ADN *in silico*

MLST: *Multilocus sequence typing*

cgMLST: *Core-genome Multilocus Sequence Typing*

SNPs: *Single Nucleotide Polymorphisms*

BGN-F: Bacilos Gram negativos fermentadores

BGN-NF: Bacilos Gram negativos no fermentadores

PFGE: Electroforesis en gel de campo pulsado

ERIC-PCR: *Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction*

## RESUMEN.

La resistencia a cefalosporinas de tercera generación (C3G), y a carbapenémicos mediada por  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y, por carbapenemasas respectivamente, constituye un creciente problema a nivel mundial, por ser mecanismos de resistencia de prioridad crítica, presentes principalmente, aunque no exclusivamente en *Enterobacterales*. La resistencia a tales antibacterianos se ha estudiado tradicionalmente durante décadas, desde una perspectiva antropocéntrica. Sin embargo, las evidencias más recientes indican que la fauna doméstica y silvestre, la flora, así como otros sustratos naturales, también se han perjudicado por dicho problema, por lo cual, se ha incentivado su estudio desde el enfoque “One health”.

Las plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) constituyen importantes reservorios de múltiples contaminantes, en las cuales se han pesquisado por varios autores a nivel internacional, bacterias resistentes productoras de BLEE y carbapenemasas, así como genes codificantes para tales enzimas, directamente en muestras de aguas servidas (AS) y de lodos. No obstante, en Chile existen escasos reportes sobre resistencia a antibióticos en AS, por lo que el objetivo de esta tesis fue; evaluar diferencias en las cargas de *Enterobacterales* resistentes a C3G y/o carbapenémicos y en la carga de genes que codifican BLEE y/o carbapenemasas, por acción del tratamiento de las AS del Gran Concepción.

Se obtuvieron 8 muestras de AS, (4 de afluente (AF) y 4 de efluente (EF)), entre Enero y Julio de 2022, las que se sembraron en agar R2A, MacConkey (MCC), MacConkey suplementado con ceftriaxona (MCC+C) y MacConkey suplementado con meropenem (MCC+M), empleando diluciones seriadas para estimar recuentos bacterianos. Se aislaron un total de 205 Bacilos Gram negativos (BGN), de los cuales 50 correspondieron a *Enterobacterales* (48 de AF y 2 EF). A estos últimos, se les determinó la susceptibilidad a diferentes antibióticos mediante antibiograma, la detección fenotípica y genotípica de BLEE y carbapenemasas. Además, directamente desde las mismas muestras de AF y EF, se llevó a cabo detección genotípica de dichas enzimas.

Los recuentos bacterianos se redujeron significativamente en todas las muestras de AF en comparación a las de EF, y en todos los medios de cultivo empleados, sobre todo, los recuentos totales, que disminuyeron entre 5 a 6 logaritmos. De los *Enterobacterales* aislados, las especies más frecuentes fueron *E. coli* (16/50), *K. pneumoniae* complex (12/50), y *K. oxytoca* complex (6/50). En las cepas de *Enterobacterales* obtenidos de AF (48/50), 7 cepas demostraron índices MAR > 0,5, de las cuales; dos destacaron por poseer MAR de 0,81 y 0,75, presentando resistencia a 13 y 12 antibióticos de 16 probados. Otras tres presentaron un MAR de 0,63, (resistentes a 10/16 antibacterianos). Mientras que las dos restantes poseyeron un MAR de 0,56 (resistentes a 10/16 antibacterianos). Además, 8 cepas presentaron perfiles MDR.

En la detección fenotípica de BLEE se obtuvo positividad en 23/48 cepas de AF y 1/2 cepas de EF, mientras que 3/48 de AF resultaron positivas para detección fenotípica de carbapenemasas. En relación con los genes codificantes de BLEE, estos se detectaron en 23/48 cepas de AF y en 1/2 de EF, siendo *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> el prevalente entre los 50 *Enterobacterales* indagados. Luego, en 3/48 cepas de AF se detectó el gen codificante de carbapenemasas *bla*<sub>KPC-2</sub>. Mientras que, en las cepas de EF, no se detectaron genes codificantes de carbapenemasas. Por otra parte, directo de las AS, se detectaron los genes *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub> en AF y EF, mientras que *bla*<sub>VIM</sub> se encontró solo en las muestras de AF.

La reducción de los recuentos bacterianos demostró la eficacia del tratamiento de AS del Gran Concepción sobre la vida bacteriana, pero no así sobre los genes codificantes de BLEE y carbapenemasas disueltos en las AS. Los *Enterobacterales* estudiados representaron un bajo porcentaje (27%) de los 205 BGN totales, por lo que, los restantes 155 (73%) organismos podrían poseer una participación más importante en la mantención y diseminación de genes de resistencia antibiótica (GRAs) en AS. Las BLEE fueron las enzimas más prevalentes en las cepas estudiadas, siendo *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> el gen codificante más frecuente encontrado en estas, lo que conecta con el hallazgo de este en todas las muestras de AS.

Por lo tanto, la pesquisa de los variados genes codificantes de BLEE y de carbapenemasas, tanto en los *Enterobacterales* estudiados, como directamente desde las AS, demuestra la capacidad de estas últimas de almacenar y transmitir GRAs de alto impacto en salud pública.



## ABSTRACT.

The emergence of resistance to third-generation cephalosporins (TGC) and carbapenems, driven by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and carbapenemases respectively, represents a significant global challenge. These critical priority resistance mechanisms are primarily, though not exclusively, present in *Enterobacterales*. For decades, the study of resistance to antibacterials has been approached from an anthropocentric perspective. Recent evidence suggests that domestic and wild animals, plants, and other natural elements have also been impacted by this issue. Therefore, research in this area is promoted through the "One Health" approach.

Wastewater treatment plants (WWTPs) are significant reservoirs of various contaminants. Several international studies have detected ESBL and carbapenemase-producing resistant bacteria, as well as genes encoding these enzymes, directly in wastewater (WW) and sludge samples. However, in Chile, there limited reports on antibiotic resistance in WW. Therefore, the objective of this thesis was to evaluate differences in the loads of *Enterobacterales* resistant to TGC and/or carbapenems and in the load of ESBL and/or carbapenemases-encoding genes, due to the treatment of WW in the Gran Concepción Metropolitan area.

Between January and July 2022, eight WW samples were collected: four from influent (IF) and four from effluent (EF). The samples were cultured on R2A agar, MacConkey (MCC), MacConkey supplemented with ceftriaxone (MCC+C), and MacConkey supplemented with meropenem (MCC+M), using serial dilutions to estimate bacterial counts. A total of 205 Gram-negative bacilli (GNB) were isolated, including 50 *Enterobacterales* (48 from IF and 2 from EF). The fifty strains were tested for antibiotic susceptibility using antibiograms, and ESBL and carbapenemases detection was conducted phenotypically and genotypically. Genotypic detection of these enzymes was also performed directly from the same IF and EF samples.

Bacterial counts in all IF samples were significantly lower than in EF samples, across all culture media used, with total counts dropping by 5 to 6 logarithms. Among the isolated *Enterobacterales*, the most frequent species were *E. coli* (16/50), *K. pneumoniae* complex (12/50), and *K. oxytoca* complex (6/50). In the *Enterobacterales* strains obtained from IF (48/50), 7 strains showed MAR indices > 0.5, of which two stood out with MAR of 0.81 and 0.75, showing resistance to 13 and 12 antibiotics out of 16 tested. Three others had an MAR of 0.63 (resistant to 10/16 antibacterials), while the remaining two had a MAR of 0.56 (resistant to 10/16 antibacterials). Furthermore, eight strains demonstrated multidrug-resistant (MDR) profiles.

In phenotypic ESBL detection, 23/48 IF and 1/2 EF strains were positive. Additionally, 3/48 IF strains tested positive for carbapenemases. ESBL-encoding genes were found in 23 of 48 IF strains and 1 of 2 EF strains, with *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> being the most common among the 50 *Enterobacterales* studied. Furthermore, the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene, which encodes for carbapenemase, was identified in 3 out of 48 IF strains. No carbapenemase genes were found in the EF strains. Moreover, from the WW samples, *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, and *bla*<sub>OXA-48-like</sub> genes were present in both IF and EF, while *bla*<sub>VIM</sub> was detected only in the IF samples.

The reduction in bacterial counts demonstrated the effectiveness of the WW treatment in the Gran Concepción Metropolitan area on bacterial life, but not on the ESBL and carbapenemase-encoding genes dissolved in the WW. The studied *Enterobacterales* represented a low percentage (27%) of the total 205 GNB, suggesting that the remaining 155 (73%) organisms might play a more significant role in the maintenance and dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) in WW. ESBLs were the most prevalent enzymes in the studied strains, with *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> being the most frequent encoding gene, which correlates with its presence in all WW samples.

Therefore, the detection of various ESBL and carbapenemase-encoding genes, both in the studied *Enterobacterales* and directly from the WW samples, demonstrates the latter's ability to store and transmit ARGs with a high impact on public health.

## **1. INTRODUCCIÓN.**

### **1.1. Resistencia antibiótica (RA).**

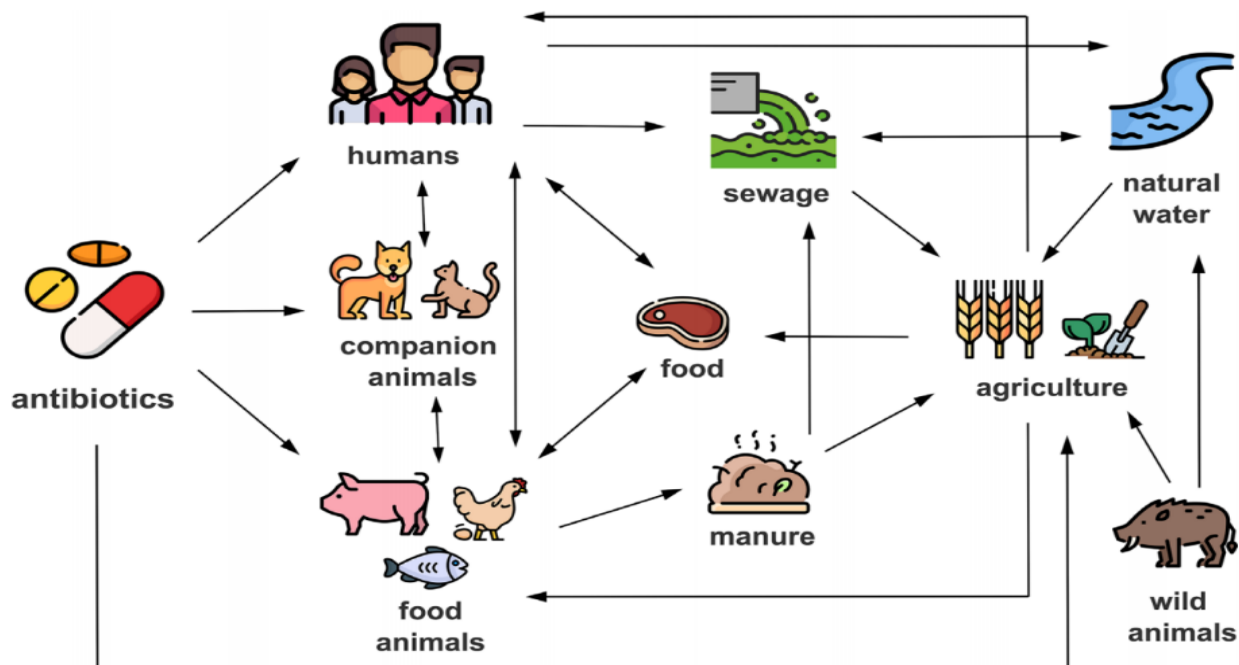
La resistencia antibiótica (RA) es la habilidad que tienen las bacterias de desarrollarse en presencia de altas concentraciones de antibióticos, independientemente del tiempo de duración de un tratamiento, provocada por mutaciones heredadas y/o por eventos de transferencia horizontal genética (THG), implicados en la movilización de genes de resistencia antibiótica (GRA) (Brauner et al., 2016). Este fenómeno constituye un problema de salud global, ocasionando un incremento en la selección de cepas resistentes, que se diseminan en instalaciones de salud, en animales de granja, en alimentos, en la comunidad y el ambiente. Esto ha traído consigo perjuicios en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incrementando la morbi-mortalidad en humanos y animales, y por ende maximizando el nivel de gastos en atención sanitaria. Por otro lado, además ha desencadenado riesgos en la producción agrícola y ganadera (IACG, 2019).

Actualmente se registran aproximadamente 700.000 muertes al año a nivel mundial, atribuidas a bacterias resistentes a antibióticos (BRA), y se estima que dicha cifra se incremente a más de 10 millones por año en 2050, si no se implementan acciones concretas que disminuyan la emergencia de BRA (Huemer et al., 2020). Por otro lado, cabe destacar que del total de antibióticos que se manufacturan al año, el 30% se utiliza en seres humanos, cuyo consumo se incrementó en un 36% en la década del 2000. El 70% restante se emplea en animales, y se estima que la utilización en ganadería se intensifique en un 67% hacia el 2030. Por otro lado, en la acuicultura hasta un 75% de los antibióticos empleados se pierden en el entorno (PNUMA, 2017). Así mismo, se ha detectado la presencia de residuos de antibióticos y BRA, los cuales se propagan entre la fauna silvestre, cuyas excretas contaminan los suelos y el agua circundantes (CDC, 2019).

Es por ello, por lo que este problema debe abordarse de una manera más transversal, dejando atrás el punto de mira antropocéntrico, e incorporando distintos profesionales del área biomédica, de la medicina humana, veterinaria, y vegetal, e inclusive de las ciencias sociales, así como de la comunidad en general, de modo de proponer con un enfoque más integral acciones de remediación, por lo que en la actualidad se impulsa el estudio de la RA con enfoque en “Una salud”. (Aslam et al., 2021). Consecuentemente, desde dicho punto de vista, las rutas de transmisión de la RA entre humanos, animales, y el ambiente se encuentran bien establecidas como se indica en la **Figura 1** (Serna & Gonzalez-Zorn, 2022). Por otro lado, dentro de los factores que más contribuyen al desarrollo de RA, se encuentran el uso inadecuado o excesivo de antibióticos en humanos, y animales, la transmisión sanitaria de patógenos bacterianos resistentes, las dosis subóptimas, incluyendo fármacos de calidad inferior y falsificados, y la contaminación ambiental entre otros. (McEwen & Collignon, 2018).

## **1.2. Bacterias resistentes a antibióticos (BRA) de prioridad global.**

En la actualidad, una de las más importantes preocupaciones asociadas a la RA, es el surgimiento de patógenos multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR), y pan-resistentes (PDR) (Serna & Gonzalez-Zorn, 2022), de modo que el 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de 12 patógenos prioritarios resistentes a antibacterianos, con el propósito de propiciar la investigación y fabricación de nuevas moléculas terapéuticas, recientemente actualizada en 2024 (**Tabla 1**). Dicha lista ordena los microorganismos en 3 categorías; prioridad media, alta, y crítica, donde en esta última se ubican; *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos, *Enterobacterales* resistentes a cefalosporinas de tercera generación (C3G) y a carbapenémicos, y *Mycobacterium tuberculosis* resistente a rifampicina, siendo estos considerados los más peligrosos debido a su alta capacidad de diseminación, y por su capacidad de desencadenar infecciones severas y frecuentemente mortales. (WHO, 2017, 2024; Asokan et al., 2019).



**Figura 1. Rutas de transmisión de la RA entre humanos, animales y el ambiente.**

La administración de antibacterianos a humanos y animales posibilita la selección de BRA, las cuales se diseminan entre los mismos, hacia a productos desechos como estiércol y/o aguas servidas (AS), como también a productos alimenticios, donde estos últimos, al ser empleados en humanos y animales, permiten una transferencia reversa de patógenos resistentes. Consecutivamente, las BRA presentes en las AS se transfieren hacia masas de agua naturales, como también a campos de cultivo agrícolas. Por otro lado, la agricultura también recibe antibióticos, y patógenos resistentes desde masas de agua, estiércol, y fauna salvaje, mientras que los alimentos derivados de dicha práctica posibilitan igualmente la transferencia de BRA a humanos y animales, instaurándose un círculo vicioso global de diseminación de RA.

Fuente: Obtenido de Serna and González-Zorn (2022).

**Tabla 1. Patógenos resistentes prioritarios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la investigación y desarrollo de nuevos antibacterianos.**

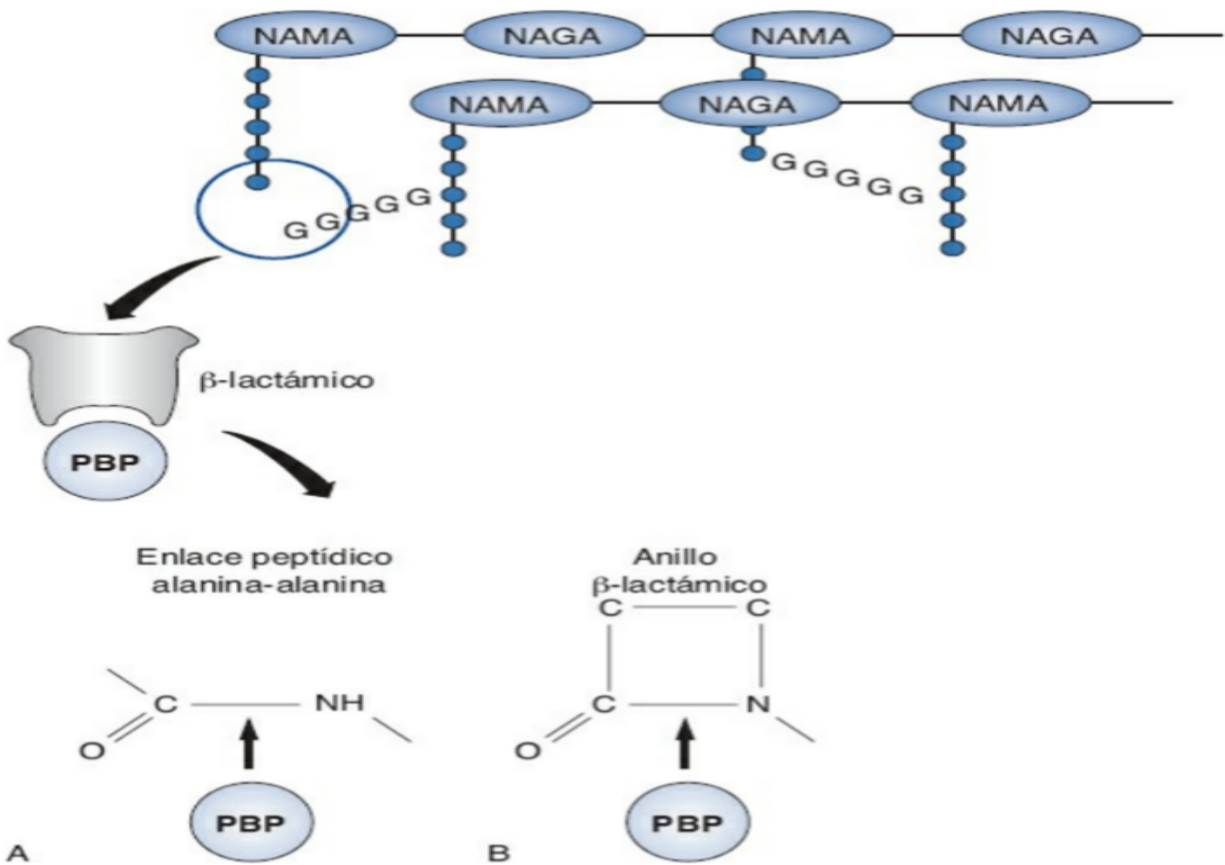
| Categoría de prioridad                                     |                                                                    |                                                                   |
|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Critica                                                    | Alta                                                               | Media                                                             |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos | <i>Salmonella Typhi</i> resistente a fluoroquinolonas              | <i>Streptococcus</i> β-hemolítico grupo A resistente a macrólidos |
| <i>Enterobacterales</i> resistentes a C3G                  | <i>Shigella</i> spp. resistente a fluoroquinolonas                 | <i>Haemophilus influenzae</i> resistente a ampicilina             |
| <i>Enterobacterales</i> resistentes a carbapenémicos       | <i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina               | <i>Streptococcus</i> β-hemolítico grupo B resistente a penicilina |
|                                                            | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente a carbapenémicos          |                                                                   |
|                                                            | <i>Salmonella</i> no tifoidea resistente a fluoroquinolonas        |                                                                   |
|                                                            | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> resistente a C3G y/o fluoroquinolonas |                                                                   |
|                                                            | <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina               |                                                                   |

**C3G:** Cefalosporinas de tercera generación

Fuente: Obtenido de WHO (2024).

### 1.3. Cefalosporinas de tercera generación (C3G).

Las C3G son un grupo de antibacterianos bactericidas, pertenecientes a la clase de los  $\beta$ -lactámicos, los cuales actúan bloqueando el proceso de transpeptidación durante la síntesis del peptidoglicano, efectuado por las proteínas de fijación a penicilina (*penicillin binding proteins*) (PBP), inhibiéndose la síntesis de la pared celular bacteriana, encadenando la lisis de esta (**Figura 2**). (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Suárez & Gudiol, 2009).



**Figura 2. Mecanismo de acción de antibacterianos  $\beta$ -lactámicos.**

**A:** Sin presencia de  $\beta$ -lactámicos, la proteína de unión a penicilina (PBP) ejerce su función normalmente, reconociendo y catalizando el enlace peptídico entre dos subunidades de alanina de la cadena peptídica lateral de peptidoglucano. **B:** En presencia de dicha clase de antibióticos, el anillo  $\beta$ -lactámico del fármaco simula ser el enlace peptídico, por lo que la PBP intenta infructuosamente catalizar tal anillo, provocando la inactivación de esta.

Fuente: modificado de Hauser (2019).

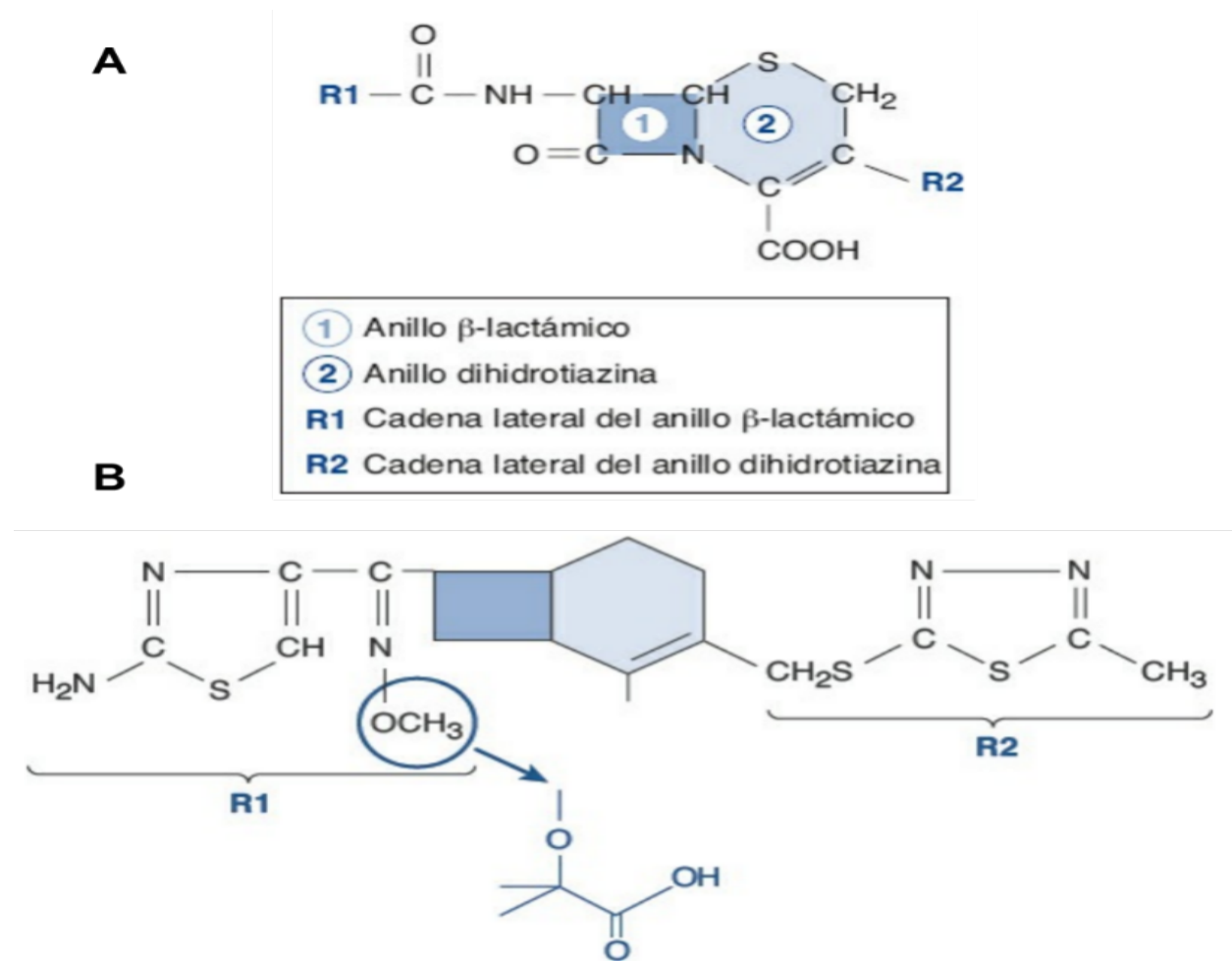
Las C3G representan el subgrupo de cefalosporinas más frecuentemente prescrito, y además corresponden a uno de los  $\beta$ -lactámicos más empleados en la actualidad para el tratamiento de infecciones bacterianas, cuyos principales representantes son ceftriaxona (CRO), cefotaxima (CTX) y ceftazidima (CAZ) entre otros. Por otro lado, dicho tipo de moléculas se caracterizan por ser de amplio espectro, por lo que poseen actividad sobre bacterias Gram negativas y positivas. No obstante, su funcionamiento es superior sobre las primeras, especialmente contra especies de *Enterobacterales*, que sobre las segundas como *Streptococcus* spp. y *Staphylococcus* spp. (Arumugham et al., 2024).

La estructura general de una cefalosporina se compone de ácido 7-amino-cefalosporánico, un anillo  $\beta$ -lactámico fusionado a otro anillo dihidrotiazina, lo que le confiere al fármaco mayor resistencia a la hidrólisis por  $\beta$ -lactamasas v/s las penicilinas, junto con dos grupos radicales R1 y R2 (**Figura 3A**), los cuales varían en su configuración dependiendo de la generación de cefalosporina. Es así como la estructura química de R1 establece una mayor o menor atracción de la molécula por las PBP, mientras que la composición de R2 determina las características farmacocinéticas del compuesto (Aguayo-Reyes & Mella Montecinos, 2023).

Una modificación típica en variadas C3G es la incorporación de un grupo aminotiazolil en R1 (**Figura 3B**), resultando en acceso más eficaz de estos compuestos a través de la membrana externa bacteriana, mayor afinidad por las PBP, y estabilidad maximizada frente a algunas  $\beta$ -lactamasas plasmídicas. (Hauser, 2019). CRO y CTX comparten un espectro de actividad similar. Sin embargo, se diferencian en cuanto a su unión a proteínas séricas (95 v/s 35, respectivamente), y en cuanto su vida media de eliminación (8,8 v/s 1,2 h, respectivamente) (Gondane & Pawar, 2023). Seguidamente, Nath et al. (1995) determinaron que la actividad antibacteriana de CRO *in vitro* comparada con la de CTX, disminuyó considerablemente en presencia de albumina sérica, por lo que la intensa unión a proteínas séricas de CRO, puede limitar su actividad *in vivo*.



Una desventaja presente en estos fármacos es la inactividad sobre *Pseudomonas aeruginosa*, la cual sin embargo es contraatacada mediante la incorporación de un grupo ácido  $\alpha$ -hidroxiisobutírico el radical R1 de ceftazidima (**Figura 3B**), incrementando exponencialmente su capacidad anti-pseudomonas (Hauser, 2019).



**Figura 3. Estructura química de cefalosporinas.**

**A:** estructura básica de una cefalosporina, **B:** estructura de una cefalosporina de tercera generación (C3G). **Nota:** en un círculo celeste se destaca un grupo metoxi, el cual es reemplazado por ácido  $\alpha$ -hidroxiisobutírico en Ceftazidima, lo que le provee actividad anti-pseudomonas.

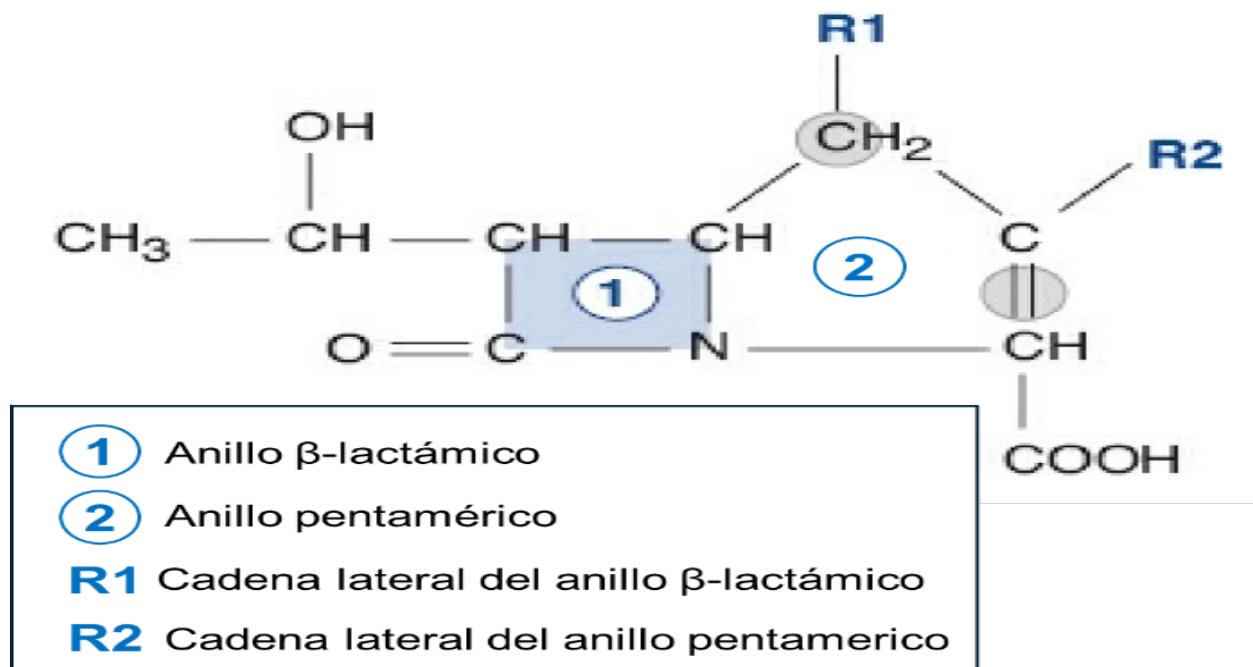
Fuente: modificado de Hauser (2019).

#### 1.4. Carbapenémicos.

Al igual que las C3G, los carbapenémicos pertenecen a la clase de los  $\beta$ -lactámicos, por lo que poseen un mecanismo de acción similar, cuyos principales representantes son imipenem (IPM), meropenem (MEM) y ertapenem (ETP). Aunque son fármacos de amplio espectro, su actividad es más intensa sobre Gram negativos, debido a que como son relativamente pequeñas, pueden acceder fácilmente a las PBPs (principalmente 1a, 1b, 2 y 3) a través de varias porinas en la membrana externa bacteriana (Fresnadillo-Martínez et al., 2010).

La estructura general de un carbapenémico se compone de un anillo  $\beta$ -lactámico acoplado a un anillo pentamérico, el cual posee un doble enlace y un grupo metilo en reemplazo de azufre (**Figura 4**). Por otro lado, las modificaciones en los radicales R1 y R2 presentes en el anillo pentamérico, son las que denominan a los representantes de este grupo de fármacos, donde cada molécula posee un grupo hidroximetil, el cual les confiere resistencia a varias  $\beta$ -lactamasas incluyendo BLEE (Aguayo-Reyes & Mella Montecinos, 2023), razón por cual, estos antibacterianos se han convertido en alternativas terapéuticas frente a infecciones provocadas por *Enterobacterales* y algunos Bacilos Gram negativos no fermentadores (BGNNF) resistentes a C3G.

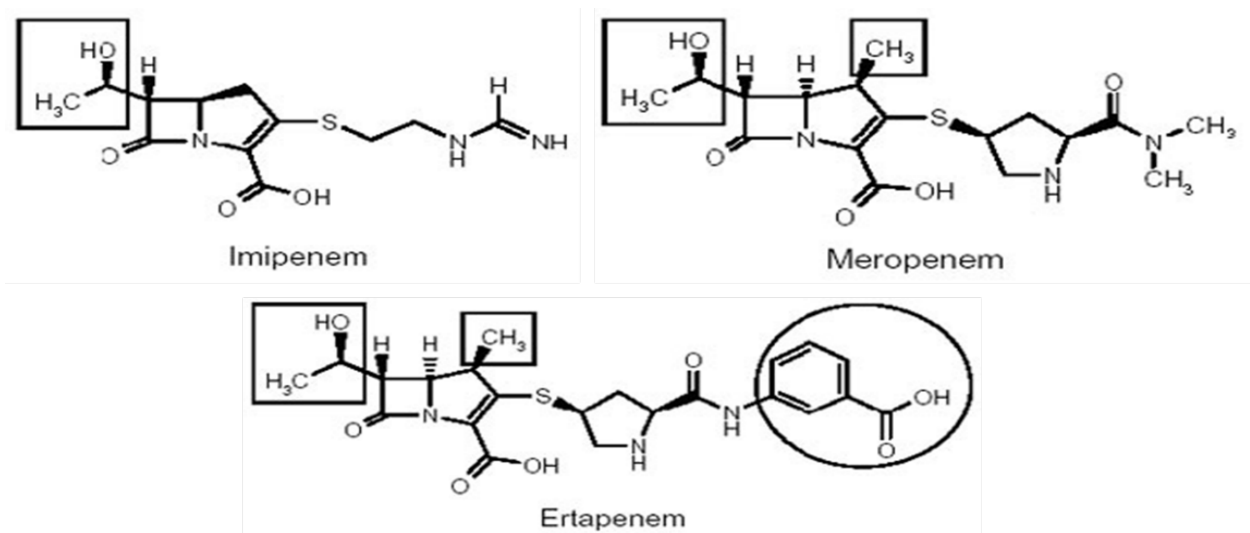
El primer representante de los carbapenémicos en ser aprobado para su uso clínico en 1985 fue IPM (**Figura 5**), usándose ampliamente hasta la actualidad. A diferencia de los demás miembros de dicho grupo, este no posee R1, y debe administrarse en compañía de cilastatina para evitar ser hidrolizado por la enzima renal dehidropeptidasa-1 (DHP-1). En el caso de MEM (**Figura 5**), este posee un grupo metilo en R1 el cual lo protege de ser degradado por DHP-1, por lo que no necesita de cilastatina. Seguidamente, posee un espectro y eficacia similar a IPM, salvo que posee actividad sobre algunas cepas de *P. aeruginosa* resistentes a IPM debido a impermeabilidad.



**Figura 4. Estructura química básica de un carbapenémico.**

Fuente: modificado de Hauser (2019).

Por otro lado, ETP (**Figura 5**) al igual que IPM posee un grupo metilo en R1, por lo que tampoco necesita de cilastatina. Sin embargo, posee un gran tamaño debido a su característico R2, lo que impide su acceso a BGNNF. No obstante, dicha limitación resulta atenuada gracias a poder ser dosificada una sola vez al día. (Hauser, 2019; Aguayo-Reyes & Mella Montecinos, 2023).

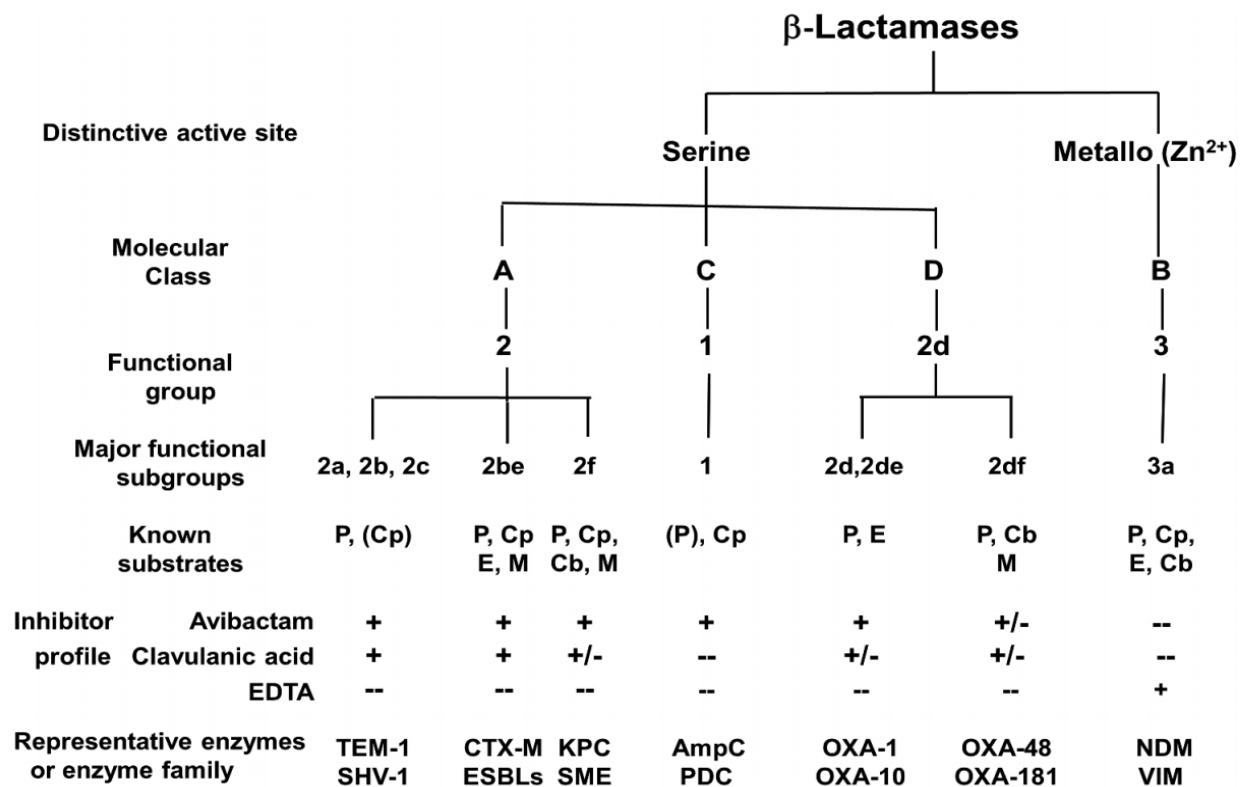


**Figura 5. Estructura química de imipenem, meropenem y ertapenem.**

Fuente: modificado de Morales I (2003)

### 1.5. $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE).

Estas enzimas poseen la capacidad de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, y monobactámicos, pero no cefamicinas (cefotaxima y cefotetan) ni tampoco carbapenémicos. Se pueden inactivar con inhibidores como; sulbactam, tazobactam, ácido clavulánico y avibactam (Kon & Rai, 2016). De acuerdo con sus secuencias aminoacídicas, en base a la clasificación de  $\beta$ -lactamasas de Ambler, las BLEE se ubican en el grupo molecular A, debido a que poseen residuos de serina en su sitio catalítico, dentro de un total de 4 grupos (A, B, C, y D) (**Figura 6**).



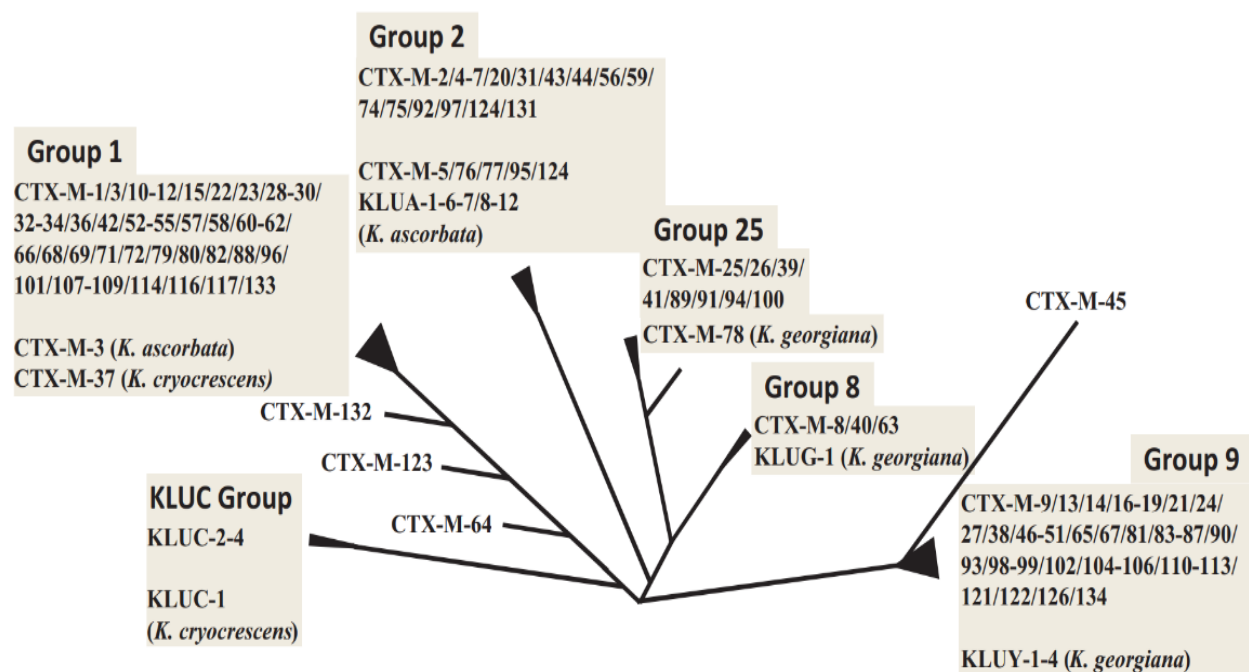
**Figura 6. Correlación simplificada entre nomenclatura molecular y funcional centrada en las  $\beta$ -lactamasas de mayor relevancia clínica.**

Los sustratos encerrados entre paréntesis representan  $\beta$ -lactámicos hidrolizados débilmente por aquel subgrupo de enzimas indicado. **(+)**: inhibición eficaz. **(+/-)**: inhibición dependiente de la enzima específica. **(-)**: sin inhibición. **Cb**: carbapenémicos. **Cp**: cefalosporinas. **E**: cefalosporinas de espectro extendido. **M**: monobactámicos. **P**: penicilinas.

Fuente: Obtenido de Bush (2023).

Además, de acuerdo con sus especificidades de sustrato y perfiles de inhibición, en base a la clasificación de  $\beta$ -lactamasas de Bush-Jacoby-Medeiros, las BLEE se encuentran en el subgrupo funcional 2be, ubicado a su vez en el grupo funcional 2, de un total de 4 grupos (1, 2, 2d y 3) (Bush et al., 1995; Munita & Arias, 2016; Bush, 2018) (**Figura 6**).

Las BLEE se distribuyen principalmente en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* entre otras, donde la familia CTX-M (*cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase*) es la más importante. De igual manera, algunas variantes dentro de las enzimas SHV (*sulphydryl reagent variable*) y TEM, también pueden hidrolizar C3G. Las enzimas CTX-M se clasifican filogenéticamente en 5 grupos principales, CTX-M-1-like, CTX-M-2-like, CTX-M-8-like, CTX-M-9-like, y CTX-M-25-like, siendo los grupos 1 y 9 los más diversos, compuestos de 125 y 75 variantes, respectivamente (Naas et al., 2017) (**Figura 7**). Seguidamente, la variante CTX-M-15 del grupo 1, es la enzima prevalente a nivel mundial, la que además ha sido asociada al clon internacional de alto riesgo *E. coli* ST131, transportada en plásmidos de tipo IncF (El Salabi et al., 2013; Kon & Rai, 2016). Finalmente, se han identificado diferentes secuencias de inserción (IS) corriente arriba de los genes codificantes *bla*<sub>CTX-M</sub>, incluyendo ISEcp1, ISCR1, IS10 e IS26, mientras que los elementos corriente abajo son menos conocidos (Canton et al., 2012). Por otra parte, los genes *bla*<sub>CTX-M</sub> son frecuentemente transportados en plásmidos de tipo IncF, IncN, y IncK (El Salabi et al., 2013; Mathers et al., 2015). El ambiente genético de *bla*<sub>CTX-M</sub> se describe en la **Figura 8**.



**Figura 7. Árbol filogenético que muestra la similitud entre enzimas del linaje CTX-M y la agrupación de miembros de diferentes grupos CTX-M.**

Los miembros de los grupos principales están sombreados en gris. Los triángulos rellenos al final de algunas ramas indican la presencia de variantes alélicas menores dentro del grupo correspondiente, y el tamaño de los triángulos refleja el número de variantes.

Fuente: Obtenido de D'Andrea et al. (2013).

## 1.6. Carbapenemasas.

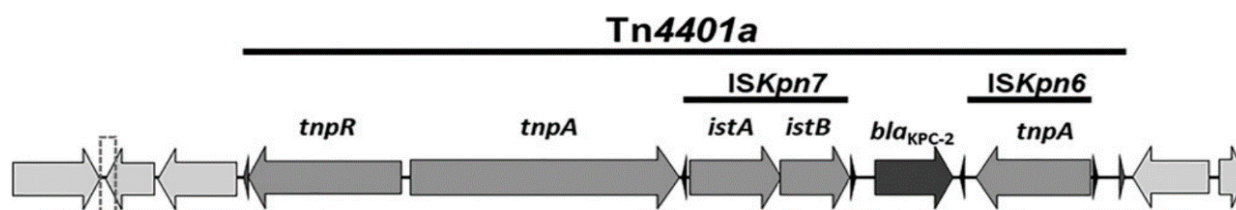
Estas enzimas de acuerdo con la clasificación de Ambler, se ubican en las clases moleculares A, B y D. Las pertenecientes a la clase A y D corresponden a serino- $\beta$ -lactamasas, debido a que poseen residuos de serina en su sitio catalítico. Mientras que las pertenecientes a la clase B se denominan metalo- $\beta$ -lactamasas, puesto que necesitan de iones zinc como cofactores en su sitio catalítico para ser activas. Por otra parte, de acuerdo con la clasificación de Bush-Jacoby-Medeiros, las carbapenemasas se distribuyen en los subgrupos funcionales 2f (perteneciente al grupo 2), 2df (ubicado en el grupo 2d) y 3a (ubicado en el grupo 3) (Bush et al., 1995; Munita & Arias, 2016; Bush, 2018) (**Figura 6**).



Las enzimas de la clase A de Ambler (subgrupo 2f de Bush-Jacoby-Medeiros), se caracterizan por hidrolizar todos los  $\beta$ -lactámicos, a excepción de las cefamicinas. Mientras que se inhiben con ácido fenilborónico, ácido clavulánico, tazobactam, y avibactam. Las principales familias enzimáticas de este grupo son IMI (*Imipenem-hydrolyzing*), SME (*Serratia marcescens* enzyme), NMC (*nonmetallo-enzyme carbapenemase*), GES (*Guiana extended-spectrum*) y KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), siendo esta última, la más frecuentemente informada a nivel global (Bush, 2018). Por otro lado, algunas enzimas como SME, NMC, e IMI-1, son de naturaleza cromosómica, mientras que KPC, GES e IMI-2 son de codificación plasmídica (Kon & Rai, 2016).



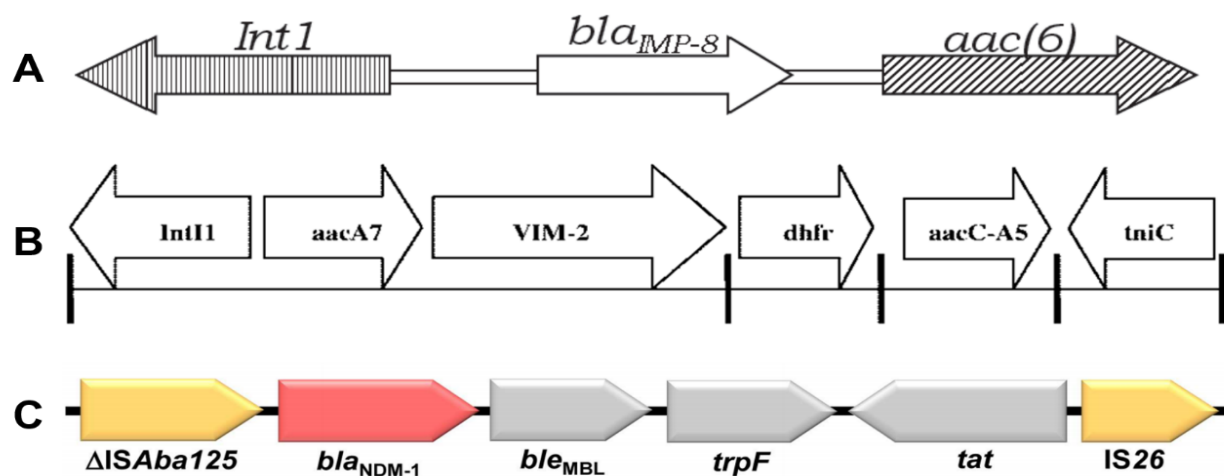
La familia de enzimas KPC se encuentran principalmente en bacterias como *K. pneumoniae*, *E. coli*, y *Enterobacter* spp. Se compone de 205 variantes (Naas et al., 2017), de las cuales KPC-2 y 3 son las prevalentes, y que se han asociado a clones internacionales de alto riesgo de *K. pneumoniae*, de los secuenciotipos ST11, ST340, ST512 y ST258, y pertenecientes al complejo clonal CC258, donde el ST258 es el prevalente (Mathers et al., 2015). Los genes codificantes *bla*<sub>KPC</sub> son generalmente transportados en plásmidos IncFII, a su vez incorporados en transposones tipo Tn4401, y flanqueados por secuencias de inserción ISKpn6 y ISKpn7. (El Salabi et al., 2013; Mathers et al., 2015; Vera-Leiva et al., 2017). El ambiente genético de *bla*<sub>KPC</sub> se detalla en la **Figura 9**



**Figura 9. Representación gráfica del ambiente genético que alberga a *bla*<sub>KPC-2</sub>.**

Fuente: Modificado de Reyes et al. (2021).

Las enzimas de la clase B de Ambler (subgrupo 3a de Bush-Jacoby-Medeiros), hidrolizan todos los  $\beta$ -lactámicos, a excepción de los monobactámicos. Mientras que se inhiben con quelantes de zinc como EDTA, ácido dipicolínico y ácido mercaptopropiónico. (Bush, 2018; Kon & Rai, 2016; Navarro et al., 2011). Las principales familias enzimáticas son GIM (*German imipenemase*), SPM (*Sao Paulo metallo- $\beta$ -lactamase*) IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona Integron-encoded Metallo- $\beta$ -lactamase*) y NDM (*New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase*), siendo IMP, VIM, y NDM, las más frecuentemente informadas a nivel internacional, compuestas de 101, 86, y 61 variantes, respectivamente (Naas et al., 2017) y encontradas principalmente en *Pseudomonas* spp., *A. baumannii*, y en menor medida en *Enterobacterales*. Por otra parte, los genes codificantes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>NDM</sub> son frecuentemente transportados en plásmidos de tipo IncA/C y IncN, y asociados a integrones clase 1 y/o a transposones Tn402. (El Salabi et al., 2013; Kon & Rai, 2016; Mathers et al., 2015). El ambiente genético de *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>NDM</sub> se detalla en la **Figura 10**.

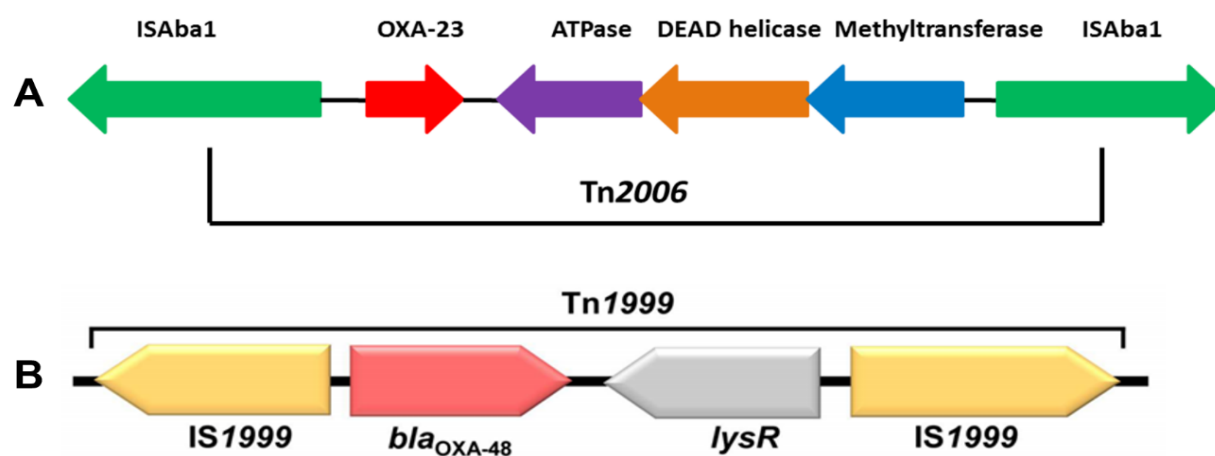


**Figura 10. Representaciones gráficas de los ambientes genéticos que albergan a los genes codificantes de carbapenemasas de la clase B de Ambler.**

**A:** Entorno genético de *bla*<sub>IMP-8</sub>. **B:** Entorno genético de *bla*<sub>VIM-2</sub>. **C:** Entorno genético de *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Fuente: Modificado de Lolans et al., (2005); Chouchani., (2013); Lee et al., (2016).

Dentro de la clase D de Ambler (subgrupo 2df de Bush-Jacoby), algunas enzimas de tipo oxacilinasas, como las familias OXA-23-like y OXA-48-like poseen actividad carbapenemasa, las cuales sólo pueden inhibirse con avibactam. La familia OXA-23-like hidroliza penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, y se encuentra en *Acinetobacter* spp. Dicha familia se compone de 48 variantes (Naas et al., 2017), cuyos genes codificantes *bla*<sub>oxa-23-like</sub> se encuentran asociados a secuencias de inserción *IS*Aba1, e incorporados en transposones Tn2006, Tn2007 y Tn2008. (Adams-Haduch et al., 2008; Mugnier et al., 2010). Por otro lado, la familia OXA-48-like hidroliza intensamente penicilinas, pero débilmente cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos, y se encuentra principalmente en *K. pneumoniae*. Dicha familia posee 57 variantes, cuyos genes codificantes *bla*<sub>oxa-48-like</sub> son transportados en plásmidos IncL/M e incorporados en transposones Tn1999. (Bakthavatchalam et al., 2016; Bush, 2018; Evans & Amyes, 2014; Kon & Rai, 2016; Poirel et al., 2012). El ambiente genético de *bla*<sub>oxa-23-like</sub> y *bla*<sub>oxa-48-like</sub> se detalla en la **Figura 11**.



**Figura 11. Representaciones gráficas de los ambientes genéticos que albergan a los genes codificantes de carbapenemasas de la clase D de Ambler.**

**A:** Entorno genético de *bla*<sub>OXA-23-like</sub>. **B:** Entorno genético de *bla*<sub>OXA-48-like</sub>.

Fuente: Modificado de Lee et al., (2016); Vijayakumar et al., (2020).

### 1.7. Epidemiología de BLEE y carbapenemasas en Chile.

En 1987 se informó el primer aislamiento de una cepa de *K. pneumoniae* productora de SHV-5, correspondiente a una BLEE de tipo SHV. Luego en 1988 se informó una especie similar productora de SHV-2 (igualmente correspondiente a una BLEE). Seguidamente, Jacoby et al., (1988); Gutmann et al., (1989); Jacoby & Medeiros, (1991), informaron las primeras variantes de BLEE de tipo TEM. Posteriormente, Mabilat & Courvalin, (1990); Jacoby & Medeiros, (1991) pesquisaron 7 *Enterobacterales* productores de TEM-13 hasta TEM-19, originarios de Francia, Bélgica, Chile, Inglaterra y Alemania, sin identificar el país exacto del que provenía cada bacteria. En 2002, Bello et al., describieron una nueva variante de SHV de espectro extendido denominada SHV-39.

Las variantes de SHV y TEM de espectro extendido predominaron entre los aislados de *Enterobacterales* por un largo periodo, hasta la aparición de la familia CTX-M, la cual comenzó a prevalecer hasta convertirse en la principal BLEE, tanto en Chile como en el resto del mundo. Es así como Bello et al., (2005) informaron por primera vez el gen *bla*<sub>CTX-M</sub>, presente en un 40,2 % de un total de 122 cepas productoras de BLEE, procedentes de 10 hospitales chilenos y obtenidas entre los años 1998 y 2004. Seguidamente, Moreno et al., (2008) informaron 14 cepas de *E. coli* productoras de BLEE, aisladas de heces de perros y gatos tratados con enrofloxacino en una clínica veterinaria. De las cuales, 8 presentaron *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, y 6 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (variante de *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub>). A continuación, García et al., (2011) informaron 38 *Enterobacterales* productores de BLEE (26 *E. coli*, 9 *K. pneumoniae* y 3 *Proteus mirabilis*), aislados desde hemocultivos de pacientes con bacteriemia entre los años 2004 y 2007. De dichas bacterias, el 97% presentaron *bla*<sub>CTX-M</sub>, con predominio de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> en *E. coli* y *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub> en *P. mirabilis*.

Posteriormente, Benavides et al., (2021) estudiaron prevalencia de portación fecal de *E. coli* en 332 animales de ganado, 82 perros y 172 animales salvajes, obteniéndose 47 cepas de *E. coli* productoras de BLEE. Mientras que un análisis molecular posterior de dichas bacterias identificó *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> como el más prevalente, seguido de los genes *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub>, y *bla*<sub>CTX-M-25-like</sub> respectivamente.

Por otra parte, Fuentes-Castillo et al., (2023) hallaron 2 cepas de *E. coli* poseedoras de *bla*<sub>CTX-M-55</sub> y *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (ambas variantes de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>), pertenecientes a los secuenciotipos ST295 y ST388 respectivamente, aisladas de deposiciones de aves salvajes, en la isla Acuy encontrada en el Golfo Corcovado.

Galarce et al., (2023) informaron el hallazgo de *bla*<sub>CTX-M</sub> en 50 cepas de *E. coli*, de un total de 224 aisladas a partir de deposiciones de 618 perros domésticos en la Región Metropolitana. Mientras que Thomson et al., (2023) detectaron el mismo gen en una cepa de *Citrobacter* sp., y en otra de *K. pneumoniae*, de un total de 22 *Enterobacterales* aislados desde hisopados de útero de 21 yeguas en la Región del Maule.

En la actualidad las carbapenemasas más frecuentemente informadas corresponden a variantes de las familias KPC, NDM y VIM (ISP, 2018). Mendes et al., (2004) detectaron por primera vez la enzima VIM en una cepa de *Pseudomonas fluorescens*, aislada de un hemocultivo en diciembre de 2002. Seguidamente un análisis molecular comprobó la presencia del gen codificante *bla*<sub>VIM-2</sub>. Cifuentes et al., (2012), informaron por primera vez el gen *bla*<sub>KPC</sub> detectado en una cepa de *K. pneumoniae* multirresistente, aislada de orina e hisopado rectal de un paciente oncohematológico chileno, proveniente de Italia. Seguidamente Barría-Loaiza et al., (2016) identificaron 17 cepas de *K. pneumoniae* productoras de KPC, obtenidas de variadas muestras clínicas procedentes de 8 hospitales. Consecuentemente el gen *bla*<sub>KPC-2</sub> fue detectado en 16 cepas, mientras que en la restante se identificó una variante nueva denominada *bla*<sub>KPC-24</sub>, recientemente descrita en una cepa de *Aeromonas veronii* aislada de aguas servidas (AS) de un emisario hospitalario en China (Yang et al., 2022).

En 2019 se informaron por primera vez las carbapenemasas NDM y OXA-48-like cuyos genes codificantes *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>OXA-370</sub> (variante de *bla*<sub>OXA-48-like</sub>) se encontraron en dos cepas de *K. pneumoniae* aisladas de hisopado rectal. La primera cepa llamada UCO358 (*bla*<sub>OXA-370</sub><sup>+</sup>), se identificó en un paciente con hospitalizaciones previas prolongadas proveniente de Brasil, mientras que la otra denominada UCO361 (*bla*<sub>NDM-1</sub><sup>+</sup>) se detectó en otro paciente sin historial de hospitalizaciones.

Seguidamente, análisis realizados de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y *Multilocus sequence typing* (MLST) de las cepas, comprobaron que se trataron de casos importados, estableciendo a UCO358 y UCO361 en los ST16 y ST1588, respectivamente. (Carrasco-Anabalón et al., 2019).

Por otra parte, Gaete et al., (2020); Costa et al., (2021) informaron la presencia de *bla*<sub>KPC-2</sub> y *bla*<sub>VIM-2</sub> en cepas de *P. aeruginosa* aisladas desde diferentes muestras clínicas entre los años 1998 y 2019. Al mismo tiempo Quezada-Aguiluz et al., (2020), describieron el hallazgo de una cepa de *Serratia marcescens* co-productora de KPC-2 y SRT-2, aislada de un cultivo de punta de catéter, de un paciente hospitalizado en Santiago durante el 2014. Posteriormente, Wozniak et al., (2021) detectaron por primera vez la carbapenemasa SPM-1 (*Sao Paulo metallo-β-lactamase*) en una cepa de *P. aeruginosa* aislada de cultivo rectal, de un paciente con antecedentes de una angioplastia realizada en Brasil entre 2004 y 2005.

A continuación Opazo-Capurro et al., (2022), encontraron una cepa de *P. aeruginosa* perteneciente al ST654, denominada P-469, co-productora de NDM-1 y VIM-80 (correspondiente a una variante nueva de la enzima VIM), aislada de lavado broncoalveolar de un paciente hospitalizado con neumonía en Temuco. Seguidamente Morales-León et al., (2023) comunicaron una cepa resistente a carbapenémicos e hipervirulenta de *K. pneumoniae* denominada K-2157, portadora de *bla*<sub>KPC-2</sub> y de varios genes involucrados en la síntesis de sideróforos y en la hiperproducción de capsula, perteneciente al serotipo capsular (SC) K1 y al ST23, la cual fue aislada el 2022 en el Hospital de Urgencia Asistencia Pública, Santiago, desde aspirado traqueal de un paciente con COVID-19. Finalmente, Gálvez-Silva et al., (2024) informaron una segunda cepa de la misma especie resistente a carbapenémicos e hipervirulenta, llamada VA585-22, portadora de *bla*<sub>KPC-2</sub> y *bla*<sub>VIM-1</sub>, y de genes codificantes de aerobactin (*iuc*) y salmochelin (*iro*) entre otros, perteneciente a los mismos SC y ST, la cual se obtuvo de aspirado traqueal de un paciente herido por arma de fuego, posterior a hospitalización prolongada en una UCI, con neumonía y ventilación mecánica durante el mismo año y ciudad.

### 1.8. Aguas servidas (AS)

De acuerdo con Vera et al., (2016), se le denomina aguas servidas (AS) en un sentido amplio, al producto de la mezcla de residuos líquidos domésticos, aguas de infiltraciones y precipitaciones, y residuos industriales líquidos (RILES). Por otra parte, los principales componentes de las AS son material flotante, material coloidal y disuelto, y material sedimentable. El material flotante está formado por grasas y aceites de origen tanto doméstico como industrial, así como también trozos de madera, plásticos, y trapos que son arrojados al alcantarillado. En el caso del material coloidal y disuelto, este está constituido por sólidos en suspensión correspondientes a partículas de pequeño tamaño, de naturaleza y procedencia variable, agentes patógenos (bacterias, hongos, protozoos, helmintos, y virus), y compuestos orgánicos e inorgánicos con requerimientos de oxígeno y nutrientes, fácilmente biodegradables con potencial para ocasionar eutrofización de masas de agua receptoras. Seguidamente, el material sedimentable está formado por arenas, gravas y partículas más o menos grandes de origen mineral u orgánico. Adicionalmente, existen otros contaminantes presentes como productos de cuidado personal (jabones, champús), productos de limpieza doméstica (lavalozas u otros), productos farmacéuticos, etc. (**Figura 12**) (Vidal & Araya, 2014). Por otro lado, las AS poseen 4 fuentes principales de generación denominadas de la siguiente manera; aguas servidas industriales (ASI), aguas servidas agrícolas o escorrentía agrícola (ASA), aguas servidas domesticas (ASD) y escorrentía de lluvia (ELL) (**Figura 13**) (Pratap et al., 2023).

Las ASI se originan de un amplio rango de industrias, como las textiles, las procesadoras de alimentos, las químicas (industria de pesticidas, industria farmacéutica, y petroquímica, por ejemplo), fabricantes de automóviles, minería, industria electrónica, e industria papelera, entre otras. Seguidamente, las ASA se originan de desechos ganaderos (cerdos, vacunos, aves de corral, por ejemplo), de acuicultura (pescados y mariscos), residuos de cultivos (fertilizantes, herbicidas y pesticidas), y de drenaje (efluentes de mataderos, granjas lecheras). (El Bakraoui et al., 2023).



**Figura 12. Componentes de las AS.**

Fuente: Obtenido de Vidal and Araya (2014).

Las ASD son las generadas de las actividades humanas cotidianas, es decir de una población, y que contienen todos los elementos que se les han incorporado a través de su utilización. Seguidamente, en función de la fuente de origen, las ASD se clasifican en dos tipos diferentes; aguas servidas negras (ASN), y aguas servidas grises (ASG). Las ASN a su vez, se dividen en dos subtipos: aguas servidas amarillas (ASA) y aguas servidas cafés (ASC). Las primeras están formadas únicamente por orina en agua de descarga. Mientras que las segundas están constituidas por materia fecal, residuos de papel higiénico, junto a otros residuos eliminados a través del agua de descarga de inodoro.





**Figura 13. Fuentes de generación de AS y sus características**

Fuente: Modificado de Pratap et al. (2023).

Por otra parte, las ASG se constituyen por drenaje de baño (incluyendo los originarios de ducha y de lavamanos, abundantes en restos de jabones, y champús, con excepción del de inodoro), drenaje de lavaplatos de cocina (cargados con restos de comida y lavalozas), y el drenaje de lavandería abundante en detergentes. (Ahmed et al., 2021; El Bakraoui et al., 2023).

Por el contrario, la ELL corresponde al agua de lluvias torrenciales, tormentas o inundaciones que no es absorbida por los suelos, y que por consiguiente fluye por encima de las calles o superficies abiertas.

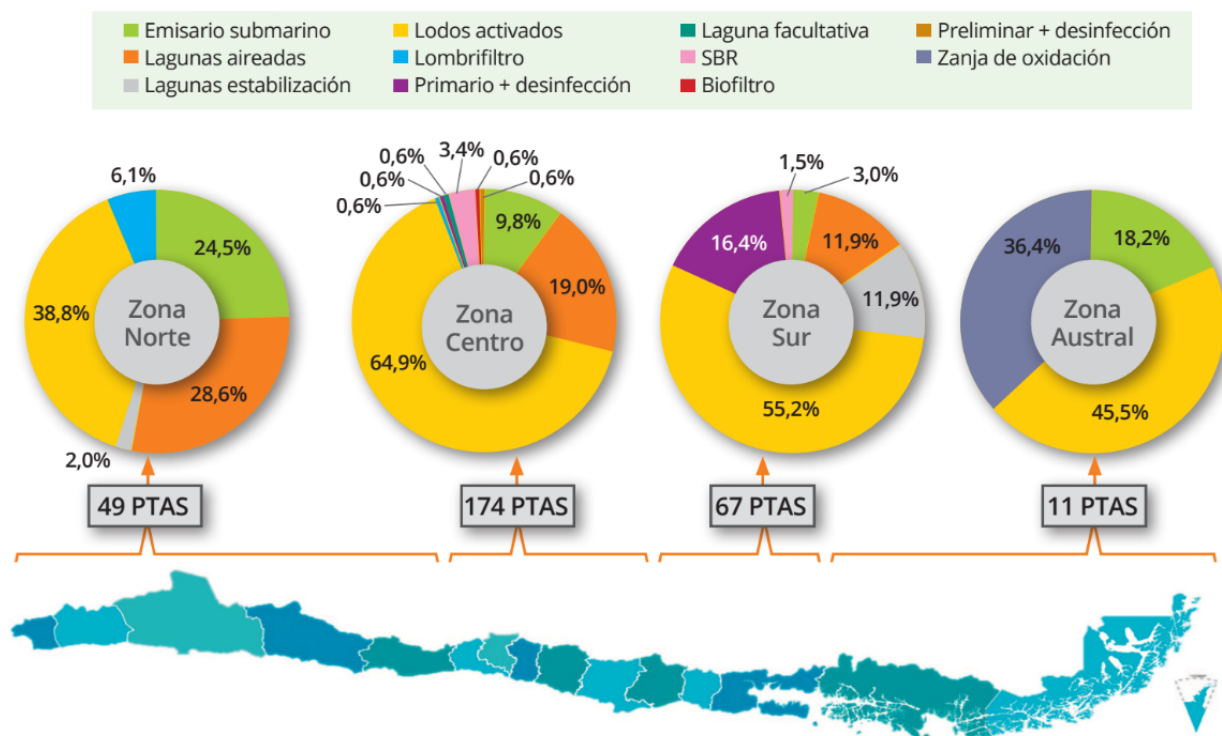
La importancia de la ELL radica en que esta arrastra consigo desde calles, industrias, construcciones y otros lugares, muchos contaminantes como plásticos, pesticidas, herbicidas, aceites, productos químicos, metales pesados y patógenos, los cuales acaban vertiéndose en masas de agua naturales cercanas, como estanques, ríos, arroyos y lagos, sin ningún tipo de tratamiento, perjudicando no solo a los organismos acuáticos, sino también a todo el medio ambiente (Ahmed et al., 2021).

En definitiva, las AS poseen diferentes orígenes, y una composición muy diversa incluyendo microorganismos, sólidos suspendidos, metales pesados, compuestos inorgánicos, y orgánicos como proteínas, grasas, carbohidratos, fenoles, pesticidas, detergentes y antibióticos, entre otros. Seguidamente, una vez formadas son vertidas a los sistemas de alcantarillado, para ser dirigidas hacia las plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS) (Excepto la ELL), en donde se denominan afluentes crudos (AC). (Willey et al., 2017).

## **1.9. Tratamiento de AS.**

### **1.9.1. Antecedentes.**

En nuestro país aproximadamente el 80% del agua potable producida se convierte en AS, las cuales son trasladadas por medio de sistemas de alcantarillado, para luego ser tratadas al interior de PTAS. En Chile se tiene registro de 301 PTAS operativas al año 2021 (**Figura 14**), siendo el sistema de lodos activados, la principal tecnología de tratamiento utilizada a lo largo del territorio nacional con una representación de un 57,8% respecto del total de sistemas, seguido por las tecnologías de lagunas aireadas y emisarios submarinos, con un 18,3% y 11,0%, respectivamente. Además, existen otras tecnologías no convencionales instaladas en algunas PTAS como lombrifiltros y biofiltros. Sin embargo, estas sólo representan un 1,3% y 0,3%, respectivamente del total (Matus et al., 2023)



**Figura 14. Distribución por zonas geográficas de las tecnologías de tratamiento de AS disponibles en Chile.**

**PTAS:** planta de tratamiento de aguas servidas, **SBR:** Reactores Biológicos Secuenciales.

Fuente: Obtenido de Matus et al. (2023).

### 1.9.2. Tratamiento preliminar.

En esta etapa se remueven sólidos gruesos, arena, aceites y grasas, por medio de procesos físicos de cribado, trituración, desarenado y sedimentación. En Chile, el 64% de las PTAS poseen un tratamiento preliminar, siendo el uso de rejillas el más común. Las plantas pequeñas emplean un solo tamiz y de limpieza manual, mientras que las más grandes incorporan dos, o hasta tres tamaños de tamices, en compañía de un sistema automático de extracción de los sólidos. Los tamices se conforman de barras metálicas estrechas, largas y muy próximas entre sí, que bloquean residuos sólidos flotantes voluminosos. Adicionalmente, algunas plantas incorporan un triturador para moler y desmenuzar los residuos que pasan a través de los tamices. Por otra parte, la arena es removida en un desarenador para evitar la abrasión de las tuberías de la planta. Mientras que los aceites y las grasas, que pueden obstruir las tuberías de la misma, son removidas mediante un desgrasador aparte, o bien directamente mediante un desarenador. Aunque sólo el 23% de las PTAS chilenas cuentan con desgrasadores. **(Figura 15)** (Baraño, 2005; Nathanson & Ambulkar, 2024).

### 1.9.3. Tratamiento primario.

El objetivo del tratamiento primario es la remoción de la materia orgánica suspendida. Para ello, las principales tecnologías empleadas son la sedimentación y la flotación. En Chile sólo un 11% de las PTAS incorporan tratamiento primario, de las cuales el 90% utiliza sedimentación. Sin embargo, a pesar del bajo porcentaje global, todas las plantas de gran tamaño incorporan esta etapa en su tratamiento. (Baraño, 2005).

Los sólidos que pasan a través de los tamices, desarenadores, así como también el material triturado de la etapa de pre-tratamiento, se eliminan de las AS en tanques de sedimentación (también llamados clarificadores primarios), los que proporcionan dos horas de tiempo de retención para que se produzca una sedimentación por gravedad. A medida que las AS fluyen a través de ellos, los sólidos se hunden gradualmente hasta el fondo. Los sólidos sedimentados conocidos como lodos primarios (LP) se desplazan por el fondo del tanque mediante rascadores mecánicos, para luego ser recogidos en una tolva donde son bombeados para su eliminación **(Figura 15)**. (Nathanson & Ambulkar, 2024).

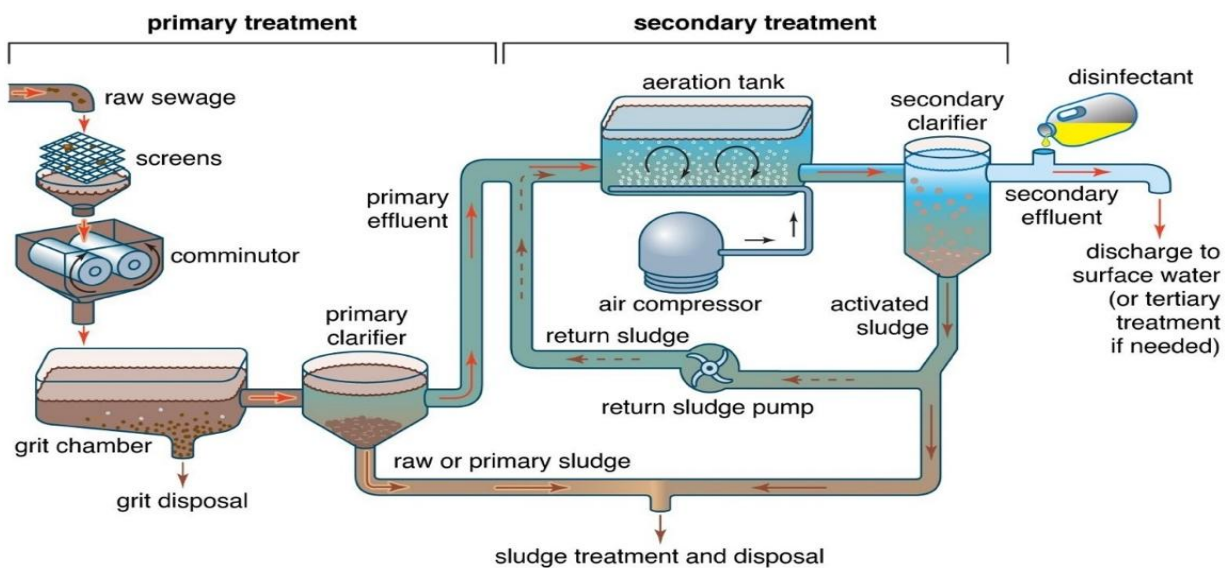
#### 1.9.4. Tratamiento secundario.

El objetivo del tratamiento secundario es la remoción de la materia orgánica disuelta remanente de la etapa anterior, mediante procesos biológicos en los que microorganismos consumen impurezas orgánicas como alimento, transformándolas en dióxido de carbono, agua y energía para su propio crecimiento y reproducción. Las principales tecnologías disponibles en nuestro país son las de lagunas, sistemas de medio fijo, lombrifiltros, emisarios submarinos, y lodos activados, donde esta última es la más empleada en Chile, siendo utilizada en el 61% de las PTAS en diferentes variaciones: lodos activados convencionales, aeración extendida, zanjas de oxidación y reactores *batch* secuenciales. Seguidamente, de dichas tecnologías de lodos, la más empleada es la aeración extendida (62%), seguido de los lodos activados convencionales (20%), zanjas oxidativas (10%) y reactores secuenciales *batch* (8%). (Baraño, 2005; Nathanson & Ambulkar, 2024).

El sistema de tratamiento de lodos activados se compone de un tanque de aireación en conjunto con un clarificador secundario. Las AS sedimentadas, mezcladas con lodos frescos que recirculan desde el clarificador secundario, se introducen en el tanque de aireación. Posteriormente se inyecta aire comprimido en la mezcla a través de difusores porosos en el fondo del tanque. De tal manera que el aire difundido proporciona oxígeno y una rápida acción de mezcla. También puede añadirse aire mediante agitación con mezcladores mecánicos en forma de hélice situados en la superficie del tanque. En dichas condiciones prosperan microorganismos, creando una suspensión activa de sólidos biológicos constituida principalmente por bacterias llamada lodos activados. En el tanque de aireación se dejan unas seis horas, para que los microorganismos tengan tiempo suficiente para absorber el material orgánico disuelto en las AS. Posteriormente, la mezcla pasa al clarificador secundario, donde los lodos activados se sedimentan por gravedad. Seguidamente, el agua limpia se retira de la superficie del clarificador, y se vierte como EF secundario. Los lodos se bombean desde una tolva situada en el fondo del tanque, mientras que aproximadamente el 30% de estos se recirculan de vuelta al tanque de aireación, donde se mezclan con el EF primario. Por el contrario, El 70% restante debe tratarse y eliminarse (**Figuras 15 y 16**). (Nathanson & Ambulkar, 2024).

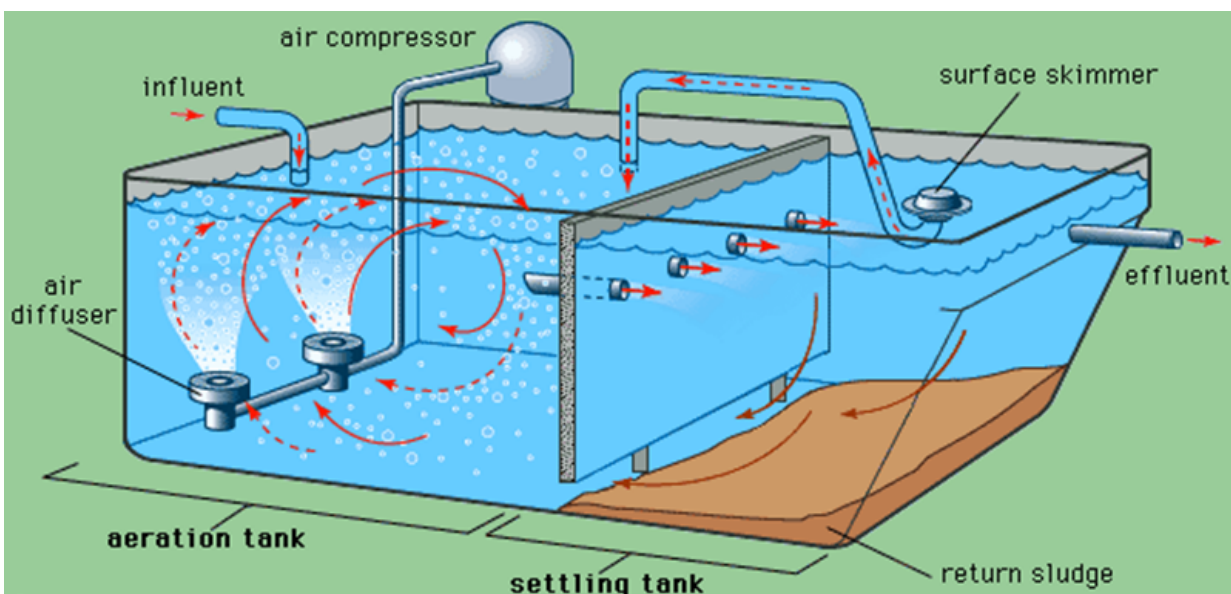
### 1.9.5. Desinfección.

Antes de ser volcadas en ecosistemas superficiales y/o a infiltración, los EF generados son desinfectados para reducir las concentraciones de materia orgánica y de patógenos. Por otra parte, el 90% de las PTAS poseen una etapa de desinfección. Mientras que los métodos empleados corresponden a los de cloración (76% del total), y radiación ultra violeta (UV) (24% del total). Seguidamente, la mayoría de las PTAS utiliza cloración en base a hipoclorito (62%), en especial en aquellas que atienden a poblaciones menores de 40.000 habitantes. Mientras que el 38% restante utiliza gas cloro, sobre todo las que atienden a poblaciones mayores de 40.000 habitantes. Así también, de aquellas plantas que utilizan cloración, el 26% incluye un proceso de decloración, correspondiente a la remoción de cloro residual antes de descargar el EF final al medio ambiente, para reducir la toxicidad a los peces y a otros organismos acuáticos. Por el contrario, la tecnología UV se utiliza principalmente en plantas que atienden a poblaciones menores a 35.000 habitantes, y sólo en aquellas que emplean sistemas de lodos activados o lombrifiltros. (Figura 15). (Barañaño, 2005).



**Figura 15. Tratamiento de AS empleando sistema de lodos activados.**

Fuente: Obtenido de Nathanson and Ambulkar (2024).



**Figura 16. Representación de sistema de lodos activados.**

Fuente: Obtenido de Nathanson and Ambulkar (2024).

#### **1.9.6. Digestión y eliminación de lodos.**

Los lodos acumulados a través del tratamiento de AS se clasifican en primarios (LD-P) y secundarios (LD-S). Los primarios se producen a partir de las etapas de precipitación química y sedimentación. Mientras que los secundarios constituyen la biomasa residual generada de los sistemas de lodos activados. Así pues, antes de su eliminación, los lodos son digeridos para reducir la masa total de sólidos, destruir patógenos, y facilitar la deshidratación de estos. La mayoría de las PTAS utilizan un sistema de digestión en dos etapas, en la cual la materia orgánica es metabolizada por bacterias anaeróbicamente. En la primera etapa, los lodos son espesados hasta alcanzar un contenido de sólidos secos (SD) de aproximadamente 5%. Para ello, se calientan y mezclan en un tanque cerrado durante varios días. Aquí, bacterias formadoras de ácido hidrolizan proteínas y lípidos, produciendo moléculas más pequeñas solubles en agua, las que luego fermentan en varios ácidos grasos. Consecuentemente, los lodos fluyen hasta un segundo tanque, donde otras bacterias convierten la materia disuelta en biogás,  $\text{CO}_2$  y metano.

Este último se utiliza para calentar el primer tanque de digestión, mientras que el remanente se emplea para proveer electricidad a la PTAS, o bien es incinerado sin otro proceso de por medio.

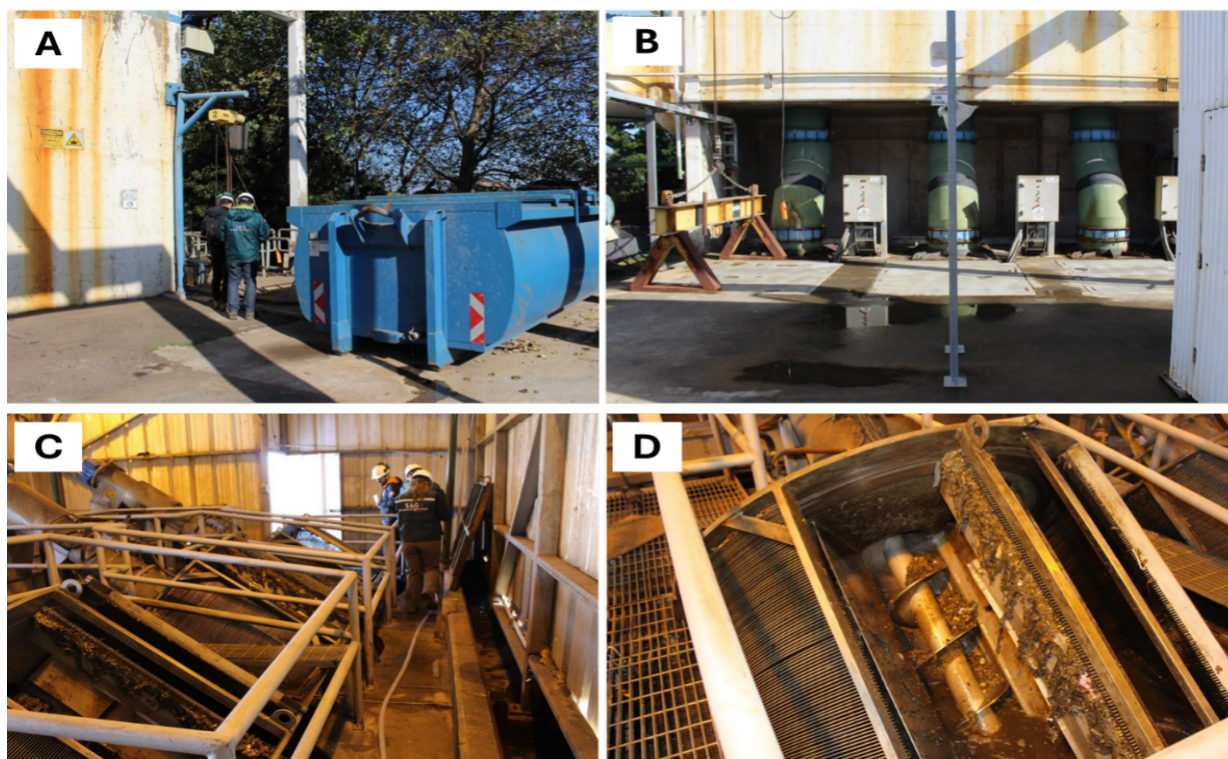
Por otra parte, los lodos deshidratados pueden enterrarse en un vertedero sanitario, o diseminarse sobre superficies agrícolas para aprovechar su acción acondicionadora de suelo y fertilizante. Sin embargo, no se esparcen sobre terrenos de cultivo de productos para consumo humano. Mientras que cuando no pueden disponerse en un lugar adecuado para su eliminación, pueden incinerarse reduciéndolos a cenizas. (Nathanson & Ambulkar, 2024).

#### **1.10. PTAS del Gran Concepción.**

El Gran Concepción ubicado en la región del Bío Bío, corresponde a un consorcio de 10 comunas de la Provincia de Concepción, entre las que se incluyen Concepción, Coronel, Chiguayante, Hualpén, Hualqui, Lota, Penco, San Pedro de la Paz, Talcahuano y Tomé. (<http://sochil.udec.cl/index.php/2019/03/19/conoce-concepcion/>). Por otro lado, dicho consorcio se caracteriza por poseer una superficie de 222 km<sup>2</sup>, una población total de 971.285 habitantes y una densidad poblacional de 4.383 habitantes/km<sup>2</sup> (<https://corporacionciudades.cl/wp-content/uploads/2019/04/ATLAS-CONCEPCION.pdf>)

La PTAS del Gran Concepción se encarga del tratamiento de AS de las comunas de Concepción, Talcahuano, Hualpén y Chiguayante (<http://www.siss.gob.cl/586/w3-article-5139.html>). El proceso inicia con un pre-tratamiento (*screening*) que se lleva a cabo primeramente en un pozo de AF, en el cual se remueve la arena presente en el AF crudo (AF-C), mediante el uso de una tenaza metálica (**Figura 17A**). Luego el AF-C es conducido a una cámara de rejas, donde se retiran sólidos macroscópicos. Posteriormente el AF-C es elevado a través de una planta elevadora de aguas servidas (PEAS) hacia un sistema de rejas finas (**Figura 17B**). En dicho sistema el AF-C pasa a través de tamices rotatorios, quedando el material sólido depositado al fondo de estos. Dichos sólidos son retirados por medio de un sistema de tornillo sinfín, generándose el AF pre-tratado (AF-PT) (**Figuras 17C y 17D**) (SMA, 2019; SSS, 2019).



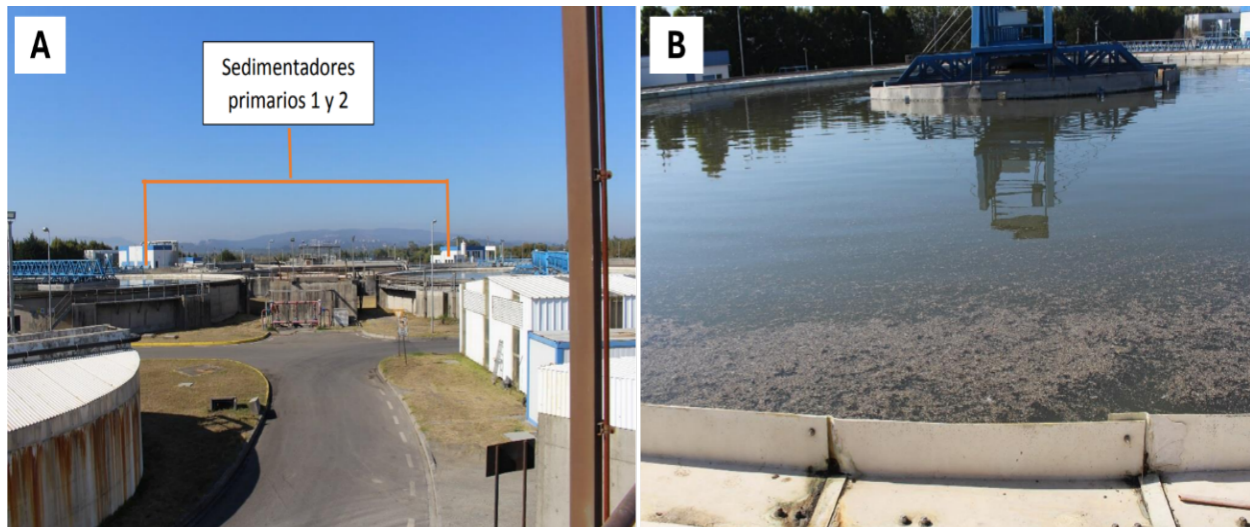


**Figura 17. Pre-tratamiento de AS.**

**A:** Pozo de AF. **B:** Planta elevadora de AS. **C:** tamices rotatorios en sistema de rejillas finas en funcionamiento. **D:** acercamiento de la imagen C.

Fuente: Obtenido de SMA (2019).

Luego viene una etapa de tratamiento primario, en el que el AF-PT ingresa al interior de tanques de sedimentación, denominados clarificador primario 1 y 2 (**Figura 18**), en los que se incorporan agentes coagulantes (cloruro/sulfato férrico o sulfato de aluminio) que permiten la concentración de materia sólida orgánica e inorgánica disuelta en agregados llamados *flocs* (flóculos). Luego se añaden agentes floculantes (polímeros de acrilamida) que permiten la precipitación del conjunto de *flocs*, separándose del material líquido generándose un EF y un lodo (LD) primarios (EF-P y LD-P) (Oyarzo, 2007; SMA, 2019; SSS, 2019).



**Figura 18. Tratamiento primario de AS.**

**A:** sedimentadores primarios 1 y 2. **B:** superficie de sedimentador primario 1.

Fuente: Obtenido de SMA (2019).

Posteriormente, el EF-P prosigue a un tratamiento secundario, en el que se elimina la materia orgánica remanente disuelta, mediante reacciones de degradación oxidativa, llevadas a cabo por microorganismos en un sistema de lodos activados. Para ello dicho EF se envía a tres unidades llamadas cámaras de distribución secundaria (tanques de aireación) (**Figura 19**), donde se mezcla con lodos de recirculación provenientes de tres clarificadores secundarios, generándose un LD y un EF secundarios (LD-S y EF-S). (SMA, 2019; SSS, 2019). Luego, ocurre una etapa de desinfección, en la cual el EF-S se envía a un sector denominado cámaras de contacto (**Figura 20**), que corresponden a unidades de tipo canal, donde el agua transita a menor velocidad y se adiciona hipoclorito de sodio gaseoso (6 ppm), con un tiempo de exposición aproximado de 30 minutos para destruir la vida microbiana, generándose un EF final (EF-F), el cual se vierte a masas de agua receptoras, contribuyendo a la mantención del ciclo urbano de ésta (SMA, 2019; SSS, 2019).



**Figura 19. Tratamiento secundario de AS.**

En la imagen se observa cámara de distribución secundaria (tanque de aireación).

Fuente: Obtenido de SMA (2019).

Los lodos producidos durante el proceso, compuestos principalmente de materia orgánica insoluble, son reunidos en un digestor anaerobio (**Figura 21**), donde permanecen durante 30 días a 35°C, siendo agitados con un sistema de lanza, en donde se producen reacciones catabólicas por parte de bacterias y arqueas metanógenas, generándose CO<sub>2</sub>, gas metano y lodos digeridos (LD-D). Estos últimos son transportados a estanques de acumulación, y luego transferidos a un sector de prensado de lodos (**Figura 22**). En dicho sector, los lodos son deshidratados por medio de tres prensas de banda, donde se agrega polímero hasta alcanzar una humedad del 80%.





**Figura 20. Desinfección de AS tratadas.**

En la imagen se observa sector de cámaras de contacto para cloración.

Fuente: Obtenido de SMA (2019).

Seguidamente son cargados en un camión, transportados y depositados en un sector de canchas de secado de lodos (**Figura 23**), donde uno corresponde a un galpón de estructura cerrada, y otro a una losa de hormigón al descubierto (esta solo se emplea entre los meses de diciembre a marzo), poseyendo ambas una canaleta de contención de líquidos. Los lodos secos generados son finalmente dispuestos en un predio de la Región del Bío Bío, mientras que el gas metano generado es incinerado mediante una antorcha (Willey et al., 2017; Tortora et al., 2019; SMA, 2019; SSS, 2019; Madigan et al., 2021)



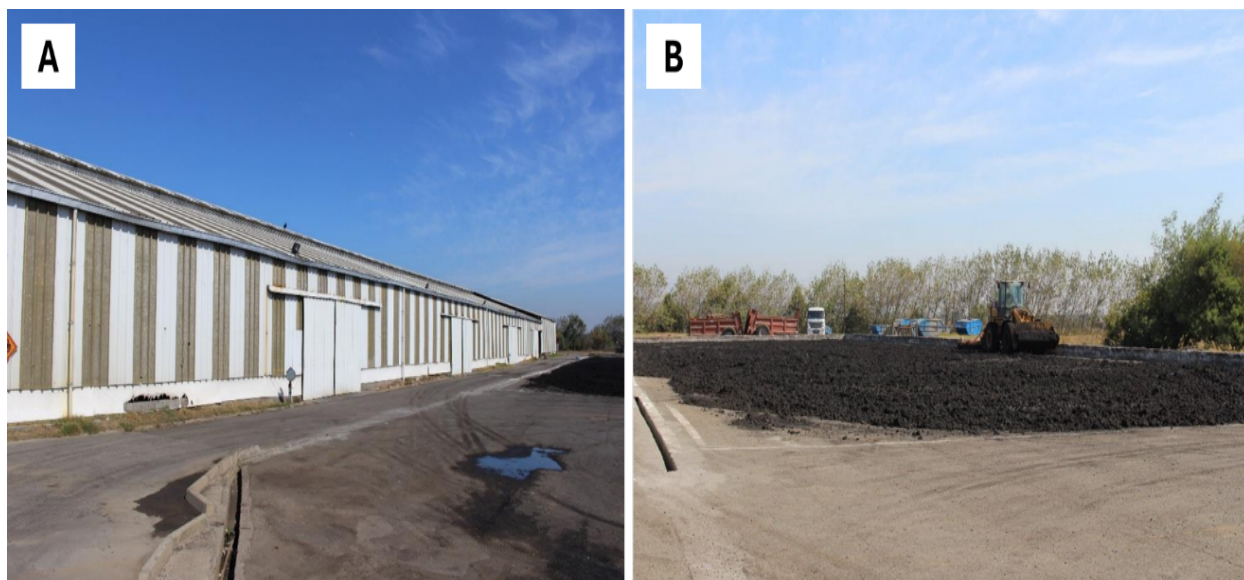
**Figura 21. Digestor anaerobio para tratamiento de lodos.**

Fuente: Obtenido de SMA (2019).



**Figura 22. Prensa de banda para deshidratación de lodos digeridos**

Fuente: Obtenido de SMA (2019).



**Figura 23. Canchas para secado de lodos.**

**A:** galpón cerrado. **B:** losa de hormigón al descubierto.

Fuente: Obtenido de SMA (2019).

### **1.11. Grupos bacterianos, antibióticos (ATBs) y genes de resistencia antibiótica (GRAs) en AS.**

Las bacterias más frecuentes encontradas en AS pertenecen a los phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, y *Cloroflexi*, mientras que los órdenes prevalentes son *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Burkholderiales* y *Enterobacterales* (An et al., 2018; Nguyen et al., 2021). Por otra parte, los miembros del phylum *Firmicutes*, y de la clase *Gammaproteobacteria* son los más importantes, puesto que en estos taxa se ubican las especies más frecuentes que transportan GRAs adquiridos, como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, por ejemplo (Berendonk et al., 2015). Por otra parte, los antibióticos detectados con más frecuencia en AS son macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, sulfonamidas y trimetoprim, mientras que con menor frecuencia se detectan  $\beta$ -lactámicos y aminoglucósidos (Kim & Aga, 2007; Zhang & Li, 2011; Liu et al., 2019; Pazda et al., 2019; Abramova et al., 2020; Nguyen et al., 2021).

La presencia de GRAs en AS varía ampliamente. Es así como Manaia et al., (2016) describieron la presencia de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *mecA* (confiere resistencia a meticilina), *sul1* y *sul2* (confieren resistencia a sulfonamidas), *tetA*, *tetC*, *tetG*, *tetM*, *tetQ*, *tetW* y *tetX* (confieren resistencia a tetraciclinas) y *qnrA*, *qnrB*, y *qnrS* (confieren susceptibilidad disminuida a fluoroquinolonas y resistencia a ácido nalidíxico).

Posteriormente, Pazda et al., (2019) expusieron una amplia lista de genes, entre los que destacan; *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *qnrA*, *qnrB* y *qnrS*, *sul1*, *sul2* y *sul3*, *dfr* (confiere resistencia a trimetoprim), *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetG*, *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *tetR*, *tetW* y *tetX*, *erm* (confiere resistencia a macrólidos, lincosamidas, y estreptogramina B), y *mef* (confiere resistencia a macrólidos). Al mismo tiempo, Yin et al., (2019) describieron la presencia de genes *sul4*, *mcr-1* (confiere resistencia plasmídica a colistina), *mecA*, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>IMI-1</sub>, *bla*<sub>SME-1</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>, y *bla*<sub>VIM-1</sub>. Mientras que Osińska et al., (2020) detectaron genes *intl1* (gen de integrasa clase 1), *sul1*, *tetM*, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> y *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> y *bla*<sub>CTX-M-32</sub> (ambas variantes de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>), *bla*<sub>KPC-3</sub>, y *mcr-1*. Por lo tanto, en resumen, los genes que se detectan con mayor frecuencia en AS codifican para resistencia a  $\beta$ -lactámicos, quinolonas, macrólidos, y tetraciclinas. (Uluseker et al., 2021; Miłobedzka et al., 2022).

Por otra parte, el tratamiento de AS permite la eliminación de grandes cantidades de contaminantes de diversos tipos, generando un EF-F aparentemente libre de estos. Sin embargo, pese a todas las etapas de tratamiento llevadas a cabo en las PTAS, éstas no están diseñadas específicamente para remover GRAs ni tampoco ATBs. En este sentido, variados autores han informado la detección de trazas de ATBs en EF-F, cuyas concentraciones aun siendo subinhibitorias, pueden ejercer presiones selectivas para la selección de cepas resistentes desde el ambiente. Mientras que la presencia de especies resistentes sobrevivientes a la etapa de desinfección en el EF-F, posibilitan la THG hacia especies ambientales susceptibles, volviéndolas resistentes. (Silva et al., 2006; Ojer-Usoz et al., 2014; Xu et al., 2015; Liu et al., 2018; Liu et al., 2019; Smyth et al., 2020

Cabe mencionar también que Liu et al., (2018); Jin et al., (2020) encontraron que el proceso de desinfección por cloración, el cual es uno de los más comúnmente empleados, facilita la THG por transformación hacia cepas susceptibles. Por otro lado Xu et al., (2015); Liu et al., (2019) hallaron que en la etapa de tratamiento secundario, existe una gran carga microbiana, lo que sumado a la presencia de restos de ATBs facilitaría igualmente eventos de THG.

#### **1.12. Métodos de estudio de la RA en AS.**

No hay métodos ni protocolos establecidos por parte de instituciones referentes como el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) o el *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). No obstante, los trabajos de Berendonk et al., (2015); Manaia et al., (2018); Nguyen et al., (2021) plantean que el estudio de la RA en AS debe basarse en la detección de BRA y/o GRAs con capacidad de transferencia hacia bacterias patógenas o comensales humanas, y en la detección de estresores, como concentraciones subinhibitorias de antibióticos, u otros compuestos capaces de favorecer la emergencia y selección de BRA.

Además, Berendonk et al., (2015); Manaia et al., (2018); Tiwari et al., (2024) proponen la determinación de algunas especies bacterianas resistentes a antibacterianos y GRAs, como marcadores para la evaluación de la RA en AS. Entre las especies propuestas se encuentran: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *Aeromonas* spp., *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y *Enterococcus* spp., Mientras que entre los GRAs están *int1* (gen de integrasa clase 1), *sul1* y *sul2*, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *qnrS*, *aac*-(6')-Ib-cr (confieren resistencia plasmídica a quinolonas), *vanA* (confiere resistencia a vancomicina), *mecA*, *ermB*, *ermF*, *tetM* y *aph* (confiere resistencia a aminoglucósidos).

Los métodos para estudiar RA en AS pueden clasificarse en dependientes, e independientes de cultivo.



Los primeros se basan en el aislamiento de las cepas bacterianas en agares especializados, con y/o sin suplementos de agentes diferenciales, o selectivos, para permitir el crecimiento de grupos específicos de bacterias, o para diferenciar distintas poblaciones de éstas. Estos métodos permiten obtener recuento de bacterias viables, identificación de especies de importancia clínica, caracterización fenotípica de cepas, incluyendo la determinación de perfiles de susceptibilidad a antibióticos, y detección fenotípica de mecanismos de resistencia. También posibilitan la detección molecular de GRAs, de elementos genéticos móviles (EGMs), y la evaluación de la capacidad de THG entre cepas. Estos métodos en general son más económicos, y no requieren de un entrenamiento demasiado exhaustivo para su implementación. Sin embargo, son de lenta ejecución, y no permiten la representación de toda la comunidad bacteriana en una muestra, debido a la presencia de especies no cultivables, que corresponde a la mayoría de las bacterias en ambientes naturales (Berendonk et al., 2015; Manaia et al., 2018).

Los métodos independientes de cultivo se basan en el análisis directo del ADN contenido en una determinada muestra, dentro de los cuales se encuentran; la amplificación por PCR en tiempo real (qPCR), y la metagenómica. El primero consiste en una extracción de ADN, seguido de la amplificación de un gen determinado empleando partidores específicos, y sondas fluorescentes. A continuación, la fluorescencia producida es directamente proporcional a los amplicones obtenidos. Esta técnica permite; la cuantificación de GRAs ya sea de forma absoluta o relativa, el análisis simultáneo de varios GRAs, y también la ejecución de estudios por separado de ADN intracelular (iADN), y extracelular (eADN), lo que propicia diferenciar entre GRAs intracelulares, (portados por una bacteria), de los extracelulares encontrados de forma libre en una determinada muestra. Esta tecnología es muy sensible y específica, No obstante, factores como la calidad del ADN extraído, pueden influir en el rendimiento de la posterior reacción de amplificación. Mientras que la presencia de inhibidores o interferentes en muestras complejas, también pueden impactar en la precisión de la cuantificación. Por otra parte, el diseño de partidores suficientemente específicos puede ser desafiante, sobre todo para usuarios con poca experiencia con esta técnica. (Dymond, 2013; Thermo-Fisher-Scientific, 2014; Manaia et al., 2018).

En la metagenómica, se lleva a cabo una extracción y purificación de ADN a partir de una muestra. Seguidamente el ADN es fragmentado y amplificado por PCR, generándose un conjunto de fragmentos de ADN llamado biblioteca genómica. Luego esta última es secuenciada, produciéndose grandes cantidades de secuencias de lectura cortas, las que son ensambladas, y anotadas, mediante programas informáticos especializados. Esta técnica permite el estudio del repertorio genético global de toda la población microbiana presente en una muestra, lo que posibilita la identificación de la mayoría de los organismos, así como de todos sus genes. Por ende, también permite el estudio del resistoma, y del moviloma bacterianos. Adicionalmente, posibilita el hallazgo de nuevos GRAs, permitiendo el enriquecimiento de las bases de datos con esta información. No obstante, la cantidad de muestra, y la calidad del ADN extraído pueden afectar los resultados finales. Por otro lado, se requiere de equipamiento altamente sofisticado, y una alta experticia en bioinformática para la interpretación de los resultados. Además, este método no permite inferir acerca de los fenotipos de resistencia de la o las especies en estudio (Zhang et al., 2016; Manaia et al., 2018; Madigan et al., 2021).

En los últimos años se han sumado otras dos técnicas para el estudio de RA en AS. Estas son la epicPCR (ePCR) (*emulsion, paired isolation, and concatenation PCR*), y la digitalPCR (dPCR). La primera corresponde a una PCR de fusión, que permite vincular una secuencia de interés a un fragmento del gen *ARNr16S*. En esta técnica se aíslan células individuales y se encapsulan en perlas de poliacrilamida, dentro de las cuales se llevan a cabo reacciones de PCR para fusionar un GRA diana con el gen *ARNr16S*. Como resultado, la PCR amplifica la señal del GRA y su *ARNr16S* huésped asociado a partir del metagenoma de la muestra. Esto permite llevar a cabo asignación taxonómica de las bacterias portadoras del GRA diana, y al emplearse acoplado a metagenómica, maximiza la sensibilidad y especificidad en la detección de GRAs (Roman et al., 2021; Lou et al., 2024).

La dPCR es una técnica para cuantificación absoluta de ácidos nucleicos diana (como GRAs por ejemplo u otros), basada en la distribución de analitos molde en muchos micro-reactores replicados a dilución límite, con la mayoría de las reacciones conteniendo una o cero moléculas. La dPCR comienza con la extracción de ADN. Luego la reacción ensamblada se particiona en grandes sub-reacciones de PCR independientes. La amplificación se realiza hasta el punto final y la cuantificación absoluta de las moléculas blanco se calcula siguiendo el análisis estadístico de distribución de Poisson. A diferencia de la qPCR, la dPCR sobrepasa en sensibilidad y precisión a la primera, y además no requiere de estándares de referencia, ni controles endógenos, ni curvas de calibración. (Cao et al., 2020; Maestre-Carballa et al., 2024).

### **1.13. RA en AS en Chile.**

Si bien existen variados trabajos en la literatura, dedicados a la RA en AS, la gran mayoría son internacionales, sobre todo europeos y asiáticos, de manera que existe una carencia de información respecto de otras regiones como en América Latina, incluyendo nuestro país, en el cual sólo se existen unos pocos estudios.

Silva et al., (2005) informaron 63 cepas de *Enterococcus* spp., aislados desde AS del colector del Hospital de Antofagasta, y de las PTAS Cascal Norte y Cascal Sur, los cuales mediante CMI por dilución en agar, resultaron altamente resistentes a gentamicina (GEN) y estreptomicina (STR), moderadamente resistentes a la ampicilina (AMP), cloranfenicol (CHL), tetraciclina (TCY), y ciprofloxacino (CIP), y con una susceptibilidad intermedia a vancomicina (VAN). Seguidamente, Silva et al., (2006) comunicaron coliformes fecales, aislados desde muestras de AF y EF de una PTAS de Antofagasta recolectadas durante cuatro periodos de tiempo. Los recuentos bacterianos obtenidos mostraron una elevada proporción de coliformes resistentes a antibióticos en las muestras de EF. Mientras que dichas bacterias fueron eliminadas en diferentes proporciones por acción de tratamiento de AS. Es así como *E. coli* disminuyó, mientras que la proporción de *Klebsiella* spp. se incrementó.

Por otro lado, el porcentaje de aislados multirresistentes aumentó al final del tratamiento. Finalmente, del total de 248 coliformes aislados, las mayores frecuencias de resistencia fueron a AMP, seguido de TCY, y sulfametoxazol-trimetoprim (SXT). Mientras que las más bajas fueron a kanamicina (KAN) y ácido nalidíxico (NAL).

Posteriormente, Bueno et al., (2020), trabajando con qPCR, informaron un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de 17 GRAs (*aacA*, *aadA5*, *bla<sub>NPS</sub>*, *bla<sub>OXA</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *dfr13*, *ermF*, *qacG*, *qnrS*, *strB*, *sul1*, *sul2*, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(Q)*, *tet(W)*, *tet(X)*) (de un total de 24 cuantificados) en muestras de sedimento marino, obtenidos desde masas de agua receptoras de EF de tres PTAS en la región de los Ríos. Además, en esa misma investigación se informó una alta abundancia de genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, y *bla<sub>SHV</sub>* en 160 muestras de deposición de aves silvestres circundantes a una de las PTAS. Así, como una mayor abundancia de *bla<sub>SHV</sub>* en especies de aves migratorias en contraste con especies residentes ( $p < 0,05$ ). Finalmente, Leiva et al., (2024) comunicaron una reducción de entre 2 - 4 unidades logarítmicas de carga de BRA mediante método de dilución en agar (correspondientes a bacterias resistentes a ceftriaxona (CRO), a amoxicilina (AMX) y a CIP), y de GRAs mediante qPCR (*bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-32</sub>* (variante de *bla<sub>CTX-M-1-like</sub>*), *qnrS*, *tetM*, y *sul1*) en EF de 20 PTAS rurales en la Región del Bío Bío, durante 2 campañas de muestreos. Leiva et al., (2024) además informaron disminuciones de entre 2 - 4 unidades logarítmicas, de los genes *ARNr 16S* e *int11* en las mismas muestras de EF de las 20 PTAS citadas

#### **1.14. Hipótesis y Objetivos.**

En base la revisión bibliográfica presentada anteriormente, al contrario de lo que ocurre a nivel internacional, en nuestro país existe escasa información sobre RA en AS, y más aún acerca de los efectos de los tratamientos de AS efectuados por las PTAS en Chile sobre las cargas de BRAs y de GRAs. Razón por la cual se eligió a la PTAS del Gran Concepción, como modelo de estudio para aportar con más información nacional respecto de esta importante problemática. Así también, considerando a los *Enterobacterales* resistentes a C3G y/o carbapenémicos, y a las BLEE y carbapenemasas como grupos bacterianos y mecanismos de resistencia respectivamente de prioridad crítica, se propuso la siguiente **hipótesis**:

***El tratamiento de las aguas servidas del Gran Concepción disminuye significativamente la carga de Enterobacterales resistentes a C3G y/o carbapenémicos, así como la carga de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas***

Del mismo modo se planteó adicionalmente la siguiente **hipótesis nula**:

***El tratamiento de las aguas servidas del Gran Concepción no tiene un efecto significativo en la carga de Enterobacterales resistentes a C3G y/o carbapenémicos, ni en la carga de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas***

Para evaluar dicha hipótesis se estableció el siguiente **objetivo general**:

**Evaluar diferencias en las cargas de *Enterobacterales* resistentes a C3G y/o carbapenémicos y en la carga de genes que codifican BLEE y/o carbapenemasas, por acción del tratamiento de las AS del Gran Concepción**

Los objetivos específicos fueron:

1. Determinar la carga de *Enterobacterales* resistentes a C3G y/o carbapenémicos, en muestras de AS del Gran Concepción.
2. Identificar las principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas de *Enterobacterales* resistentes a C3G y/o carbapenémicos.
3. Determinar la presencia o ausencia de genes codificantes BLEE y/o carbapenemasas, en muestras de AS del Gran Concepción.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Muestras de aguas servidas (AS).

#### 2.1.1. Obtención y almacenamiento de muestras.

Durante los meses de enero, abril y julio de 2022, se obtuvieron desde la planta de tratamiento de aguas servidas del Gran Concepción 8 muestras colectadas durante 24 h en contenedores plásticos esterilizados. De éstas, 4 correspondieron a muestras de afluente (AF) y 4 a muestras de efluente (EF). El volumen de cada una de las muestras fue de 1 L para las muestras de AF y de 2 L para el EF. La fecha y hora de obtención de las muestras se presenta en la **Tabla 2**. Además, en el **ANEXO 1** se detallan las características fisicoquímicas de cada una de las muestras.

Todas las muestras fueron suministradas por la Empresa ESSBIO, y se trasladaron al Laboratorio de Investigación en Agentes Antibacterianos (LIAA), de la Facultad de Ciencias Biológicas, en la Universidad de Concepción, para ser refrigeradas a 2 - 8°C, y luego ser procesadas antes de 24 h de su recolección.

**Tabla 2.** Fechas y horas de obtención de las muestras de AS.

| N° de muestreo | Tipo de muestra | Fecha inicio | Fecha termino | Hora inicio | Hora termino |
|----------------|-----------------|--------------|---------------|-------------|--------------|
| 1              | AF              | 10/01/2022   | 11/01/2022    | 10:30       | 09:30        |
|                | EF              | 10/01/2022   | 11/01/2022    | 10:10       | 09:10        |
| 2              | AF              | 17/01/2022   | 18/01/2022    | 11:05       | 10:05        |
|                | EF              | 17/01/2022   | 18/01/2022    | 10:00       | 11:00        |
| 3              | AF              | 19/04/2022   | 20/04/2022    | 11:05       | 10:05        |
|                | EF              | 19/04/2022   | 20/04/2022    | 10:05       | 09:05        |
| 4              | AF              | 18/07/2022   | 19/07/2022    | 11:25       | 10:25        |
|                | EF              | 18/07/2022   | 19/07/2022    | 10:35       | 09:35        |

**AF:** afluente, **EF:** efluente.

Fuente: ESSBIO, comunicación personal 2022.

### **2.1.2. Procesamiento de muestras para aislamiento bacteriano.**

Para el aislamiento bacteriano partir de las muestras de EF se procedió a filtrar 500 ml de cada una de las muestras, recolectadas durante el mes de enero, mediante filtros *Whatman*® de 0,45 µm empleando el equipo *Oil-Free Vacuum Pump Rocker 300* (Rocker Scientific). Para las muestras de EF obtenidas en los meses de abril y julio, se filtraron 1.000 ml en las mismas condiciones descritas anteriormente.

A continuación, todos los filtrados obtenidos se procedieron a filtrar nuevamente en filtros *Millipore*™ de 0,22 µm. Posteriormente, cada uno de los filtros fueron introducidos en tubos *Falcon*™ de 50 ml (un tubo para cada EF distinto), a los que se les incorporó 5 ml de agua destilada estéril. Finalmente, los tubos *Falcon*™ se sometieron a agitación en agitadores tipo vórtex durante 10 min, y se conservaron en refrigeración a 4 - 8°C hasta el momento de su utilización.

En el caso de las muestras de AF, el aislamiento bacteriano se realizó directamente desde las muestras obtenidas de la planta de tratamiento.

### **2.2. Recuento bacteriano aeróbico.**

En las muestras de AF y EF, el recuento de bacterias viables se realizó mediante el método de diseminación en superficie en agar (Cappuccino & Welsh, 2018). Para esto, a partir de los filtrados obtenidos anteriormente desde las muestras de EF, se realizaron diluciones seriadas en agua destilada estéril. Seguidamente, alícuotas de 0,1 ml de muestra sin diluir y de cada una de las diluciones fueron sembradas en placas de agar R<sub>2</sub>A, MacConkey (MCC), MacConkey suplementadas con CRO (4 µg/ml) (MCC+C), y MacConkey suplementadas con MEM (2 µg/ml) (MCC+M). Por otra parte, para las muestras de AF se procedió de la misma forma, pero directamente sin filtrar. Todas las placas se incubaron en aerobiosis a 35°C por 18-24 h.

La mayor parte de los recuentos, se obtuvieron de tres replicas en los medios correspondientes, salvo algunos obtenidos de menos de tres, durante el primer muestreo de enero, lo cual fue debido a un insuficiente número de placas disponibles, debido a un error procedimental en su preparación.



Una vez finalizado el periodo de incubación, se seleccionaron aquellas placas en las que se desarrollaron entre 30 a 300 colonias (Silva et al., 2006; Moges et al., 2014; Cappuccino & Welsch, 2018) para realizar los recuentos bacterianos y expresarlos en unidades formadoras de colonia por unidad de volumen (UFC/ml).

Para evaluar los recuentos bacterianos, se construyó una matriz de datos (**ANEXO 8**) en el software GraphPad Prism v10.3.0 (<https://www.graphpad.com/>), para luego aplicar las pruebas ANOVA de dos vías, seguido de comparaciones múltiples de Turkey.

### **2.3. Selección y almacenamiento de colonias bacterianas.**

A partir de las placas de recuento bacteriano se seleccionaron entre 3 a 5 colonias por cada morfotipo predominante. Las colonias seleccionadas se sembraron en placas de agar Tripticasa de Soya (ATS) las que se incubaron en aerobiosis a 35°C por 18-24 h. Posteriormente, desde las colonias bacterianas crecidas en las placas se procedió a confeccionar el cepario (repositorio). Para ello las colonias bacterianas fueron sembradas en tubos con 4 ml de caldo Tripticasa de Soya (CTS) e incubados en aerobiosis a 35°C por 18-24 h. Con los cultivos líquidos se prepararon suspensiones con glicerol (50% v/v), en criotubos (empleando 700 µl de cultivo junto con 350 µl de glicerol), y se almacenaron a -80°C hasta su utilización posterior (Rabbia et al., 2016).

### **2.4. Identificación bacteriana.**

#### **2.4.1. Observación de características microbiológicas e identificación fenotípica.**

Los aislados almacenados a -80°C se cultivaron en placas de agar Mueller Hinton (MH) en aerobiosis a 35°C por 18 - 24 h. A las colonias bacterianas obtenidas se les realizó tinción de Gram para estudiar su afinidad tintorial, morfología y agrupación. En aquellas cepas en las que la Tinción de Gram no fue concluyente, se les efectuó la prueba de filancia (Procop et al., 2018). Para el control de calidad de dichos procedimientos, se emplearon las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923. Además, para analizar su capacidad de metabolizar azúcares, los aislados se sembraron en agar triple azúcar hierro (TSI), y se incubaron en aerobiosis a 35°C por 18 - 24 h.

Luego se sometieron a prueba de oxidasa para establecer su pertenencia al Orden *Enterobacterales*. Para el control de calidad de dichas pruebas, se utilizaron las cepas *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Los aislados fermentadores oxidasa negativos, se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales (Tille, 2017; Berríos & Ilabaca, 2018), empleando una herramienta de identificación online alojada en la web: <https://www.microrao.com/identify.htm>. Para el control de calidad de esta etapa se utilizó la cepa *E. coli* ATCC 25922.

## **2.4.2. Identificación molecular de los aislados.**

### **2.4.2.1. Extracción de ADN genómico (ADNg).**

Los aislados que no pudieron ser identificados mediante las pruebas fenotípicas, se sometieron a secuenciación del gen ribosomal *ARNr16S* (Tindall et al., 2010; Chun et al., 2010; Johnson et al., 2019). Para ello, se realizó extracción de ADNg de los aislados utilizando la matriz comercial *InstaGene* (Bio-Rad), siguiendo el protocolo del fabricante con modificaciones descrito en el **ANEXO 2**. Los extractos de ADNg obtenidos se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

### **2.4.2.2. PCR convencional.**

Se realizó PCR convencional en el equipo *MiniAmp™ Plus Thermal Cycler* (Applied Biosystems) utilizando una mezcla de reacción de 25 µl por cada aislado, compuesta de 12,5 µl de *GoTaq G2 Green Master Mix* (Promega), 9,5 µl de agua libre de nucleasas, 0,25 µl (25 µM) de partidor P0, 0,25 µl (25 µM) de partidor P6 y 2,5 µl de ADNg. Como control positivo se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922, y como negativo agua libre de nucleasas (ALN). Los amplicones generados se conservaron a -20°C hasta su utilización posterior. Las características de los partidores empleados se encuentran en el **ANEXO 3** y las condiciones de amplificación en el **ANEXO 4**.

#### 2.4.2.3. Electroforesis en gel de agarosa.

Para la visualización de los productos de PCR se preparó un gel de 100 ml de agarosa al 2% empleando buffer TAE 0,5 x, al que se le adicionó 3 µl de *Maestrosafe Nucleic Acid Prestained* (MaestroGen). Una vez solidificado el gel, se cargaron en cada uno de los pocillos 5 µl de cada producto de PCR, 5 µl de cada control de calidad (*E. coli* ATCC 25922 (control positivo) y agua libre de nucleasas (ALN) (control negativo) y 5 µl de *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen). La electroforesis se corrió a 100 V durante 90 min utilizando buffer TAE 0,5 x, y el gel fue visualizado empleando el equipo *UVITEC UVIDOC Gel Imager Transilluminator system* (UVITEC Cambridge).

#### 2.4.2.4. Secuenciación tipo Sanger.

Los productos de PCR se enviaron a *MacroGen* (Korea), para su secuenciación por el método de Sanger. Los cromatogramas producidos se analizaron con el software *BioEdit* v7.2.5 (Alzohairy, 2011), y se obtuvo el reverso complementario de cada secuencia *reverse*. Las secuencias *forward* y *reverse* se alinearon en la herramienta *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>), y las secuencias consenso generadas se subieron a la plataforma *blastn*, para confirmar la secuenciación ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

Posteriormente, dichas secuencias se subieron a la base de datos *SILVA* (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014), y se descargaron todas las secuencias correspondientes a las especies más probables para cada aislado en estudio, las que luego se convirtieron de ARN a ADN mediante el software *BioEdit* v7.2.5 (Alzohairy, 2011). Cada grupo de secuencias obtenidas de *SILVA* (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014), en compañía de cada secuencia de cada aislado, se subieron a la plataforma *NGPhylogeny* (Dereeper et al., 2008; Lemoine et al., 2019). Seguidamente se efectuaron alineamientos múltiples con la herramienta *Clustal Omega* v1.2.4 (Sievers et al., 2011), los que luego se filtraron con la herramienta *BMGE* v1.12 (Criscuolo & Gribaldo, 2010).

Los archivos de salida en formato PHYLIP se subieron a la plataforma *Galaxy Australia* (<https://usegalaxy.org.au/>), en la cual se ejecutaron análisis filogenéticos mediante método de máxima verosimilitud con el software *IQ-TREE* v2.1.2 (Minh et al., 2020). Para evaluar el soporte de los nodos se utilizaron las pruebas *SH-aLRT*, *aBayes* (Anisimova et al., 2011), y *UFBoot* (Hoang et al., 2017) empleando 1000 réplicas. Se utilizaron como grupos externos secuencias de referencia apropiadas para cada aislado en estudio. Los cladogramas resultantes se visualizaron con la herramienta *iTOL* v6.8.1 (Letunic & Bork, 2021).

Los aislados que no pudieron identificarse mediante secuenciación del gen *ARNr16S*, se enviaron al Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional Guillermo Grant Benavente, Concepción, para someterlos a MALDI-TOF en el equipo *VITEK®MS* (bioMérieux). Mientras que aquellos que resultaron ser productores de carbapenemasas, se sometieron adicionalmente a secuenciación genómica completa (SGC) (ver secciones 2.9 y 3.7).

## **2.5. Susceptibilidad antibiótica de *Enterobacterales* aislados de AS.**

A los *Enterobacterales* identificados se les realizaron pruebas de susceptibilidad a antibióticos mediante método de difusión en agar, de acuerdo con el documento *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 13th ed. CLSI document M02* (CLSI, 2018, 2022). Para ello se emplearon los antibióticos: cefoxitina (FOX) (30 µg), ceftriaxona (CRO) (30 µg), ceftazidima (CAZ) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg), cefepima (FEP) (30 µg), imipenem (IPM) (10 µg), ertapenem (ETP) (10 µg), meropenem (MEM) (10 µg), gentamicina (GEN) (10 µg), amikacina (AMK) (30 µg), ciprofloxacino (CIP) (5 µg), levofloxacino (LVX) (5 µg), cloranfenicol (CHL) (30 µg), tetraciclina (TCY) (30 µg), sulfonamida (SUL) (300 µg), y trimetoprim (TRI) (5 µg). Para el control de calidad se empleó la cepa *E. coli* ATCC 25922.

Posteriormente, se establecieron los perfiles de resistencia considerando los halos de inhibición de acuerdo con el documento *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100* (CLSI, 2023). El índice de resistencia múltiple a antibióticos (MAR) fue calculado para cada cepa, respectivamente (Krumperman, 1983; Odjadjare et al., 2012).

## **2.6. Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas en *Enterobacterales* aislados de AS.**

### **2.6.1. Detección de BLEE mediante sinergia por combinación de discos.**

La detección de BLEE se realizó mediante sinergia por combinación de discos, de acuerdo con el documento CLSI (2023), con modificaciones obtenidas de Calvo et al. (2011) y del documento *Guidelines for detection of Resistance Mechanisms version 2.0* ([https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_170711.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf)) del *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), para detectar BLEE en presencia y ausencia de enzimas AmpC.

Para ello se emplearon placas de agar Mueller Hinton (MH) con y sin suplementación de cloxacilina (CLX) (250 µg/ml) y se utilizaron sensidiscos de CTX (30 µg), CAZ (30 µg), cefotaxima-ácido clavulánico (CTX-C) (30/10 µg), y ceftazidima-ácido clavulánico (CAZ-C) (30/10 µg). Como control se emplearon las cepas *Klebsiella pneumoniae* UCO168 (BLEE<sup>+</sup>) y *Enterobacter cloacae* UCO186 (BLEE<sup>+</sup> y AmpC<sup>+</sup>).

## **2.6.2. Detección de carbapenemasas.**

### **2.6.2.1. Prueba de *Blue Carba*.**

Todos los *Enterobacterales* se sometieron a la prueba *Blue Carba*, siguiendo el protocolo del Laboratorio Nacional de Referencia en Antimicrobianos, INEI-ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán” (<http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2014/10/BUE-CARBA-IN-HOME-Version-2.pdf>). Se utilizaron como controles las cepas de *K. pneumoniae* UCO338 (KPC<sup>+</sup>), *K. pneumoniae* UCO361 (NDM<sup>+</sup>), *K. pneumoniae* UC322 (OXA-48-like<sup>+</sup>) y *E. coli* ATCC 25922 (no productora de carbapenemasas).

### **2.6.2.2. Inmunoensayo *NG-Test® CARBA-5*.**

Las cepas que resultaron positivas a la detección de carbapenemasas mediante *Blue Carba*, se sometieron a la prueba de inmunoensayo *NG-Test® CARBA-5*, (NG Biotech), para identificar las enzimas portadas por las cepas, de entre las que detecta dicho inmunoensayo (NDM, KPC, IMP, VIM, y OXA-48-like), siguiendo el protocolo del fabricante. Para el control de calidad se emplearon las cepas *E. coli* UCO327 (KPC<sup>+</sup>) y *E. coli* ATCC 25922 (no productora de carbapenemasas).

## **2.7. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) a Imipenem (IPM) en *Enterobacterales* productores de carbapenemasas.**

A las cepas que resultaron ser productoras de carbapenemasas se les determinó la CMI a IPM utilizando tiras epsilométricas Liofilchem®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se empleó como control la cepa *E. coli* ATCC25922.

## **2.8. Detección e identificación de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en *Enterobacterales* aislados de AS.**

Para la pesquisa de genes de BLEE y/o carbapenemasas se procedió como se indica en los puntos **2.7.1** y **2.7.2**. A los aislados productores de carbapenemasas, además se les realizó secuenciación genómica completa (SGC) para confirmar su identificación a nivel de especie, identificar las variantes de sus genes de carbapenemasas, identificar otros GRAs, y efectuar otros análisis bioinformáticos. Se consideró el mismo procedimiento en caso de detectar alguna cepa portadora de algún gen codificante de BLEE de alto interés. (ver secciones **2.9** y **3.7**).

### **2.8.1. Extracción de ADNg.**

El ADNg fue extraído de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección **2.4.2.1**.

### **2.8.2. PCR convencional.**

Para investigar la presencia de genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas de diferentes familias (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub>, *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub>) se realizó PCR convencional en los equipos *MiniAmp™ Plus Thermal Cycler* y *Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler* (Applied Biosystems). Para ello se prepararon mezclas de reacción de 10  $\mu$ l, compuestas de 5  $\mu$ l de *GoTaq G2 Green Master Mix* (Promega), 3,8  $\mu$ l de ALN, 0,1  $\mu$ l (25  $\mu$ M) de partidor *forward*, 0,1  $\mu$ l (25  $\mu$ M) de partidor *reverse*, y 1  $\mu$ l de ADNg. Como controles positivos se emplearon las cepas; *K. pneumoniae* UCO168 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>+</sup> y *bla*<sub>TEM</sub><sup>+</sup>), *E. coli* UCO327 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>+</sup> y *bla*<sub>KPC</sub><sup>+</sup>), *K. pneumoniae* UCO217 (*bla*<sub>CTX-M-2-like</sub><sup>+</sup>), *E. coli* UCO298 (*bla*<sub>CTX-M-8-like</sub><sup>+</sup>), *E. coli* UCO250 (*bla*<sub>CTX-M-9-like</sub><sup>+</sup>), *A. baumannii* UCO323 (*bla*<sub>NDM</sub><sup>+</sup>), *P. aeruginosa* UCO236 (*bla*<sub>VIM</sub><sup>+</sup>), y *K. pneumoniae* UCO322 (*bla*<sub>OXA-48-like</sub><sup>+</sup>). Como controles negativos se empleó la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (no codificante de  $\beta$ -lactamasas) y ALN. Los productos de PCR fueron visualizados de acuerdo con el protocolo descrito en **2.4.2.3**. Los amplicones generados se conservaron a -20°C hasta su utilización posterior. Las características de los partidores utilizados para cada gen se encuentran en el **ANEXO 3** y las condiciones de amplificación en el **ANEXO 4**.

### 2.8.3. Digestión enzimática de *bla<sub>SHV</sub>*.

#### 2.8.3.1. PCR convencional.

Con el objeto de determinar si el gen *bla<sub>SHV</sub>* amplificados en algunas cepas codificaba para una enzima BLEE de la familia SHV, los productos de PCR obtenidos se sometieron a digestión enzimática con la enzima de restricción *NheI* (Thermo Fischer Scientific) siguiendo el protocolo descrito por Nüesch-Inderbinnen et al., (1996). Para ello, se realizó PCR convencional, empleando una mezcla de reacción de 25 µl por cepa, compuesta de 12,5 µl de *KAPA Taq ReadyMix* (Kapa Biosystems), 9,5 µl de agua libre de nucleasas, 0,25 µl (25 µM) del partidor Nuesch-F, 0,25 µl 25 (µM) del partidor Nuesch-R y 2,5 µl de ADNg. Las características de los partidores utilizados se presentan en el **ANEXO 3** y las condiciones de amplificación en el **ANEXO 4**. Los productos de PCR fueron visualizados de acuerdo con el protocolo descrito en **2.4.2.3**. Como controles positivos se emplearon las cepas *K. pneumoniae* UCO168 (*bla<sub>SHV</sub>*<sup>+</sup> [variante de amplio espectro]) y *K. pneumoniae* UCO182 (*bla<sub>SHV-3</sub>*<sup>+</sup> [variante de espectro extendido]), mientras que como controles negativos se empleó la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (no codificante de β-lactamasas) y ALN. Los amplicones generados se conservaron a -20°C hasta su utilización posterior.

#### 2.8.3.2. Ensayo de digestión enzimática.

Este experimento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante de la enzima *NheI* (Thermo Fischer Scientific) con las modificaciones descritas a continuación. Para ello se emplearon los productos de PCR obtenidos anteriormente, los que se descongelaron a 4°C.



El ensayo se efectuó empleando 4 tubos Eppendorf de 1,5 ml. Dos para la cepa a investigar (uno con la enzima, y el otro sin la enzima), y los otros dos para el control positivo (*K. pneumoniae* UCO168 (*bla<sub>SHV</sub><sup>+</sup>* [variante de amplio espectro]) y negativo (*K. pneumoniae* UCO182 (*bla<sub>SHV-3</sub><sup>+</sup>* [variante de espectro extendido])), respectivamente.

A continuación, en 3 tubos Eppendorf se incorporaron los siguientes compuestos (en iguales cantidades por cada tubo); 3 µl de amplicón, 2 µl de búfer Tango 10x (ThermoFisher), 14 µl de agua libre de nucleasas, y 1 µl de *NheI* (10 U/µL) (ThermoFisher). Mientras que en el cuarto tubo se añadieron los mismos compuestos, excepto por la enzima, la cual se reemplazó por ALN. Luego todos los tubos se incubaron a 37°C por 18 - 20 h en baño termorregulado

Después de finalizada la incubación, se añadió a todos los tubos 2,5 µl de búfer de carga (BC). Seguidamente, la digestión fue revelada mediante electroforesis en gel de agarosa 2% utilizando buffer TAE 0,5 x, a la que se le incorporó 1,2 µl de *Maestrosafe Nucleic Acid Prestained* (MaestroGen). Se cargaron 18 µl de los productos sometidos a digestión enzimática y 5 µl *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen). La electroforesis se corrió a 100 V en buffer TAE 0,5 x durante 50 min. El gel fue revelado empleando el equipo *UVITEC UVIDOC Gel Imager Transilluminator system* (UVITEC Cambridge).

#### **2.8.4. Secuenciación tipo Sanger.**

Con el objeto de determinar la variante del gen *bla<sub>SHV</sub>* digeridos previamente, así como también, determinar si el gen *bla<sub>TEM</sub>* amplificados en algunas cepas correspondía a BLEE de la familia TEM. Se realizó PCR convencional para amplificar dichos genes de acuerdo con lo estipulado en la sección **2.7.2**. Seguidamente, los amplicones generados se visualizaron de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado **2.4.2.3**. Por otra parte, los productos de PCR se enviaron a *Macrogen* (Chile), para su secuenciación por el método de Sanger.

Los cromatogramas producidos se analizaron con el software *BioEdit* v7.2.5 (Alzohairy, 2011), y se obtuvo el reverso complementario de cada secuencia *reverse*. Las secuencias *forward* y *reverse* se alinearon en la herramienta *MultAlin*

(<http://multalin.toulouse.inra.fr/>). Seguidamente, las secuencias consenso generadas se subieron a la plataforma *blastn* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)) para confirmar la secuenciación.

Posteriormente, dichas secuencias se introdujeron en las herramientas *Expasy* (<https://web.expasy.org/translate/>), *EMBOSS* *Transeq* ([https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss\\_transeq](https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss_transeq)), o *blastx* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK\\_LOC=blasthome&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastx](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastx)) para traducirlas a secuencias aminoacídicas (SAs), y estas últimas se subieron a la base de datos *BLDB* (Naas et al., 2017). Se descargaron todas las secuencias correspondientes a las variantes más probables, para cada gen de  $\beta$ -lactamasa en estudio. Cada grupo de secuencias en compañía de cada secuencia de cada gen respectivo, se subieron a la plataforma *NGPhylogeny* (Dereeper et al., 2008; Lemoine et al., 2019). Además, se efectuaron alineamientos múltiples con la herramienta *Clustal Omega v1.2.4* (Sievers et al., 2011), los que luego se filtraron con la herramienta *BMGE v1.12* (Criscuolo & Gribaldo, 2010).

Los archivos de salida en formato PHYLIP se emplearon para efectuar análisis filogenéticos, como se detalla en la sección **2.4.2.4**.

## **2.9. Secuenciación genómica completa (SGC) y análisis *in silico* de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.**

Se efectuó SGC en las cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32, cuya nomenclatura se estipula en **Tabla 6**. Para la cepa M1/A/C/29, se extrajo su ADNg mediante la matriz comercial *InstaGene™* (BioRad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después, dicho ADNg fue enviado a SeqCenter, USA, en donde fue purificado con el kit *ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep*, siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, la concentración de ADNg final obtenido fue determinada mediante *Qubit*.

Se prepararon bibliotecas genómicas empleando el kit *Illumina DNA Prep* basado en tagmentación y PCR, junto con índices duales únicos (IDU) de 10 pb de IDT personalizados, con un tamaño de inserción objetivo de 280 pb. No se realizaron pasos adicionales de fragmentación de ADN o selección de tamaño. Las bibliotecas se sometieron a SGC en la plataforma de secuenciación *NovaSeq X Plus* (Illumina), en una o más corridas multiplexadas en celdas de flujo compartidas, produciendo lecturas emparejadas de 2x151 pb. La demultiplexación, control de calidad, y recorte de adaptadores de las lecturas obtenidas, se ejecutaron con *BCL convert v4.2.4* (Illumina). Seguidamente, las lecturas crudas filtradas se ensamblaron en contigs utilizando *Skesa v1.1.0* (Souvorov et al., 2018), las estadísticas de secuenciación se analizaron con *Quast v5.2.5* (Mikheenko et al., 2018), mientras que la anotación se efectuó con *Bakta v1.9.2* (Schwengers et al., 2021).

En el caso de las cepas M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32, su ADNg se extrajo utilizando el kit *DNeasy UltraClean Microbial* (Qiagen). La pureza de las muestras de ADNg se evaluó mediante espectrofotometría *NanoQuant*, y la concentración se determinó utilizando el ensayo *Qubit® 3.0 dsDNA BR*. Se prepararon bibliotecas genómicas a partir de 400 ng de ADNg utilizando el kit *Illumina DNA Prep Kit* y los índices *Nextera DNA CD* (Illumina), siguiendo el protocolo del fabricante. La cuantificación de las bibliotecas se realizó con *Qubit 3.0*, y la integridad de las bibliotecas se verificó mediante electroforesis capilar utilizando el equipo *Qsep-100* (Bioptic Inc.). Posteriormente, las bibliotecas se sometieron a SGC en la plataforma de secuenciación *NextSeq 500* (Illumina) con el kit *NextSeq 500/550 High Output v2.5* de 150 ciclos (lecturas pareadas, longitud de lectura 2 x 75 pb). Tras la secuenciación, las lecturas se demultiplexaron utilizando la aplicación *BaseSpace* (Illumina). La evaluación de calidad de las lecturas se realizó con el software *FastQC* (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), y las lecturas de baja calidad y adaptadores se filtraron utilizando *Trimmomatic v0.36* (Bolger et al., 2014) con una etapa de *IlluminaClip*.

Para el análisis genómico, las lecturas crudas filtradas se ensamblaron en contigs utilizando *Unicycler v0.5.1* (Wick et al., 2016), y las estadísticas de secuenciación se obtuvieron mediante *Quast v5.2.5* (Mikheenko et al., 2018). Las anotaciones de genes se realizaron a través de *Bakta v1.9.2* (Schwengers et al., 2021).

La identificación a nivel de especie de los aislados, se ejecutó utilizando la herramienta *Ribosomal Multi Locus Sequence Typing (rMLST)* (Jolley et al., 2012) y *JSpeciesWS* (Richter et al., 2015) con búsqueda de tetracorrelación (TCS). Posteriormente, se recuperaron genomas de referencia correspondientes a las especies bacterianas con los z-scores más altos de *GenBank* (Benson et al., 2013), y se determinaron los porcentajes de identidad nucleotídica promedio utilizando el algoritmo BLAST+ (ANIb%). Finalmente, se analizaron cada grupo de genomas utilizando la herramienta *Genome-to-Genome Distance Calculator 3.0* (GGDC) (Meier-Kolthoff et al., 2013, 2021) para determinar los porcentajes de hibridación de ADN-ADN *in silico* (DDH%). Los genomas de referencia utilizados se enumeran en la **Tabla 12**.

Los GRAs se identificaron utilizando *Abricate v1.0.1* (Seemann, 2016) disponible en la plataforma *Galaxy Australia* (<https://usegalaxy.org.au/>), utilizando las bases de datos *ResFinder v4.4.2* (Bortolaia et al., 2020) y *NCBI Bacterial Antimicrobial Resistance Reference Gene Database*. Los STs de los aislados se determinaron utilizando la herramienta *MLST v2.0.9* (Larsen et al., 2012), y se identificaron EGMs asociados con GRAs utilizando la herramienta *Mobile Element Finder v1.0.3* (Johansson et al., 2020) y *PlasmidFinder v2.1* (Carattoli et al., 2014). También se detectaron integrones utilizando *IntegronFinder v2.0.3* (Néron et al., 2022).

Para los dos genomas pertenecientes al género *Klebsiella*, se efectuó un análisis adicional utilizando *cgMLST* (Hennart et al., 2022), *Kleborate v2.3.2* (Lam et al., 2021) y *Kaptive v2.0.7* (Wyres et al., 2016), disponibles en el servidor *PathogenWatch* (<https://pathogen.watch/>).

Los genomas restantes (2/4), pertenecientes a los géneros *Escherichia* y *Citrobacter*, se sometieron a un análisis adicional para pesquisa de genes de virulencia, en *Ecoli\_VF* y *VFDB* respectivamente (Liu et al., 2021), a través de *Abricate v1.0.1* (Seemann, 2016).

Para estudiar el linaje de las cepas, se obtuvieron genomas de cepas chilenas de los géneros *Klebsiella* y *Citrobacter* con los mismos STs desde las bases de datos *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center* (BV-BRC) (Olson et al., 2023) y *PathogenWatch* (Argimón et al., 2021a, 2021b). Los genomas fueron anotados utilizando *Bakta v1.5.0* (Schwengers et al., 2021), seguido del alineamiento de *core-genomes* utilizando *Roary v3.13.0* (Page et al., 2015) y filtrado por *SNP-sites* (Page et al., 2016). Se construyeron arboles filogenómicos utilizando el método de máxima verosimilitud (ML) con *IQ-TREE v2.1.2* (Minh et al., 2020), empleando 1000 réplicas de *bootstrapping*, los cuales fueron visualizados utilizando *ITOL v6.8.2* (Letunic and Bork, 2006, 2024).

## **2.10. Detección e identificación de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas directamente desde muestras de AS.**

### **2.10.1. Procesamiento de muestras para obtención directa de ADNg desde AS.**

A partir de cada muestra de AF y de EF obtenida en cada muestreo, se filtraron volúmenes de 150 ml empleando filtros *Millipore™* de 0,22 µm mediante equipo *Oil-Free Vacuum Pump Rocker 300* (Rocker Scientific). Los filtros utilizados se depositaron individualmente en placas de Petri plásticas, individualizadas por tipo de muestra de agua y por periodo de muestreo, y se almacenaron a -20°C hasta el momento de su utilización (Claudia Torres, comunicación personal 2022).

### **2.10.2. Extracción de ADNg.**

La extracción de ADNg se realizó a partir de los filtros Millipore obtenidos en **2.8.1.** mediante el kit comercial *FastDNA™SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals) siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones, las cuales se encuentran detalladas en el **ANEXO 5.**

El ADN<sub>g</sub> obtenido se cuantificó en el equipo *Epoch<sup>TM</sup> Microplate Spectrophotometer* (BioTek), y se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Las concentraciones de ADN<sub>g</sub> cuantificadas se encuentran en el **ANEXO 6**. (Claudia Torres, comunicación personal 2022).

### **2.10.3. PCR convencional.**

Primariamente, se efectuó detección de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas, mediante PCR convencional como se indica en la **sección 2.7.2**, considerando mezclas de reacción de 10 µl por cada gen a estudiar, y a su vez por cada muestra de AS. Seguidamente, los productos de PCR se visualizaron de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado **2.4.2.3**.

### **2.10.4. Secuenciación tipo Sanger.**

Una segunda reacción de PCR convencional se efectuó en el equipo *MiniAmp<sup>TM</sup> Plus Thermal Cycler* (Applied Biosystems) para amplificar los genes; *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M-1-like</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, y *bla<sub>OXA-48-like</sub>*. Para ello se prepararon mezclas de reacción de 25 µl por cada gen a estudiar, y a su vez por cada muestra de AS, compuestas de 12,5 µl de *KAPA Taq ReadyMix* (Kapa Biosystems), 9,5 µl de agua libre de nucleasas, 0,25 µl (25 µM) de partidor *forward*, 0,25 µl (25 µM) de partidor *reverse*, y 2,5 µl de ADN<sub>g</sub> de AS. Las características de los partidores utilizados para cada gen se encuentran en el **ANEXO 3** y las condiciones de amplificación en el **ANEXO 4**.

Posteriormente, los productos de PCR fueron visualizados de acuerdo con el protocolo descrito en el apartado **2.4.2.3**, y los amplicones generados se conservaron a -20°C hasta su utilización posterior. Como controles positivos se emplearon las cepas *K. pneumoniae* UCO168 (*bla<sub>TEM</sub><sup>+</sup>*), *E. coli* UCO327 (*bla<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>+</sup>* y *bla<sub>KPC</sub><sup>+</sup>*), *P. aeruginosa* UCO236 (*bla<sub>VIM</sub><sup>+</sup>*) y *K. pneumoniae* UCO322 (*bla<sub>OXA-48-like</sub><sup>+</sup>*). Como controles negativos se empleó la cepa *S. aureus* ATCC 25923 (no codificante de β-lactamasas) y ALN. Finalmente, los productos de PCR se secuenciaron por el método de Sanger, como se indica en la sección **2.7.4**, y los archivos de salida en formato PHYLIP se utilizaron para ejecutar análisis filogenéticos, como se detalla en la sección **2.4.2.4**.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Recuentos bacterianos.

Los recuentos bacterianos totales (RBT) obtenidos en todas las muestras de AF no presentaron diferencias significativas entre ellos (valores de P de comparaciones de Turkey  $> 0,05$ ) (**Figura 24** y **ANEXO 9**), con variaciones de  $9,9 \times 10^5$  a  $2,4 \times 10^6$  UFC/ml (**Tabla 3**).

Del mismo modo, tampoco se registraron diferencias significativas entre los RBT de todas las muestras de EF (valores de P de comparaciones de Turkey  $> 0,05$ ) (**Figura 24** y **ANEXO 9**), con variaciones de  $1,2 \times 10^0$  a  $6,7 \times 10^0$  UFC/ml (**Tabla 3**). Por el contrario, se hallaron diferencias significativas entre los RBT de AF y EF de cada muestreo (valores de P de comparaciones de Turkey  $< 0,0001$ ) (**ANEXO 9**), con reducciones de entre 5 y 6 logaritmos (**Figura 24**), y variaciones de entre  $1,2 \times 10^0$  a  $2,4 \times 10^6$  UFC/ml (**Tabla 3**).

En el caso de los recuentos de Bacilos Gram negativos (RBGN), recuentos de Bacilos Gram negativos en agar MCC suplementado con CRO ( $4 \mu\text{g/ml}$ ) (RBGN-C), y recuentos de Bacilos Gram negativos en agar MCC suplementado con MEM ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) (RBGN-M), no se evidenciaron diferencias significativas entre todas las muestras de AF (valores de P de comparaciones de Turkey  $> 0,05$ ) (**ANEXO 9**), registrándose un logaritmo de diferencia en RBGN y RBGN-C (**Figura 24**), con variaciones de  $4,7 \times 10^4$  a  $5 \times 10^5$  UFC/ml en RBGN, y de  $8,1 \times 10^3$  a  $3,4 \times 10^4$  UFC/ml en RBGN-C (**Tabla 3**). Así como dos logaritmos de diferencia en RBGN-M (**Figura 24**), con oscilaciones de entre  $4,5 \times 10^1$  a  $2,6 \times 10^3$  UFC/ml (**Tabla 3**). Del mismo modo, tampoco se evidenciaron diferencias significativas en los RBGN, RBGN-C, y RBGN-M entre todas las muestras de EF (valores de P de comparaciones de Turkey  $> 0,05$ ) (**Figura 24** y **ANEXO 9**).

Los resultados de la prueba ANOVA de dos vías, indicaron valores de  $P < 0,0444$  y  $P < 0,0001$  para los factores de fila y de columna respectivamente (**ANEXO 8**), los cuales son estadísticamente significativos (ambos valores de P fueron  $< 0,05$ ). Los resultados en detalle de las comparaciones múltiples de Turkey obtenidas, se encuentran en el **ANEXO 9**.

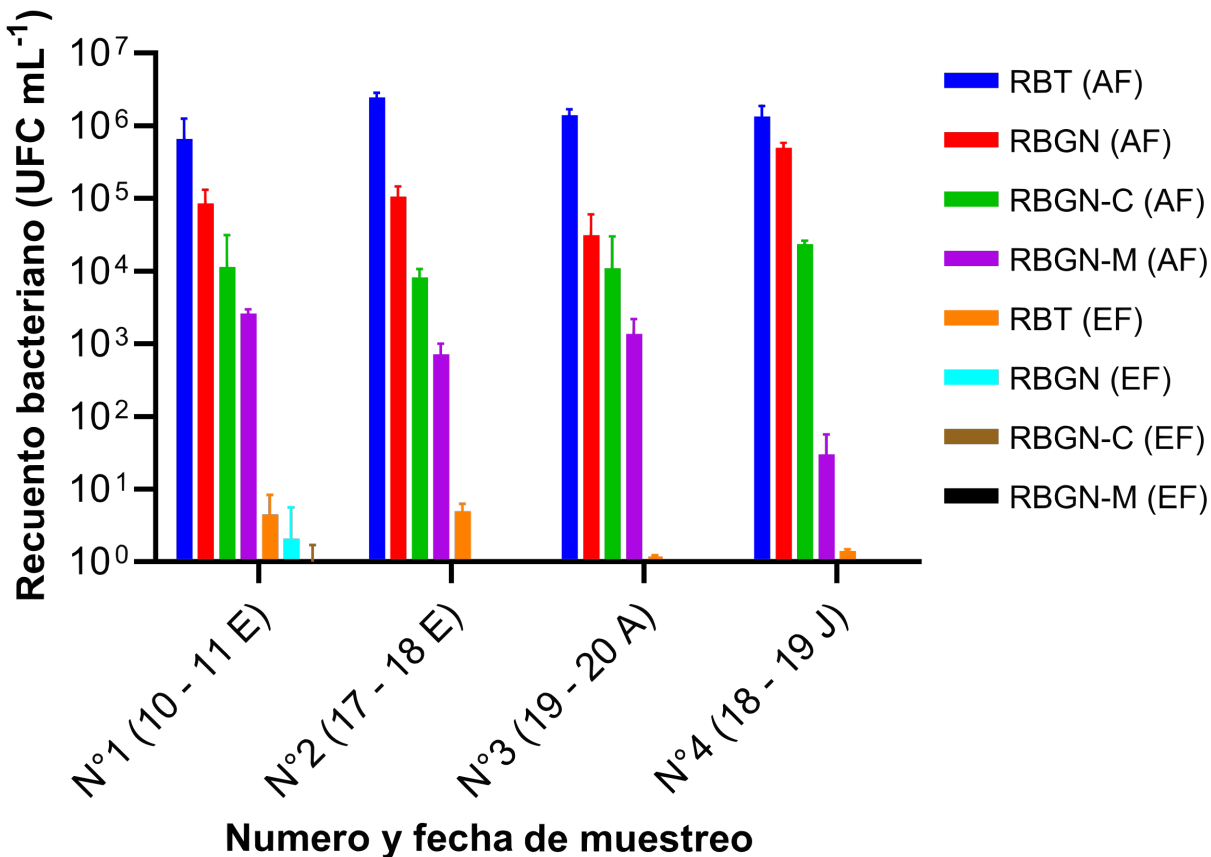


**Tabla 3.** Recuentos bacterianos (UFC/ml) obtenidos en muestras de AF y de EF, de la PTAS del Gran Concepción.

| N°<br>muestreo | Periodo<br>2022     | Muestra | RBT*                   | RBGN**                  | RBGN-C <sup>#</sup>     | RBGN-M <sup>##</sup>    |
|----------------|---------------------|---------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 1              | 10 - 11<br>de Enero | AF      | 9,9x10 <sup>5</sup>    | 8,6x10 <sup>4</sup>     | 3,4x10 <sup>4</sup>     | 2,6x10 <sup>3</sup>     |
|                |                     | EF      | 6,7x10 <sup>0</sup>    | 6,2x10 <sup>0</sup>     | 1,8x10 <sup>0</sup>     | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> |
| 2              | 17 - 18<br>de Enero | AF      | 2,4x10 <sup>6</sup>    | 1x10 <sup>5</sup>       | 8,1x10 <sup>3</sup>     | 7,1x10 <sup>2</sup>     |
|                |                     | EF      | 5x10 <sup>0</sup>      | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> |
| 3              | 19 - 20<br>de Abril | AF      | 1,4x10 <sup>6</sup>    | 4,7x10 <sup>4</sup>     | 3,3x10 <sup>4</sup>     | 1,4x10 <sup>3</sup>     |
|                |                     | EF      | 1,2x10 <sup>0(a)</sup> | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> |
| 4              | 18 - 19<br>de Julio | AF      | 1,3x10 <sup>6</sup>    | 5x10 <sup>5</sup>       | 2,4x10 <sup>4</sup>     | 4,5x10 <sup>1</sup>     |
|                |                     | EF      | 1,4x10 <sup>0</sup>    | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> | ≤1,2x10 <sup>0(b)</sup> |

\*: Recuento bacteriano total en agar R2A, \*\*: Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey, #: Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (4 µg/ml), ##: Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con meropenem (2 µg/ml), **AF**: afluente, **EF**: efluente, **(a)**: recuento mínimo obtenido, **(b)**: placas de cultivo en las que no se obtuvieron recuentos, por lo que se asume que los valores son menores al mínimo indicado en **(a)**.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 24. Representación en escala logarítmica de recuentos bacterianos (UFC/ml) obtenidos en muestras de AF y de EF, de la PTAS del Gran Concepción.** AF: afluente, EF: efluente, E: enero, A: abril, J: julio, **RBT**: Recuento bacteriano total en agar R2A, **RBGN**: Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey, **RBGN-C**: Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (4 µg/ml), **RBGN-M**: Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con meropenem (2 µg/ml).

Fuente: Elaboración propia

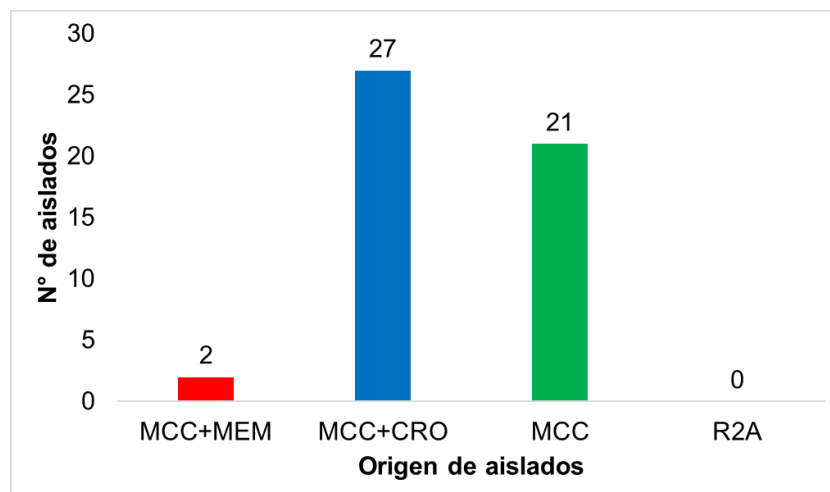
### **3.2. Identificación de bacterias procedentes de AS**

#### **3.2.1. Aislamiento de Bacilos Gram negativos (BGN).**

En total se obtuvieron 205 aislados de BGN, de los cuales, 175 provinieron de AF, y 30 de EF. Posteriormente, al separar dichos aislados según la capacidad de fermentación de azúcares y el tipo de muestra, se encontró que desde AF se recuperaron 97 Bacilos Gram negativos fermentadores (BGN-F), y 78 Bacilos Gram negativos no fermentadores (BGN-NF). Seguidamente, desde EF se aislaron 2 BGN-F y 28 BGN-NF.

Por otra parte, en los BGN-F, tanto de AF como EF, al determinar su capacidad de producir la enzima citocromo oxidasa y el tipo de muestra, se encontró desde AF 49 Bacilos Gram negativos fermentadores oxidasa positiva (BGN-F-Ox[+]) y 48 Bacilos Gram negativos fermentadores oxidasa negativa (BGN-F-Ox[-]). Para el EF, los dos aislados recuperados correspondieron a BGN-F-Ox[-], no detectándose BGN-F-Ox[+].

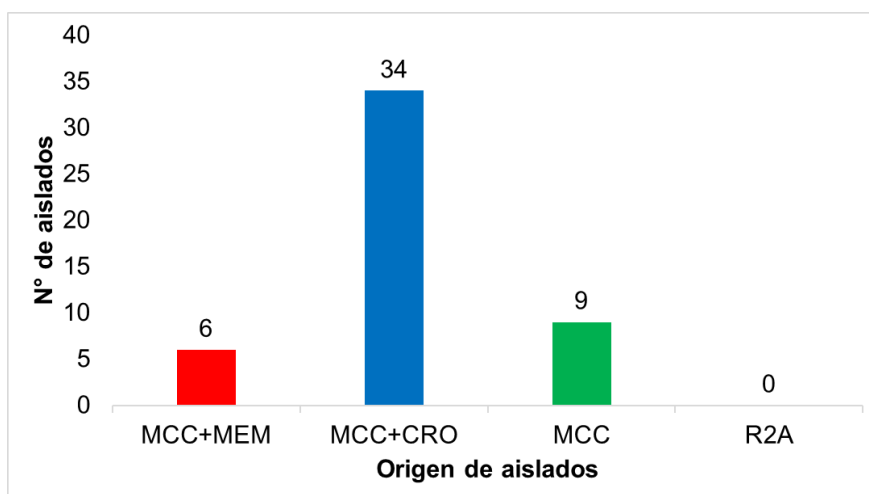
La distribución de los 50 aislados de BGN-F-Ox[-], y de los 49 aislados BGN-F-Ox[+], considerando el tipo de muestra y el medio de cultivo de aislamiento, se presentan en las **Figuras 25 y 26** respectivamente.



**Figura 25. Distribución de BGN-F-Ox[-] obtenidos de muestras de AF y EF.**

**MCC:** agar MacConkey, **MCC+CRO:** agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (CRO) (4 µ/ml), **MCC+MEM:** agar MacConkey suplementado con meropenem (MEM) (2 µ/ml), **R2A:** Agar 2A de Reasoner. **Nota:** Sobre las barras de colores se indican los números de aislados obtenidos desde cada medio de cultivo representado en el eje x.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 26. Distribución de BGN-F-Ox[+] obtenidos de muestras de AF y EF.**

**MCC:** agar MacConkey, **MCC+CRO:** agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (CRO) (4 µ/ml), **MCC+MEM:** agar MacConkey suplementado con meropenem (MEM) (2 µ/ml), **R2A:** Agar 2A de Reasoner. **Nota:** Sobre las barras de colores se indican los números de aislados obtenidos desde cada medio de cultivo representado en el eje x.

Fuente: Elaboración propia

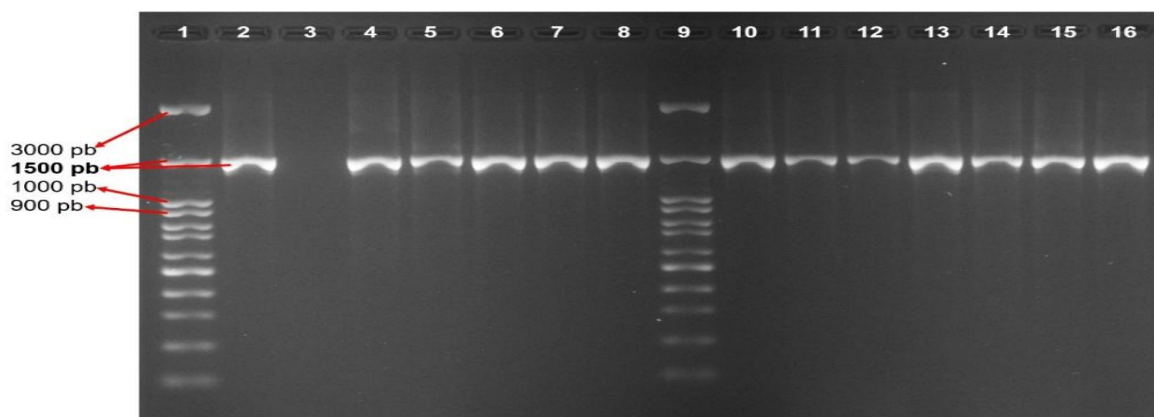
### 3.2.2. Identificación de BGN-F-Ox[-].

De los 50 Bacilos BGN-F-Ox[-] recuperados, 48 de AF y 2 de EF, 29 se identificaron con pruebas bioquímicas convencionales, 14 mediante secuenciación del gen *ARNr16S*, 4 mediante SGC, y 3 mediante MALDI-TOF en el equipo *VITEK®MS* (bioMérieux).

En las **Figuras 27A y 27B** se detalla la amplificación del gen *ARNr16S* efectuada en los 14 aislados antes mencionados. Además, a 4/14 (M1/A/C/27, M2/A/MCC/41, M2/A/MCC/42, y M3/A/MCC/51), fue necesario efectuarles análisis filogenéticos (**Figuras 28 a 31**) para establecer su identidad. Mientras que a 10/14 no fue necesario, debido a que la indagación en la base de datos *SILVA* (Quast et al., 2013; Yilmaz et al., 2014) resultó en una sola especie más probable para cada aislado.

Por otra parte, en la **sección 3.7** se detalla el proceso de SGC para la identificación de los aislados M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, M4/A/C/32. Mientras que M1/A/MCC/39, M3/E/MCC/FW, y M4/E/MCC/FW se identificaron mediante MALDI-TOF

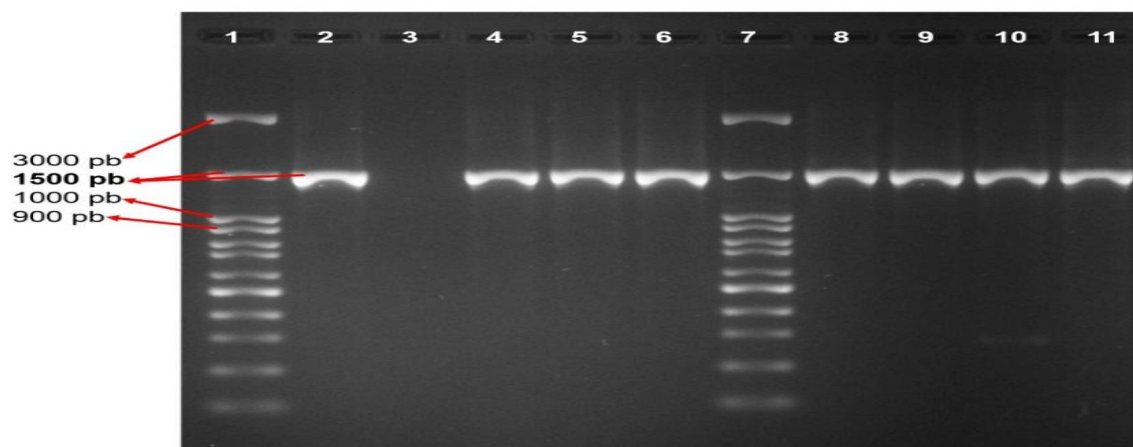
Todos los aislados fueron identificados como miembros del orden *Enterobacterales*, mientras que las especies más frecuente detectadas fueron *E. coli*, *K. pneumoniae* complex y *K. oxytoca* complex (**Tablas 4, 5A, y 5B**).



**Figura 27A. Amplificación del gen de *ARNr16S* en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**carriles 1 y 9:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* ATCC 25922, **carril 3:** ALN, **carril 4:** M1/A/C/27, **carril 5:** M1/A/MCC/39, **carril 6:** M2/A/C/29, **carril 7:** M2/A/C/30, **carril 8:** M2/A/C/36, **carril 10:** M2/A/MCC/39, **carril 11:** M2/A/MCC/41, **carril 12:** M2/A/MCC/42, **carril 13:** M3/A/C/42<sup>1</sup>, **carril 14:** M3/A/MCC/51, **carril 15:** M3/E/MCC/FW, **carril 16:** M3/E/R2A/2<sup>1</sup>, **pb:** pares de bases, **(1):** aislados descartados por tratarse de Gram positivos correspondientes a *Bacillus* spp. **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

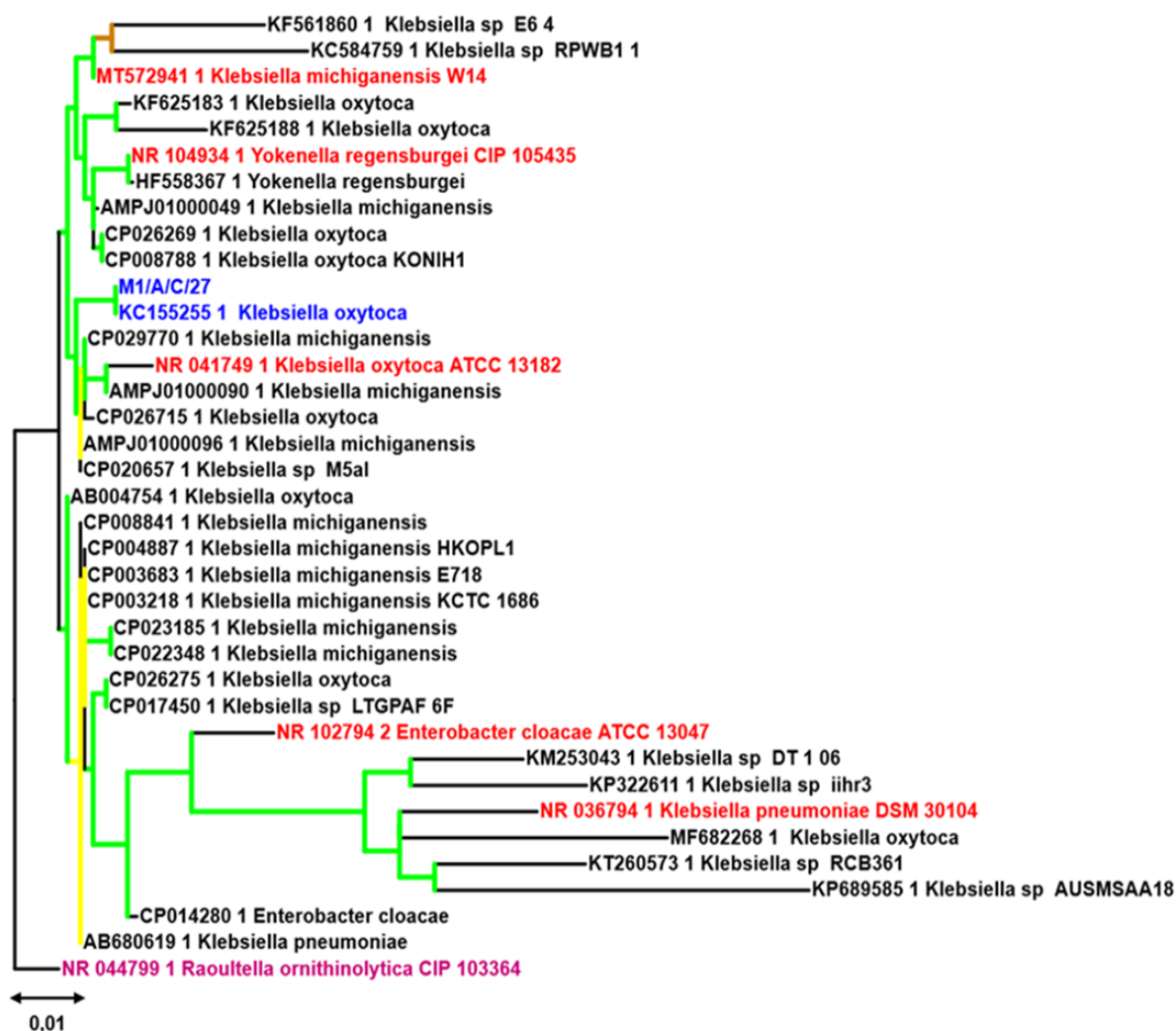
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 27B. Amplificación del gen de *ARNr16S* en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS (Continuación).**

**carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* ATCC 25922, **carril 3:** ALN, **carril 4:** M4/A/C/17, **carril 5:** M4/A/C/20, **carril 6:** M4/A/C/21, **carril 8:** M4/A/C/27, **carril 9:** M4/A/C/41, **carril 10:** M4/A/MCC/49, **carril 11:** M4/E/MCC/FW, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.



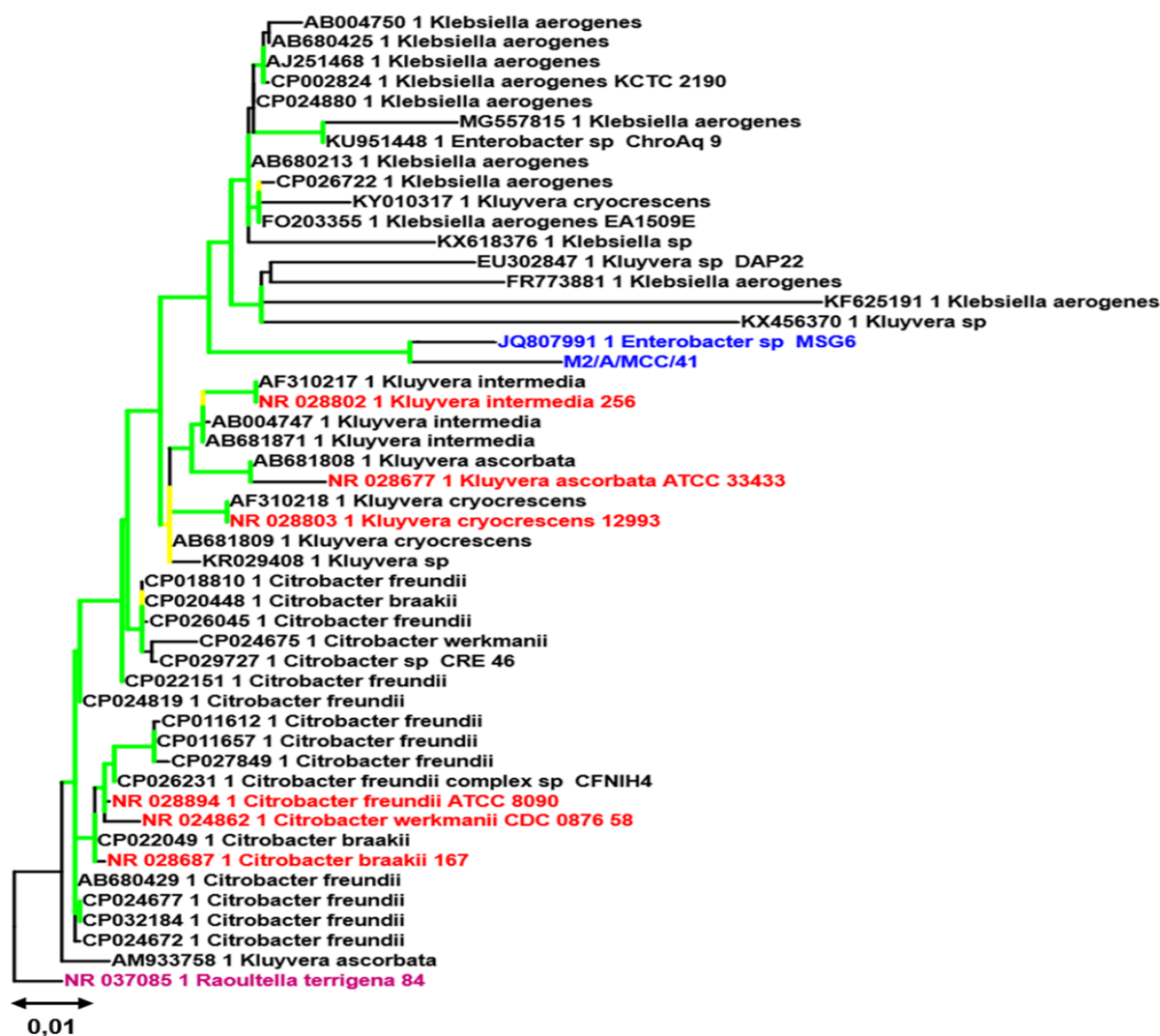
| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
| ■                                       | 60 - 70          | 0,60 - 0,70 |
| ■                                       | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
| ■                                       | > 80             | > 0,80      |

UFBoot: Ultrafast Bootstrap, SH-aLRT: approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, aBayes: Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 28. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen *ARNr16S* del aislado M1/A/C/27.**

**Nota 1:** en azul el aislado en estudio, y la especie más próxima filogenéticamente, en rojo especies de referencia, y en violeta el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de *bootstrap*  $\geq 60$  UFBoot y SH-aLRT o  $\geq 0,6$  para aBayes. **Nota 3:** se emplearon 36 secuencias *ARNr16S* para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.



| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
| ■                                       | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
| ■                                       | > 80             | > 0,80      |

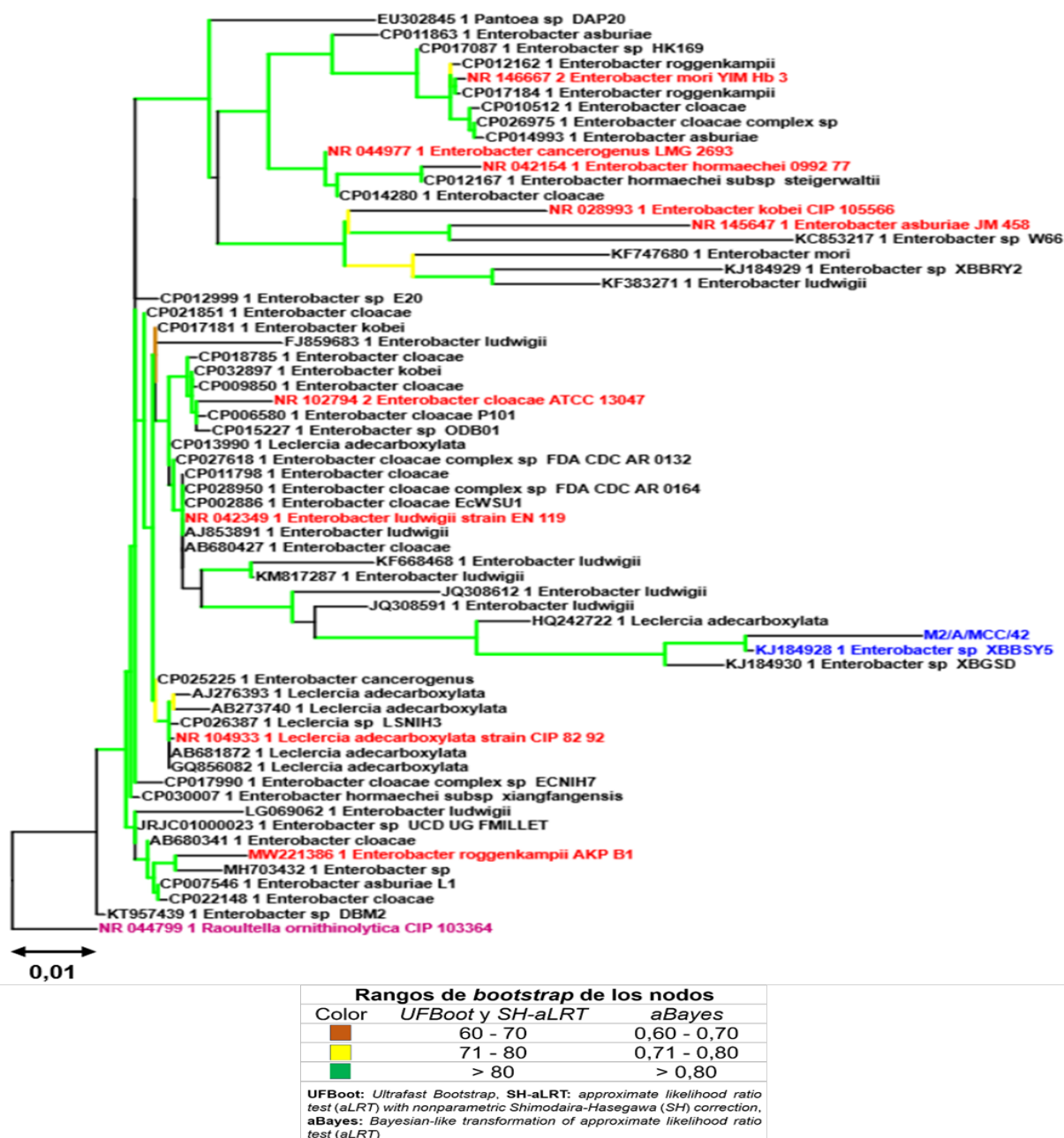
UFBoot: Ultrafast Bootstrap, SH-aLRT: approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, aBayes: Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 29.** Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen *ARNr16S* del aislado M2/A/MCC/41.

**Nota 1:** en azul se indica el aislado en estudio, y la especie más próxima filogenéticamente, en rojo se indican especies de referencia, y en violeta el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de *bootstrap*  $\geq 60$  UFBoot y SH-aLRT o  $\geq 0,6$  para aBayes. **Nota 3:** se emplearon 48 secuencias *ARNr16S* para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.

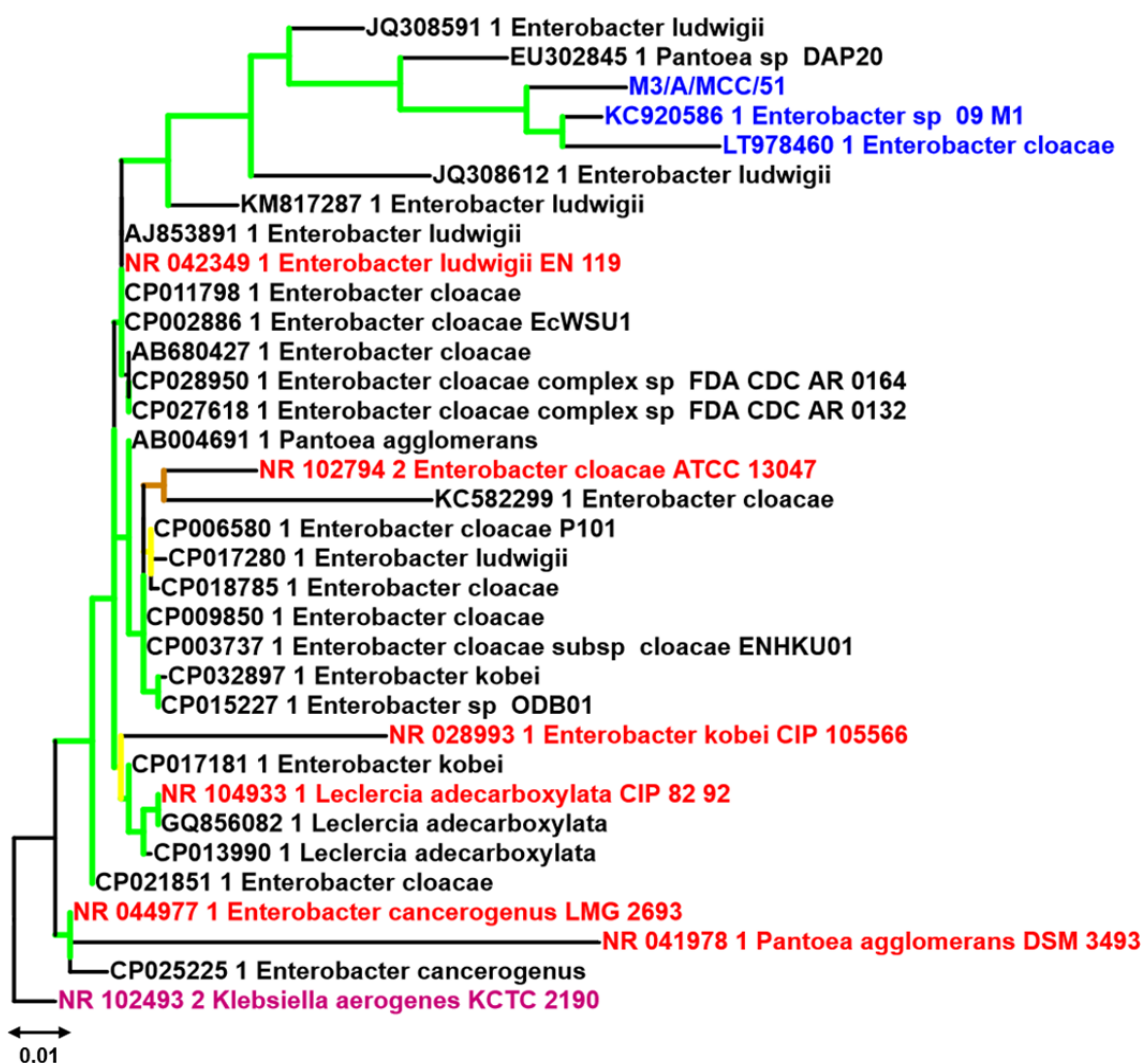




**Figura 30. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen ARNr16S del aislado M2/A/MCC/42.**

**Nota 1:** en azul se indica el aislado en estudio, y la especie más próxima filogenéticamente, en rojo especies de referencia, y en violeta el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de *bootstrap*  $\geq 60$  UFBboot y SH-aLRT o  $\geq 0,6$  para aBayes. **Nota 3:** se emplearon 62 secuencias ARNr16S para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.



| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
| ■                                       | 60 - 70          | 0,60 - 0,70 |
| ■                                       | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
| ■                                       | > 80             | > 0,80      |

UFBoot: Ultrafast Bootstrap, SH-aLRT: approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, aBayes: Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 31. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud en base al gen *ARNr16S* del aislado M3/A/MCC/51.**

**Nota 1:** en azul se indica el aislado en estudio, y las especies más próximas filogenéticamente, en rojo especies de referencia y en verde el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de *bootstrap*  $\geq 60$  UFBoot y SH-aLRT o  $\geq 0,6$  para aBayes. **Nota 3:** se emplearon 33 secuencias *ARNr16S* para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 4.** Distribución de *Enterobacterales* de las familias *Enterobacteriaceae* y *Morganellaceae* identificados en AS.

| Especie                                                              | Nº de cepas |
|----------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Citrobacter freundii</i> complex                                  | 1           |
| <i>Citrobacter freundii</i> sensu stricto <sup>(1)</sup>             | 1           |
| <i>Enterobacter</i> sp.                                              | 3           |
| <i>Enterobacter cloacae</i> complex                                  | 1           |
| <i>Enterobacter asburiae</i> <sup>(2)</sup>                          | 2           |
| <i>Enterobacter roggenkampii</i> <sup>(2)</sup>                      | 1           |
| <b><i>Escherichia coli</i></b>                                       | <b>16</b>   |
| <i>Klebsiella aerogenes</i>                                          | 2           |
| <b><i>Klebsiella oxytoca</i> complex</b>                             | <b>6</b>    |
| <i>Klebsiella pasteurii</i> <sup>(1)</sup>                           | 1           |
| <b><i>Klebsiella pneumoniae</i> complex</b>                          | <b>12</b>   |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> <sup>(1)</sup> | 1           |
| <i>Proteus vulgaris</i>                                              | 2           |
| <i>Serratia marcescens</i>                                           | 1           |
| <b>Total</b>                                                         | <b>50</b>   |

**(1):** cepas identificadas mediante SGC (Además hubo una *E. coli* identificada con SGC)

**(2):** cepas identificadas mediante MALDI-TOF. **Nota 1:** en negrita se indican las especies más frecuentemente aisladas. **Nota 2:** *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* forma parte de *K. pneumoniae* complex, *C. freundii* s.str. forma parte de *C. freundii* complex, *E. asburiae* y *E. roggenkampii* forman parte de *E. cloacae* complex, y *K. pasteurii* forma parte de *K. oxytoca* complex.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 5A.** Distribución por muestreo de *Enterobacterales* de las familias *Enterobacteriaceae* y *Morganellaceae* aislados desde AS.

| NM | TM | Origen | NA | CA          | Identificación                                        |
|----|----|--------|----|-------------|-------------------------------------------------------|
| 1  | A  | MCC+C  | 18 | M1/A/C/18   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 1  | A  | MCC+C  | 23 | M1/A/C/23   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 1  | A  | MCC+C  | 26 | M1/A/C/26   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 1  | A  | MCC+C  | 27 | M1/A/C/27   | <i>Klebsiella oxytoca</i> complex.                    |
| 1  | A  | MCC+C  | 28 | M1/A/C/28   | <i>Klebsiella oxytoca</i> complex.                    |
| 1  | A  | MCC+C  | 29 | M1/A/C/29   | <i>Escherichia coli</i> .                             |
| 1  | A  | MCC+M  | 37 | M1/A/MCC/37 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 1  | A  | MCC    | 38 | M1/A/MCC/38 | <i>Escherichia coli</i>                               |
| 1  | A  | MCC    | 39 | M1/A/MCC/39 | <i>Enterobater roggenkampii</i>                       |
| 1  | A  | MCC    | 40 | M1/A/MCC/40 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 2  | A  | MCC+C  | 25 | M2/A/C/25   | <i>Serratia marcescens</i> .                          |
| 2  | A  | MCC+C  | 29 | M2/A/C/29   | <i>Escherichia coli</i>                               |
| 2  | A  | MCC+C  | 30 | M2/A/C/30   | <i>Escherichia coli</i>                               |
| 2  | A  | MCC+C  | 34 | M2/A/C/34   | <i>Klebsiella pasteurii</i>                           |
| 2  | A  | MCC+C  | 35 | M2/A/C/35   | <i>Escherichia coli</i>                               |
| 2  | A  | MCC+C  | 36 | M2/A/C/36   | <i>Escherichia coli</i>                               |
| 2  | A  | MCC    | 39 | M2/A/MCC/39 | <i>Escherichia coli</i>                               |
| 2  | A  | MCC    | 40 | M2/A/MCC/40 | <i>Citrobacter freundii</i> complex.                  |
| 2  | A  | MCC    | 41 | M2/A/MCC/41 | <i>Enterobacter</i> sp.                               |
| 2  | A  | MCC    | 42 | M2/A/MCC/42 | <i>Enterobacter</i> sp.                               |
| 2  | A  | MCC    | 43 | M2/A/MCC/43 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 3  | A  | MCC+M  | 3  | M3/A/M/3    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> |
| 3  | A  | MCC+M  | 4  | M3/A/M/4    | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 3  | A  | MCC+C  | 20 | M3/A/C/20   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |
| 3  | A  | MCC+C  | 21 | M3/A/C/21   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.                 |

**NM:** número de muestreo, **TM:** tipo de muestra, **NA:** número de aislamiento, **CA:** código de aislamiento, **A:** afluente, **E:** efluente, **MCC:** agar MacConkey, **MCC+C:** agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (4 µg/ml), **MCC+M:** agar MacConkey suplementado con meropenem (2 µg/ml), **FW:** filtro Whatman, **Nota 1:** en celeste se indican aislados identificados mediante MALDI-TOF, en amarillo se indican aislados identificados mediante secuenciación tipo Sanger del gen *ARNr16S*, y en verde aislados identificados mediante SGC, **Nota 2:** las bacterias sin color fueron identificadas con pruebas bioquímicas convencionales.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 5B.** Distribución por muestreo de *Enterobacterales* de las familias *Enterobacteriaceae* y *Morganellaceae* aislados desde AS (Continuación).

| NM | TM | Origen | NA | CA          | Identificación                            |
|----|----|--------|----|-------------|-------------------------------------------|
| 3  | A  | MCC+C  | 22 | M3/A/C/22   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.     |
| 3  | A  | MCC+C  | 23 | M3/A/C/23   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.     |
| 3  | A  | MCC    | 43 | M3/A/MCC/43 | <i>Klebsiella aerogenes</i>               |
| 3  | A  | MCC    | 44 | M3/A/MCC/44 | <i>Klebsiella aerogenes</i>               |
| 3  | A  | MCC    | 45 | M3/A/MCC/45 | <i>Klebsiella oxytoca</i> complex.        |
| 3  | A  | MCC    | 46 | M3/A/MCC/46 | <i>Enterobacter cloacae</i> complex.      |
| 3  | A  | MCC    | 47 | M3/A/MCC/47 | <i>Klebsiella oxytoca</i> complex.        |
| 3  | A  | MCC    | 48 | M3/A/MCC/48 | <i>Klebsiella oxytoca</i> complex.        |
| 3  | A  | MCC    | 49 | M3/A/MCC/49 | <i>Klebsiella oxytoca</i> complex.        |
| 3  | A  | MCC    | 50 | M3/A/MCC/50 | <i>Proteus vulgaris</i> .                 |
| 3  | A  | MCC    | 51 | M3/A/MCC/51 | <i>Enterobacter</i> sp.                   |
| 3  | A  | MCC    | 52 | M3/A/MCC/52 | <i>Proteus vulgaris</i>                   |
| 3  | E  | MCC    | FW | M3/E/MCC/FW | <i>Enterobater asburiae</i>               |
| 4  | A  | MCC+C  | 17 | M4/A/C/17   | <i>Klebsiella pneumoniae</i> complex.     |
| 4  | A  | MCC+C  | 18 | M4/A/C/18   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC+C  | 19 | M4/A/C/19   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC+C  | 20 | M4/A/C/20   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC+C  | 21 | M4/A/C/21   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC+C  | 26 | M4/A/C/26   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC+C  | 27 | M4/A/C/27   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC+C  | 29 | M4/A/C/29   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC+C  | 32 | M4/A/C/32   | <i>Citrobacter freundii</i> sensu stricto |
| 4  | A  | MCC+C  | 41 | M4/A/C/41   | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | A  | MCC    | 49 | M4/A/MCC/49 | <i>Escherichia coli</i>                   |
| 4  | E  | MCC    | FW | M4/E/MCC/FW | <i>Enterobater asburiae</i>               |

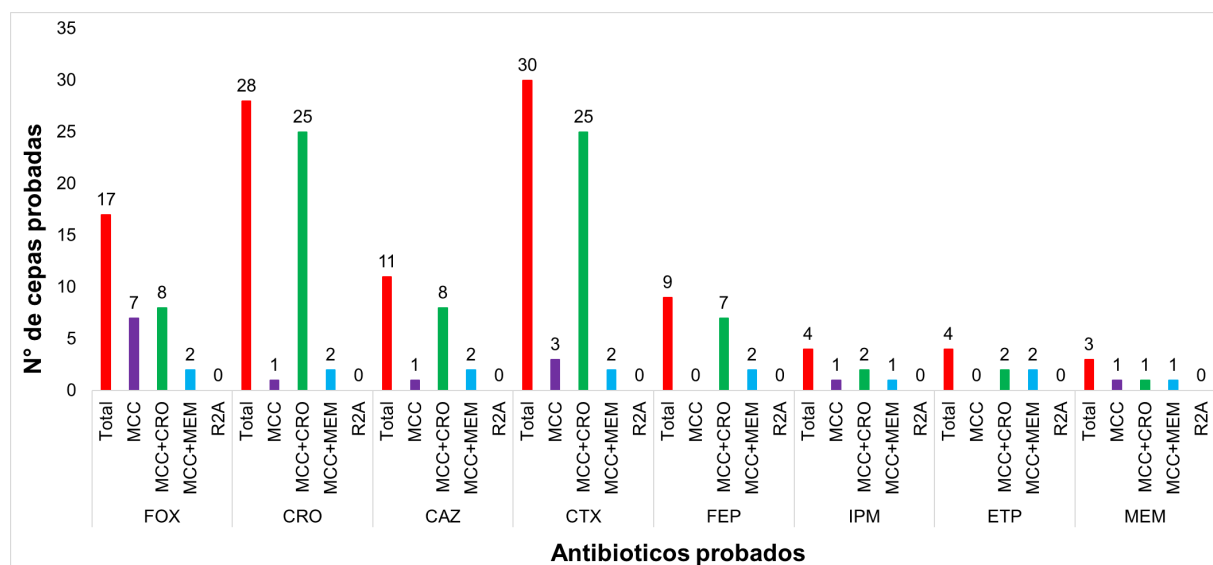
**NM:** número de muestreo, **TM:** tipo de muestra, **NA:** número de aislamiento, **CA:** código de aislamiento, **A:** afluente, **E:** efluente, **MCC:** agar MacConkey, **MCC+C:** agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (4 µg/ml), **MCC+M:** agar MacConkey suplementado con meropenem (2 µg/ml), **FW:** filtro Whatman, **Nota 1:** en celeste se indican aislados identificados mediante MALDI-TOF, y en amarillo se indican aislados identificados mediante secuenciación tipo Sanger del gen *ARNr16S*. **Nota 2:** las bacterias sin color fueron identificadas con pruebas bioquímicas convencionales.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.3. Susceptibilidad a antibióticos de cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.

#### 3.3.1. Prevalencia de *Enterobacterales* resistentes a antibióticos.

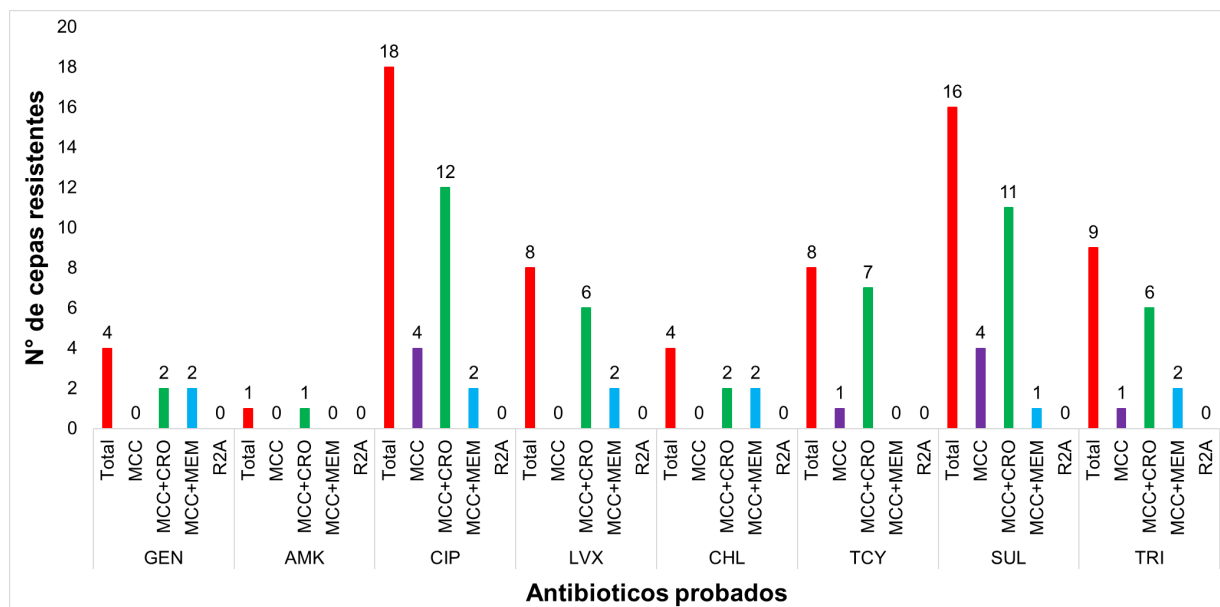
A partir de los resultados de los antibiogramas realizados a los 48 *Enterobacterales* aisladas de AF, se observó que en el caso de los  $\beta$ -lactámicos, los mayores números de cepas resistentes, fueron 30 frente a CTX, y 28 frente a CRO (**Figura 32A**). Mientras que, en el caso de los compuestos no  $\beta$ -lactámicos, los mayores números de cepas resistentes fueron 18 frente a CIP, y 16 frente a SUL (**Figura 32B**). Por el contrario, en EF solo se encontró resistencia a FOX, CRO y CTX (**Figura 33**).



**Figura 32A. Distribución de cepas de *Enterobacterales* resistentes a antibacterianos  $\beta$ -lactámicos aisladas de AF.**

**FOX:** cefoxitina, **CRO:** ceftriaxona, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** cefepima, **IPM:** imipenem, **ETP:** ertapenem, **MEM:** meropenem, **MCC:** agar MacConkey, **MCC+CRO:** agar MacConkey suplementado con CRO (4  $\mu$ /ml), **MCC+MEM:** agar MacConkey suplementado con MEM (2  $\mu$ /ml). **Nota 1:** Sobre las barras rojas se indican los números totales de cepas que son resistentes a los respectivos antibacterianos representados en el eje x. **Nota 2:** Sobre las barras moradas, verdes, y celestes se indican los números de cepas que son resistentes a los antibióticos declarados en el eje x, disgregados de acuerdo con los medios de cultivo originarios indicados en el mismo eje.

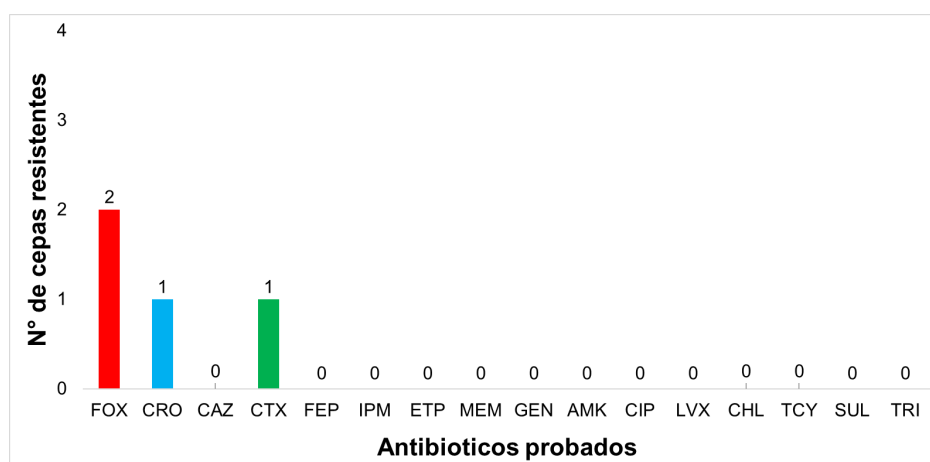
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 32B. Distribución de cepas de *Enterobacteriales* resistentes a antibacterianos no  $\beta$ -lactámicos aisladas de AF.**

**GEN:** gentamicina, **AMK:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacino, **LVX:** levofloxacino, **CHL:** cloranfenicol, **TCY:** tetraciclina, **SUL:** sulfonamida, **TRI:** trimetoprim, **MCC:** agar MacConkey, **MCC+CRO:** agar MacConkey suplementado con CRO (4  $\mu$ /ml), **MCC+MEM:** agar MacConkey suplementado con MEM (2  $\mu$ /ml). **Nota 1:** Sobre las barras rojas se indican los números totales de cepas que son resistentes a los respectivos antibacterianos representados en el eje x. **Nota 2:** Sobre las barras moradas, verdes, y celestes se indican los números de cepas que son resistentes a los antibióticos declarados en el eje x, disgregados de acuerdo con los medios de cultivo originarios indicados en el mismo eje.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 33. Distribución de cepas de *Enterobacteriales* resistentes a antibacterianos aisladas de EF.**

**FOX:** cefoxitina, **CRO:** ceftriaxona, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** cefepima, **IPM:** imipenem, **ETP:** ertapenem, **MEM:** meropenem, **GEN:** gentamicina, **AMK:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacino, **LVX:** levofloxacino, **CHL:** cloranfenicol, **TCY:** tetraciclina, **SUL:** sulfonamida, **TRI:** trimetoprim. **Nota:** Sobre las barras de colores se indican los números de aislados resistentes a los antibióticos declarados en el eje x.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.3.2. Perfiles de resistencia antibiótica e índice de multirresistencia (MAR) a los antibióticos.

En AF se registraron 7 cepas con índices MAR > 0,5, correspondientes a; *K. pneumoniae* complex M3/A/C/23 (0,56), *E. coli* M4/A/C/19 (0,56) (resistentes a 9 antibióticos), *E. coli* M2/A/C/36 (0,63), *K. pneumoniae* complex M4/A/C/17 (0,63), y *C. freundii* s.str. M4/A/C/32 (0,63) (resistentes a 10 antibióticos), *K. pneumoniae* complex M3/A/M/4 (0,75) (resistente a 12 antibióticos), y *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 (0,81) resistente a 13 antibióticos). Por otra parte, cabe mencionar que se detectaron 8 cepas que, de acuerdo con Jiménez-Pearson et al. (2019), pueden ser clasificadas como MDR, (**Tablas 6A y 6B**). Los perfiles de resistencia en EF se encuentran en la **Tabla 7**.

Los perfiles de resistencia de las cepas de AF mencionadas anteriormente, pese a ser los más diversos en cuanto a los tipos de antibióticos para los cuales fueron resistentes, no se repitieron en otras cepas. Por otra parte, los perfiles “CRO-CTX”, “CRO-CTX-FEP”, y “FOX”, fueron los prevalentes, encontrándose en 5 y 3 cepas, respectivamente. (**Tablas 6A, 6B, y 8**).



**Tabla 6A.** Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de *Enterobacterales* aisladas de AF de AS.

| Cepa                                                   | Antibiotipo                                                | NAR       | TP         | MAR         |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|-----------|------------|-------------|
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/18                 | FOX-CIP                                                    | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/23                 | FOX-CRO-CAZ-CTX-CIP                                        | 5         | NA         | 0,31        |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/26                 | CRO-CTX-GEN-SUL                                            | 4         | NA         | 0,25        |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/27                    | CRO-CTX-CIP-SUL                                            | 4         | NA         | 0,25        |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/28                    | FOX-CRO-CTX-CIP-SUL                                        | 5         | NA         | 0,31        |
| <i>E. coli</i> M1/A/C/29                               | CRO-CTX-FEP                                                | 3         | NA         | 0,19        |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/37               | STA                                                        | 0         | NA         | 0           |
| <i>E. coli</i> M1/A/MCC/38                             | TCY-SUL-TRI                                                | 3         | NA         | 0,19        |
| <i>E. roggenkampii</i> M1/A/MCC/39                     | FOX-CTX                                                    | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/40               | STA                                                        | 0         | NA         | 0           |
| <i>S. marcescens</i> M2/A/C/25                         | FOX-CRO-CAZ-CTX-IPM                                        | 5         | NA         | 0,31        |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/29                               | CRO-CTX-TCY                                                | 3         | NA         | 0,19        |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/30                               | CRO-CTX-FEP                                                | 3         | NA         | 0,19        |
| <i>K. pasteurii</i> M2/A/C/34                          | <b>CRO-CAZ-CTX-MEM-CIP</b>                                 | <b>5</b>  | <b>MDR</b> | <b>0,31</b> |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/35                               | CRO-CTX-TCY-SUL                                            | 4         | NA         | 0,25        |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/36                               | <b>FOX-CRO-CAZ-CTX-CIP-LVX-CHL-TCY-SUL-TRI</b>             | <b>10</b> | <b>MDR</b> | <b>0,63</b> |
| <i>E. coli</i> M2/A/MCC/39                             | STA                                                        | 0         | NA         | 0           |
| <i>C. freundii</i> complex M2/A/MCC/40                 | FOX                                                        | 1         | NA         | 0,06        |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/41                    | STA                                                        | 0         | NA         | 0           |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/42                    | FOX-CTX                                                    | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M2/A/MCC/43               | STA                                                        | 0         | NA         | 0           |
| <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> M3/A/M/3 | <b>FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-IPM-ETP-MEM-GEN-CIP-LVX-CHL-TRI</b> | <b>13</b> | <b>MDR</b> | <b>0,81</b> |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/M/4                  | <b>FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-ETP-GEN-CIP-LVX-CHL-SUL-TRI</b>     | <b>12</b> | <b>MDR</b> | <b>0,75</b> |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/20                 | CRO-CTX-CIP                                                | 3         | NA         | 0,19        |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/21                 | CRO-CTX                                                    | 2         | NA         | 0,13        |

**NAR:** número de antibióticos a los que una cepa es resistente, **MAR:** índice de resistencia antibiótica múltiple, **FOX:** cefoxitina, **CRO:** ceftriaxona, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** cefepima, **IPM:** imipenem, **ETP:** ertapenem, **MEM:** meropenem, **GEN:** gentamicina, **AMK:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacino, **LVX:** levofloxacino, **CHL:** cloranfenicol, **TCY:** tetraciclina, **SUL:** sulfonamida, **TRI:** trimetoprim, **STA:** susceptible a todos los antibióticos. **TP:** tipo de perfil de resistencia antibiótica, **NA:** no aplica, **MDR:** perfil de multirresistencia. **Nota 1:** se consideró la resistencia simultánea a SUL y TRI como equivalente a resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) en la clasificación del tipo de TP de acuerdo con Jiménez-Pearson et al. (2019). **Nota 2:** en negrita se destacan las cepas con perfiles MDR y/o con MAR > 0,5.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 6B.** Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de *Enterobacterales* aisladas de AF de AS (continuación).

| Cepa                                   | Antibiotipo                                    | NAR       | TP         | MAR         |
|----------------------------------------|------------------------------------------------|-----------|------------|-------------|
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/22 | CRO-CAZ-CTX-FEP-SUL-TRI                        | 6         | NA         | 0,38        |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/23 | <b>FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-CIP-LVX-SUL-TRI</b>     | <b>9</b>  | <b>MDR</b> | <b>0,56</b> |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/43        | FOX-CRO-CAZ-CTX                                | 4         | NA         | 0,25        |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/44        | FOX                                            | 1         | NA         | 0,06        |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/45  | STA                                            | 0         | NA         | 0           |
| <i>E. cloacae</i> complex M3/A/MCC/46  | FOX                                            | 1         | NA         | 0,06        |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/47  | CIP                                            | 1         | NA         | 0,06        |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/48  | SUL                                            | 1         | NA         | 0,06        |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/49  | CIP-SUL                                        | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/50         | IPM-MEM-CIP-SUL                                | 4         | NA         | 0,25        |
| <i>Enterobacter</i> sp. M3/A/MCC/51    | FOX-CIP                                        | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/52         | STA                                            | 0         | NA         | 0           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M4/A/C/17 | <b>FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-ETP-CIP-LVX-CHL-SUL</b> | <b>10</b> | <b>NA</b>  | <b>0,63</b> |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/18               | CRO-CTX                                        | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/19               | <b>CRO-CAZ-CTX-FEP-CIP-LVX-TCY-SUL-TRI</b>     | <b>9</b>  | <b>MDR</b> | <b>0,56</b> |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/20               | <b>CRO-CTX-CIP-LVX-TCY-SUL-TRI</b>             | <b>7</b>  | <b>MDR</b> | <b>0,44</b> |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/21               | CRO-CTX                                        | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/26               | CRO-CTX                                        | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/27               | CRO-CTX                                        | 2         | NA         | 0,13        |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/29               | CRO-CTX-FEP                                    | 3         | NA         | 0,19        |
| <i>C. freundii</i> s.str. M4/A/C/32    | <b>FOX-CRO-CTX-IPM-ETP-AMK-GEN-TCY-SUL-TRI</b> | <b>10</b> | <b>MDR</b> | <b>0,63</b> |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/41               | CRO-CTX-CIP-LVX-TCY                            | 5         | NA         | 0,31        |
| <i>E. coli</i> M4/A/MCC/49             | STA                                            | 0         | NA         | 0           |

**NAR:** número de antibióticos a los que una cepa es resistente, **MAR:** índice de resistencia antibiótica múltiple, **FOX:** cefoxitina, **CRO:** ceftriaxona, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** cefepima, **IPM:** imipenem, **ETP:** ertapenem, **MEM:** meropenem, **GEN:** gentamicina, **AMK:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacino, **LVX:** levofloxacino, **CHL:** cloranfenicol, **TCY:** tetraciclina, **SUL:** sulfonamida, **TRI:** trimetoprim, **STA:** susceptible a todos los antibióticos. **TP:** tipo de perfil de resistencia antibiótica, **NA:** no aplica, **MDR:** perfil de multirresistencia. **Nota 1:** se consideró la resistencia simultánea a SUL y TRI como equivalente a resistencia a sulfametoxazol-trimetoprim (SXT) en la clasificación del tipo de TP de acuerdo con Jiménez-Pearson et al. (2019). **Nota 2:** en negrita se destacan las cepas con perfiles MDR y/o con MAR > 0,5.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 7.** Perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de *Enterobacterales* aisladas de EF de AS.

| Cepa                           | Antibiotipo | NAR | TP | MAR  |
|--------------------------------|-------------|-----|----|------|
| <i>E. asburiae</i> M3/E/MCC/FW | FOX         | 1   | NA | 0,06 |
| <i>E. asburiae</i> M4/E/MCC/FW | FOX-CRO-CTX | 3   | NA | 0,19 |

**NAR:** número de antibióticos a los que una cepa es resistente, **MAR:** índice de resistencia antibiótica múltiple, **FOX:** cefoxitina, **CRO:** ceftriaxona, **CTX:** cefotaxima, **TP:** tipo de perfil de resistencia antibiótica, **NA:** no aplica.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 8.** Prevalencia de perfiles de resistencia a antibióticos de cepas de *Enterobacterales* aisladas de AF de AS.

| Antibiotipo                                         | NAR | NC | CP                                                                                                                                                     |
|-----------------------------------------------------|-----|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-IPM-ETP-MEM-GEN-CIP-LVX-CHL-TRI | 13  | 1  | <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> M3/A/M/3                                                                                                 |
| FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-ETP-GEN-CIP-LVX-CHL-SUL-TRI     | 12  | 1  | <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/M/4                                                                                                                  |
| FOX-CRO-CAZ-CTX-CIP-LVX-CHL-TCY-SUL-TRI             | 10  | 1  | <i>E. coli</i> M2/A/C/36                                                                                                                               |
| FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-ETP-CIP-LVX-CHL-SUL             | 10  | 1  | <i>K. pneumoniae</i> complex M4/A/C/17                                                                                                                 |
| FOX-CRO-CTX-IPM-ETP-GEN-AMK-TCY-SUL-TRI             | 10  | 1  | <i>C. freundii</i> s.str. M4/A/C/32                                                                                                                    |
| FOX-CRO-CAZ-CTX-FEP-CIP-LVX-SUL-TRI                 | 9   | 1  | <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/23                                                                                                                 |
| CRO-CAZ-CTX-FEP-CIP-LVX-TCY-SUL-TRI                 | 9   | 1  | <i>E. coli</i> M4/A/C/19                                                                                                                               |
| CRO-CTX-CIP-LVX-TCY-SUL-TRI                         | 7   | 1  | <i>E. coli</i> M4/A/C/20                                                                                                                               |
| CRO-CAZ-CTX-FEP-SUL-TRI                             | 6   | 1  | <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/22                                                                                                                 |
| FOX-CRO-CAZ-CTX-CIP                                 | 5   | 1  | <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/23                                                                                                                 |
| FOX-CRO-CTX-CIP-SUL                                 | 5   | 1  | <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/28                                                                                                                    |
| FOX-CRO-CAZ-CTX-IPM                                 | 5   | 1  | <i>S. marcescens</i> M2/A/C/25                                                                                                                         |
| CRO-CAZ-CTX-MEM-CIP                                 | 5   | 1  | <i>K. pasteurii</i> M2/A/C/34                                                                                                                          |
| CRO-CTX-GEN-SUL                                     | 4   | 1  | <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/26                                                                                                                 |
| CRO-CTX-CIP-SUL                                     | 4   | 1  | <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/27                                                                                                                    |
| CRO-CTX-TCY-SUL                                     | 4   | 1  | <i>E. coli</i> M2/A/C/35                                                                                                                               |
| FOX-CRO-CAZ-CTX                                     | 4   | 1  | <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/43                                                                                                                        |
| IPM-MEM-CIP-SUL                                     | 4   | 1  | <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/50                                                                                                                         |
| CRO-CTX-FEP                                         | 3   | 3  | <i>E. coli</i> M1/A/C/29<br><i>E. coli</i> M2/A/C/30<br><i>E. coli</i> M4/A/C/29                                                                       |
| TCY-SUL-TRI                                         | 3   | 1  | <i>E. coli</i> M1/A/MCC/38                                                                                                                             |
| CRO-CTX-TCY                                         | 3   | 1  | <i>E. coli</i> M2/A/C/29                                                                                                                               |
| CRO-CTX-CIP                                         | 3   | 1  | <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/20                                                                                                                 |
| FOX-CIP                                             | 2   | 2  | <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/18<br><i>Enterobacter</i> sp. M3/A/MCC/51                                                                          |
| FOX-CTX                                             | 2   | 2  | <i>E. roggenkampii</i> M1/A/MCC/39<br><i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/42                                                                              |
| CRO-CTX                                             | 2   | 5  | <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/21<br><i>E. coli</i> M4/A/C/18<br><i>E. coli</i> M4/A/C/21<br><i>E. coli</i> M4/A/C/26<br><i>E. coli</i> M4/A/C/27 |
| CIP-SUL                                             | 2   | 1  | <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/49                                                                                                                  |
| FOX                                                 | 1   | 3  | <i>C. freundii</i> complex M2/A/MCC/40<br><i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/44<br><i>E. cloacae</i> complex M3/A/MCC/46                                     |
| CIP                                                 | 1   | 1  | <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/47                                                                                                                  |
| SUL                                                 | 1   | 1  | <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/48                                                                                                                  |

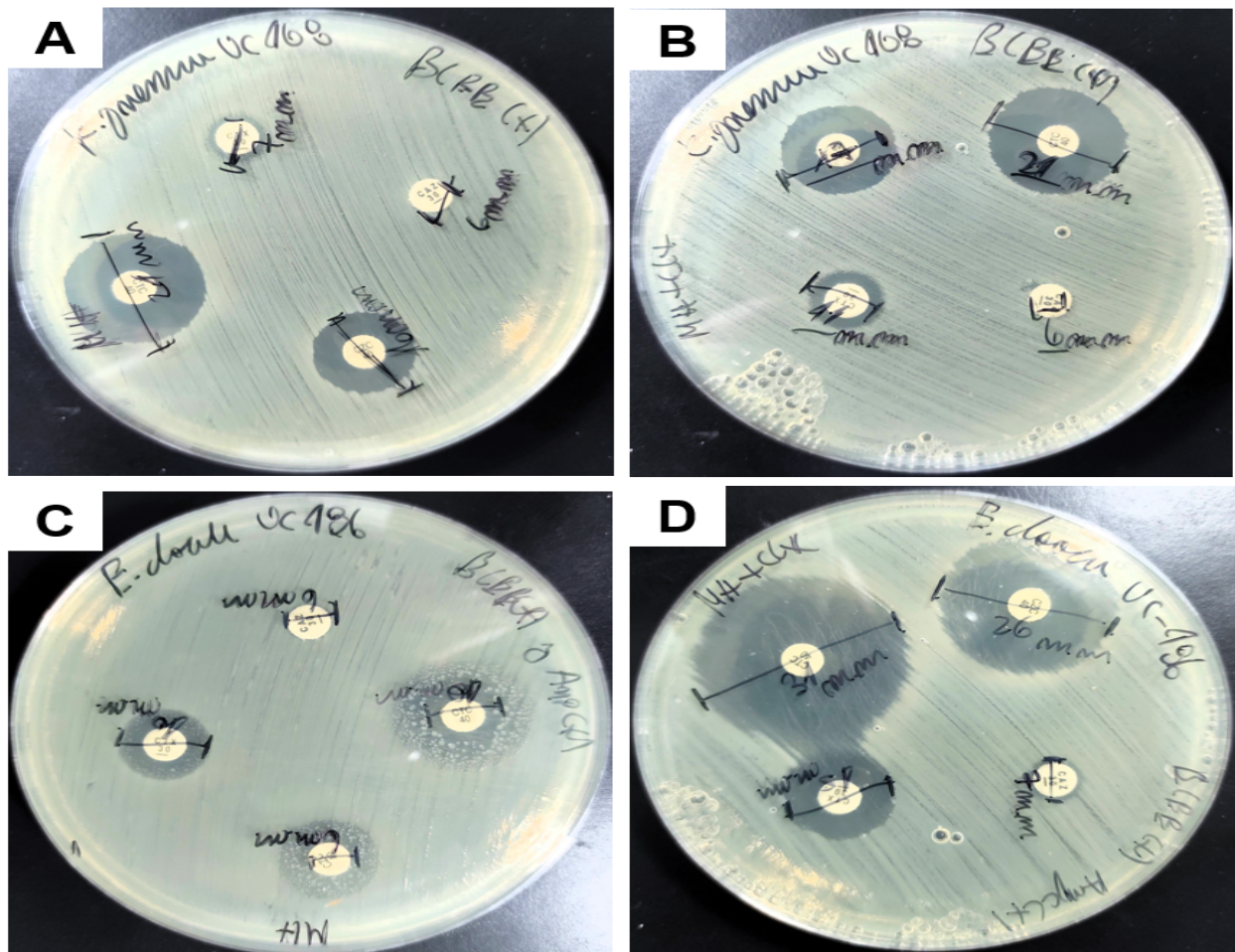
**NAR:** n° de antibióticos a los que una cepa es resistente, **NC:** n° de bacterias que presentan un antibiotipo, **CP:** cepas portadoras de un antibiotipo, **FOX:** cefoxitina, **CRO:** ceftaxona, **CAZ:** ceftazidima, **CTX:** cefotaxima, **FEP:** cefepima, **IPM:** imipenem, **ETP:** ertapenem, **MEM:** meropenem, **GEN:** gentamicina, **AMK:** amikacina, **CIP:** ciprofloxacino, **LVX:** levofloxacino, **CHL:** cloranfenicol, **TCY:** tetraciclina, **SUL:** sulfonamida, **TRI:** trimetoprim, **Nota:** en amarillo se indican los perfiles de resistencia prevalentes entre las cepas y en rojo los más extensos.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.4. Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.

#### 3.4.1. Detección de BLEE.

De 48 cepas recuperadas de AF, 23 fueron positivas para BLEE, y de estas últimas, se encontraron 4 coproduciendo BLEE y AmpC. (Tablas 9A y 9B). En EF sólo se recuperó una cepa productora de BLEE (Tabla 10). En la Figura 34 se presentan los controles de calidad empleados.



**Figura 34. Controles de calidad usados para detección fenotípica de BLEE y AmpC.**  
**A:** *K. pneumoniae* UCO168 (BLEE<sup>+</sup>) sin cloxacilina (CLX), **B:** *K. pneumoniae* UCO168 (BLEE<sup>+</sup>) con de CLX, **C:** *E. cloacae* UCO186 (BLEE<sup>+</sup> y AmpC<sup>+</sup>) sin CLX, **D:** *E. cloacae* UCO186 (BLEE<sup>+</sup> y AmpC<sup>+</sup>) con CLX.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 9A.** Detección de BLEE y AmpC en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AF.

| Cepa                                                   | BLEE | BLEE y AmpC |
|--------------------------------------------------------|------|-------------|
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/18                 | -    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/23                 | +    | +           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/26                 | +    | -           |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/27                    | +    | +           |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/28                    | +    | +           |
| <i>E. coli</i> M1/A/C/29                               | +    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/37               | -    | -           |
| <i>E. coli</i> M1/A/MCC/38                             | -    | -           |
| <i>E. roggenkampii</i> M1/A/MCC/39                     | -    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/40               | -    | -           |
| <i>S. marcescens</i> M2/A/C/25                         | -    | -           |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/29                               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/30                               | +    | -           |
| <i>K. pasteurii</i> M2/A/C/34                          | -    | -           |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/35                               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/36                               | -    | -           |
| <i>E. coli</i> M2/A/MCC/39                             | -    | -           |
| <i>C. freundii</i> complex M2/A/MCC/40                 | -    | -           |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/41                    | -    | -           |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/42                    | -    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M2/A/MCC/43               | -    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> M3/A/M/3 | -    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/M/4                  | +    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/20                 | +    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/21                 | +    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/22                 | +    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/23                 | +    | -           |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/43                        | -    | -           |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/44                        | -    | -           |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/45                  | -    | -           |
| <i>E. cloacae</i> complex M3/A/MCC/46                  | -    | -           |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/47                  | -    | -           |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/48                  | -    | -           |

Fuente: Elaboración propia

**Tabla 9B.** Detección de BLEE y AmpC en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AF. (continuación).

| Cepa                                   | BLEE | BLEE y AmpC |
|----------------------------------------|------|-------------|
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/49  | -    | -           |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/50         | -    | -           |
| <i>Enterobacter</i> sp. M3/A/MCC/51    | -    | -           |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/52         | -    | -           |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M4/A/C/17 | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/18               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/19               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/20               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/21               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/26               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/27               | +    | -           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/29               | +    | -           |
| <i>C. freundii</i> s.str. M4/A/C/32    | +    | +           |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/41               | +    | +           |
| <i>E. coli</i> M4/A/MCC/49             | -    | -           |

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 10.** Detección de BLEE y AmpC en cepas de *Enterobacterales* aisladas de EF.

| Cepa                           | BLEE | BLEE y AmpC |
|--------------------------------|------|-------------|
| <i>E. asburiae</i> M3/E/MCC/FW | -    | -           |
| <i>E. asburiae</i> M4/E/MCC/FW | +    | -           |

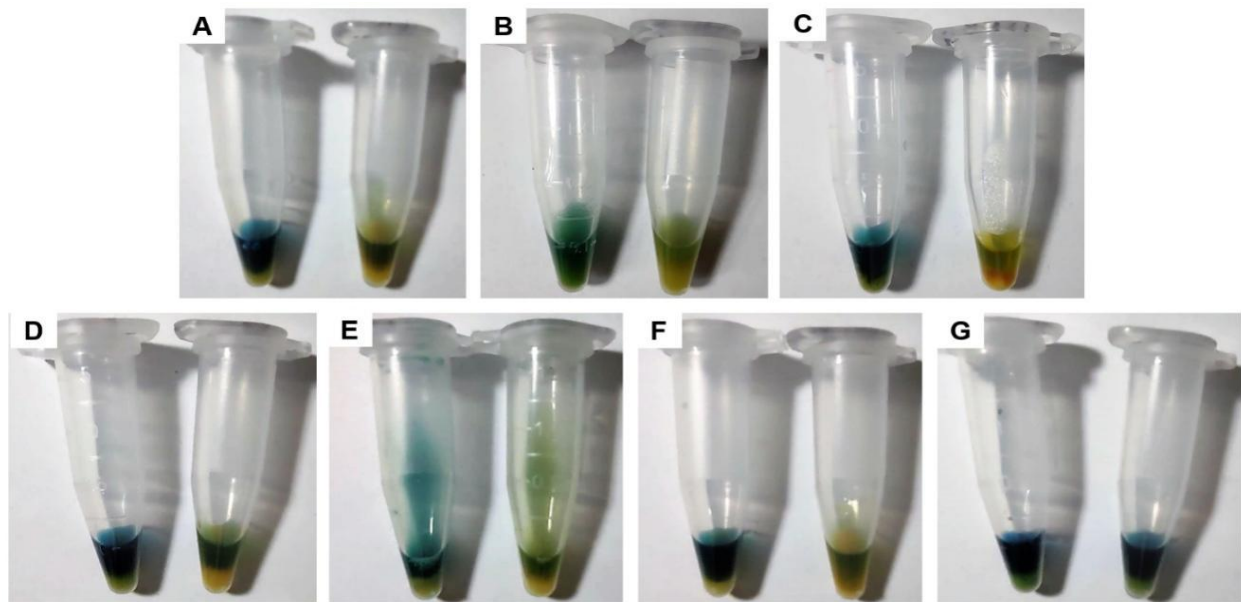
Fuente: Elaboración propia.

### 3.4.2. Detección de carbapenemasas.

Al realizar la prueba colorimétrica *Blue Carba* a las 48 cepas procedentes de AF, 3 de éstas resultaron ser productoras de carbapenemasas, correspondiendo a *K. pasteurii* M2/A/C/34, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 y *C. freundii* s.str. M4/A/C/32. Por otro lado, cabe destacar que de las de 4 cepas halladas resistentes a IPM, hubieron 2, correspondientes a *S. marcescens* M2/A/C/25, y *P. vulgaris* M3/A/MCC/50 ( esta última también resistente a MEM), las cuales resultaron no productoras de carbapenemasas. En la **Figura 35** se muestran las reacciones colorimétricas al realizar el test a las cepas en estudio, y a las cepas empleadas como controles de calidad. En el caso de las cepas obtenidas desde el EF, no se detectó producción de carbapenemasas.

En la **Figura 36** se indican los resultados obtenidos al realizar la prueba *NG-Test® CARBA-5* a las 3 cepas productoras de carbapenemasa detectadas anteriormente. Se puede visualizar que en todas cepas se detectó la enzima tipo KPC coincidiendo con la banda obtenida en la cepa de *E. coli* UCO327 (KPC<sup>+</sup>) utilizada como control positivo.

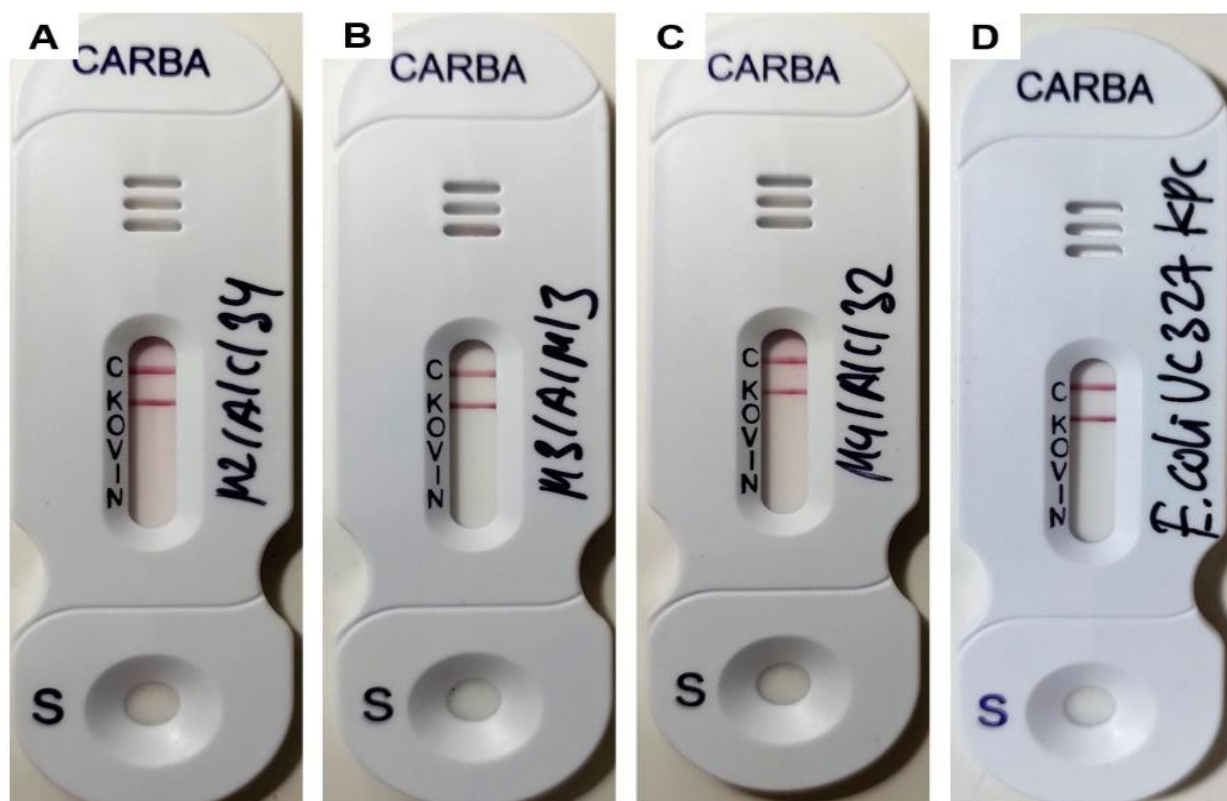




**Figura 35. Detección de carbapenemasas mediante *Blue Carba* en cepas de *Enterobacteriales* aisladas de AF.**

**A:** *K. pasteurii* M2/A/C/34, **B:** *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 **C:** *C. freundii* s.str. M4/A/C/32, **D:** *K. pneumoniae* UCO368 (KPC<sup>+</sup>), **E:** *K. pneumoniae* UCO361 (NDM<sup>+</sup>), **F:** *K. pneumoniae* UCO322 (OXA-48-like<sup>+</sup>), **G:** *E. coli* ATCC 25922 (no productora de carbapenemasas).

Fuente: Elaboración propia.



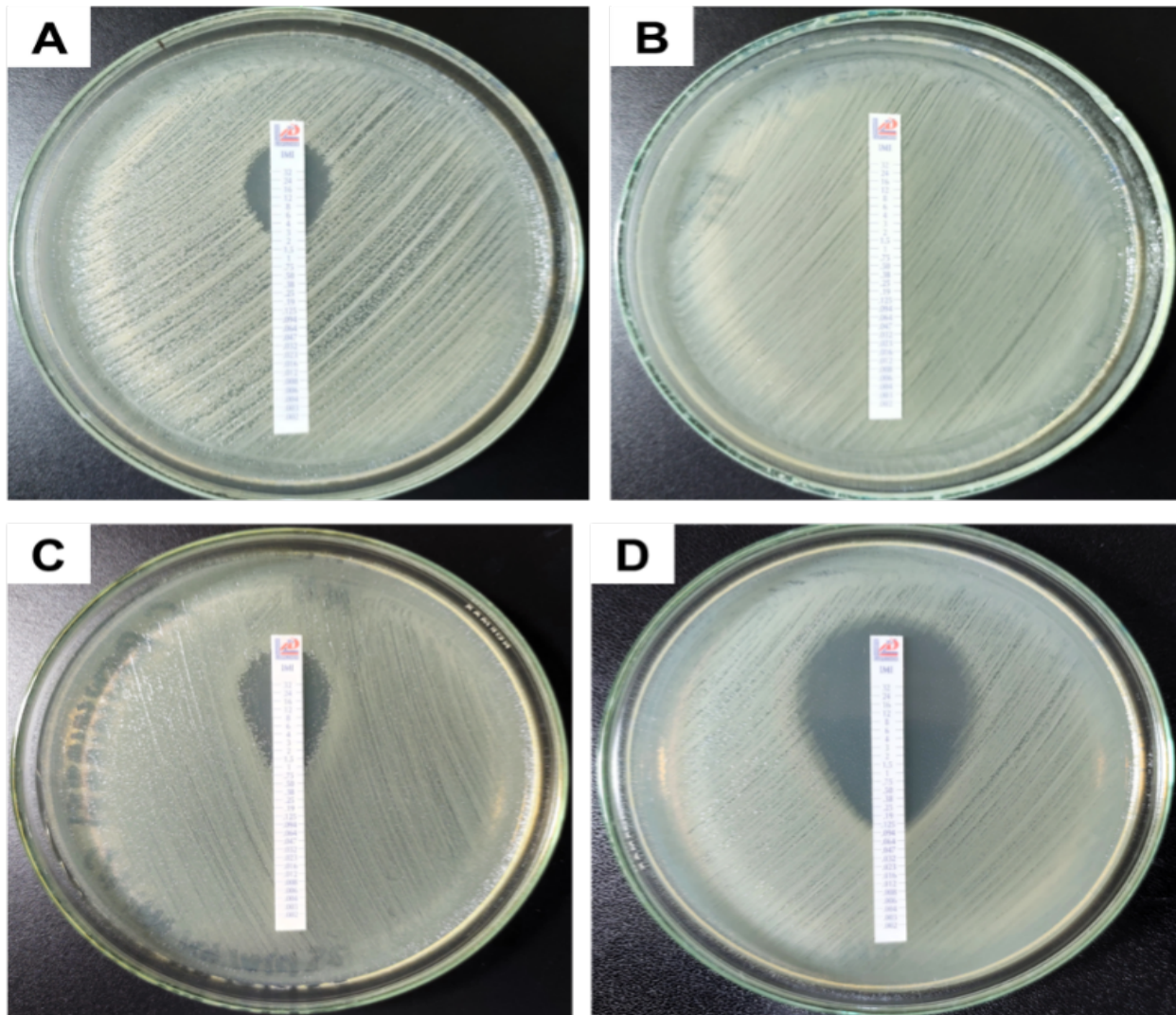
**Figura 36. Identificación de carbapenemasas mediante NG-Test® CARBA-5 en cepas de *Enterobacteriales* aisladas de AF.**

**A:** *K. pasteurii* M2/A/C/34, **B:** *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 **C:** *C. freundii* s.str. **D:** *E. coli* UCO327 (KPC<sup>+</sup>).

Fuente: Elaboración propia.

### 3.5. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de Imipenem (IPM) sobre cepas de *Enterobacterales* productores de carbapenemasas.

Los valores de MIC para IPM fueron 4 µg/ml,  $\geq 32$  µg/ml y 4 µg/ml para *K. pasteurii* M2/A/C/34, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, y *C. freundii* s.str. M4/A/C/32 respectivamente (**Figura 37**).



**Figura 37. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) a IPM en cepas de *Enterobacterales* productoras de carbapenemasas.**

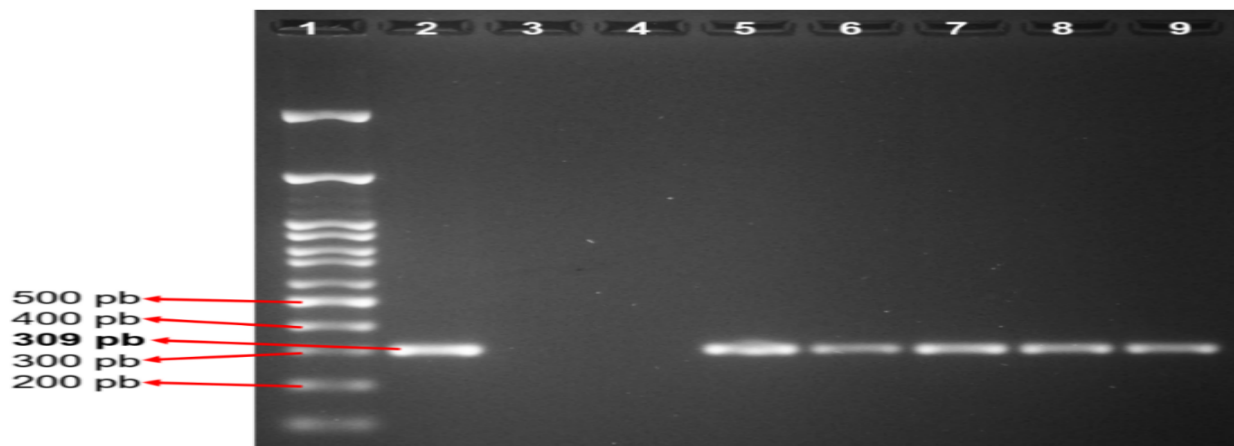
**A:** *K. pasteurii* M2/A/C/34, **B:** *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, **C:** *C. freundii* s.str M4/A/C/32, **D:** *E. coli* ATCC25922 (cepa no productora de carbapenemasas).

Fuente: Elaboración propia.

### 3.6. Detección e identificación de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.

#### 3.6.1. Detección molecular de *bla*<sub>SHV</sub> de espectro extendido.

La investigación de *bla*<sub>SHV</sub>, determinó que dicho gen se encontró en 7 cepas, todas procedentes de AF del total de 50 cepas ensayadas. En las **Figuras 38A** y **38B** puede visualizarse que las cepas de los carriles 5-9 (**Figura 38A**) y los carriles 5-6 (**Figura 38B**), presentan el producto de amplificación de 309 pb, coincidente con el de la cepa control (carril 2). Posteriormente, al someter a estos productos de amplificación a digestión enzimática con *NheI*, se encontró que sólo en una de las 7 cepas, la cepa *K. pneumoniae* complex M1/A/C/23, se visualizó los dos productos obtenidos de la digestión enzimática de 863 y 214 bp, al igual que la cepa control que porta el gen *bla*<sub>SHV-3</sub><sup>+</sup> (carril 2, **Figura 39**), que corresponde a una variante de espectro extendido. Sin embargo, la SGC de la cepa *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 permitió detectar las variantes *bla*<sub>SHV-11</sub> y *bla*<sub>SHV-67</sub>, siendo esta última una BLEE. (**Tabla 12**).

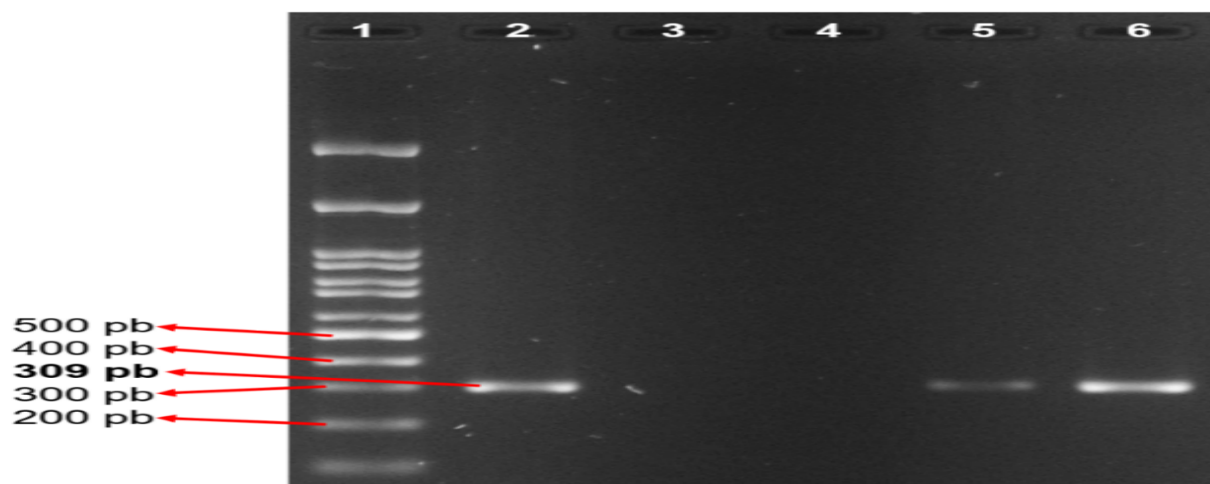


**Figura 38A. Detección molecular de *bla*<sub>SHV</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**carril 1:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO168 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC25923 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *K. pneumoniae* complex M1/A/C/23, **carril 6:** *K. pneumoniae* complex M3/A/M/4, **carril 7:** *K. pneumoniae* complex M3/A/C/22, **carril 8:** *K. pneumoniae* complex M3/A/C/23, **carril 9:** *K. pneumoniae* complex M4/A/C/17, **pb:** pares de bases. **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

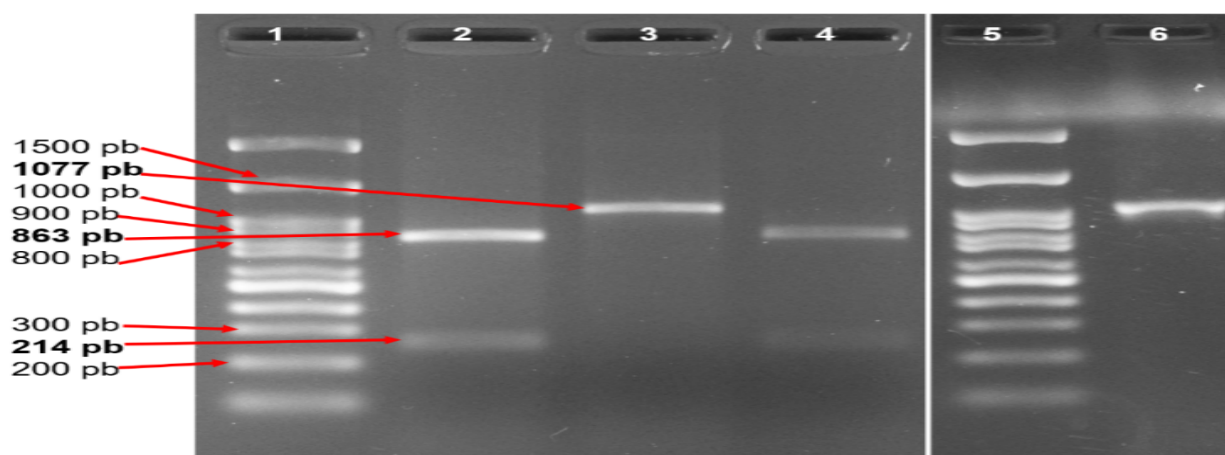




**Figura 38B. Detección molecular de *bla*<sub>SHV</sub> en cepas de *Enterobacteriales* aisladas de AS. (Continuación).**

**carril 1:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO168 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC25923 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *K. pneumoniae* M2/A/MCC/43, **carril 6:** *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, **pb:** pares de bases. **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 39. Digestión enzimática con *NheI* de cepa *K. pneumoniae* complex M1/A/C/23.**

**Carriles 1 y 5:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen). **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO182 (*bla*<sub>SHV-3</sub><sup>+</sup> digerida), **carril 3:** *K. pneumoniae* UCO168 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>+</sup>), **carril 4:** *K. pneumoniae* complex M1/A/C/23 (digerida), **carril 6:** *K. pneumoniae* UCO182 (*bla*<sub>SHV-3</sub><sup>+</sup> sin digerir), **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio y los fragmentos generados de la digestión.

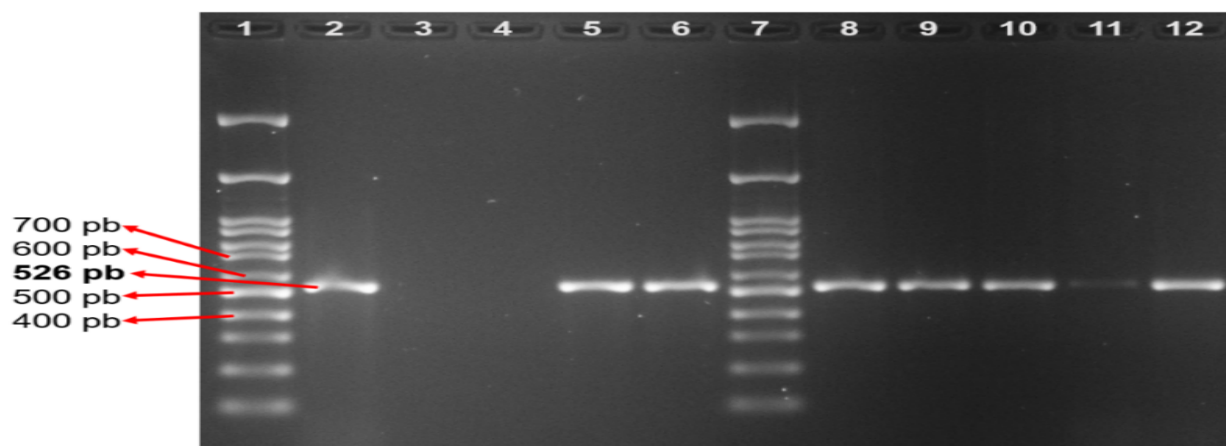
Fuente: Elaboración propia.

La secuenciación tipo Sanger confirmó la detección molecular de *bla*<sub>SHV</sub> en *K. pneumoniae* complex M1/A/C/23. No obstante, la obtención de la secuencia aminoacídica (SA) de dicha cepa en la base de datos *BLDB* (Naas et al., 2017), produjo porcentajes de identidad insatisfactorios para efectuar filogenia. Por ende, no pudo ser establecida la variante enzimática.

### **3.6.2. Detección molecular de *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido.**

La investigación de *bla*<sub>TEM</sub> determinó que dicho gen se encontró en 8 cepas en un total de 50, siendo todas procedentes de AF de igual manera que con *bla*<sub>SHV</sub>. (**Figura 40**). La secuenciación tipo Sanger confirmó la detección molecular de dicho gen.

Los análisis filogenéticos, efectuados en *IQ-TREE* v2.1.2 (Minh et al., 2020), concluyeron que la SA de las betalactamasas tipo TEM de las cepas *E. coli* M2/A/C/29 y *E. coli* M4/A/C/19 son filogenéticamente próximas a TEM-82 ( $\beta$ -lactamasa de amplio espectro (BLEA)) y TEM-49 ( $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE)). Mientras que la filogenia de la secuencia tipo TEM de la cepa *E. coli* M4/A/C/26 no estableció relación con ninguna variante. En las **Figuras 41, 42, y 43** se indican las filogenias respectivas.



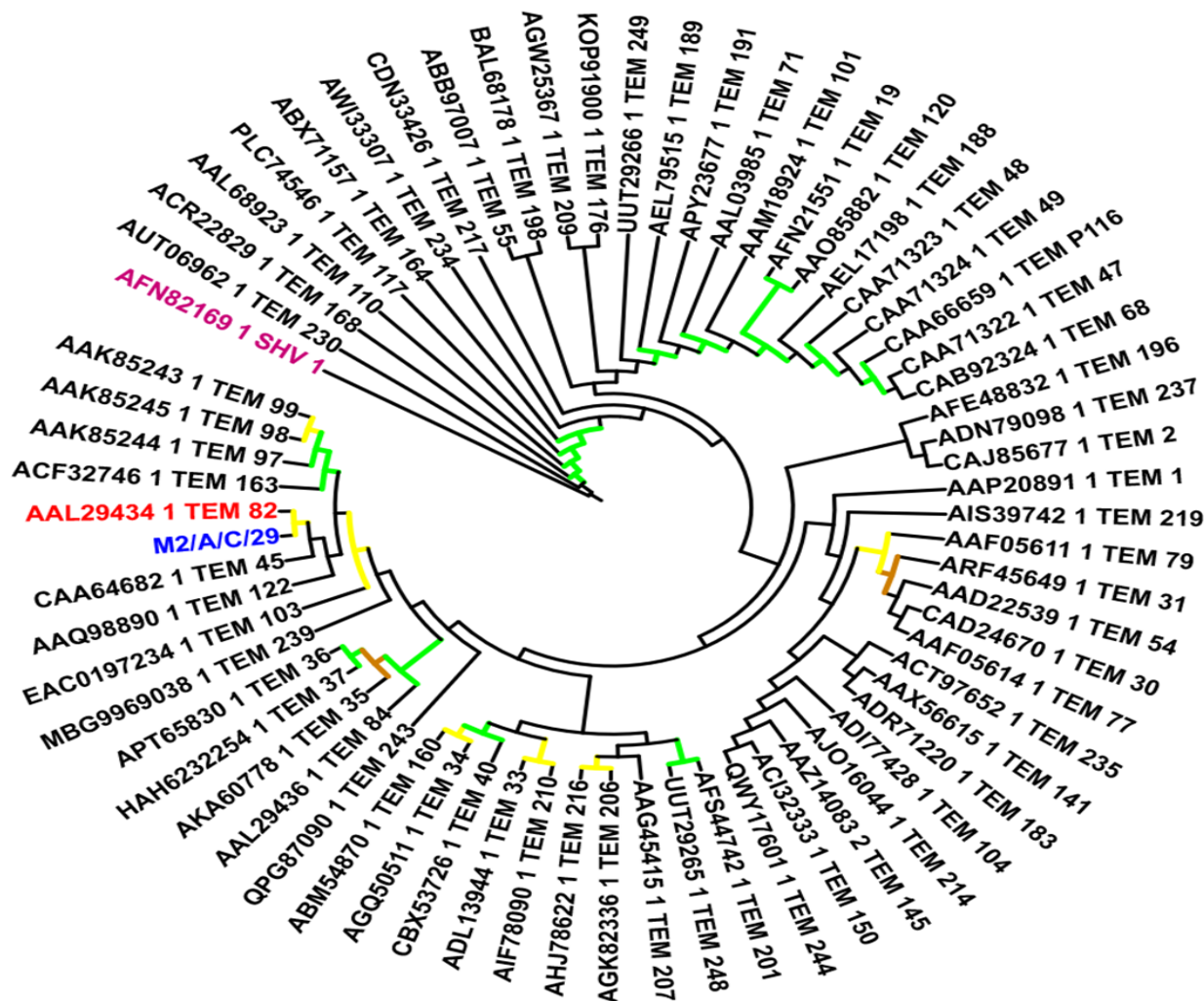
**Figura 40. Detección molecular de *bla*<sub>TEM</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**Carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO168 (*bla*<sub>TEM</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC25923 (*bla*<sub>TEM</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *E. coli* M2/A/C/29, **carril 6:** *E. coli* M2/A/C/35, **carril 8:** *K. pneumoniae* complex M3/A/M/4, **carril 9:** *K. pneumoniae* complex M4/A/C/17, **carril 10:** *E. coli* M4/A/C/19, **carril 11:** *E. coli* M4/A/C/26, **carril 12:** *C. freundii* s.str. M4/A/C/32, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, la obtención de la SA de las cepas *E. coli* M2/A/C/35, *K. pneumoniae* complex M3/A/M/4, y *K. pneumoniae* complex M4/A/C/17 en la base de datos *BLDB* (Naas et al., 2017), produjo porcentajes de identidad insuficientes para efectuar hipótesis filogenéticas. Por ende, no pudo ser establecida la variante enzimática en dichas cepas.

Para *C. freundii* s.str M4/A/C/32, la SGC permitió la detección de los genes *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>OXA-9</sub>, ambos codificantes de BLEA, y del gen *bla*<sub>CMY-48</sub>, codificante de una betalactamasa tipo AmpC plasmidial. Seguidamente, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 fue la octava cepa positiva para *bla*<sub>TEM</sub>, en la que mediante SGC se detectaron los genes *bla*<sub>TEM-1</sub> y *bla*<sub>OXA-1</sub>, ambos codificantes de BLEA. (**Tabla 12**).



| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
| ■                                       | 60 - 70          | 0,60 - 0,70 |
| ■                                       | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
| ■                                       | > 80             | > 0,80      |

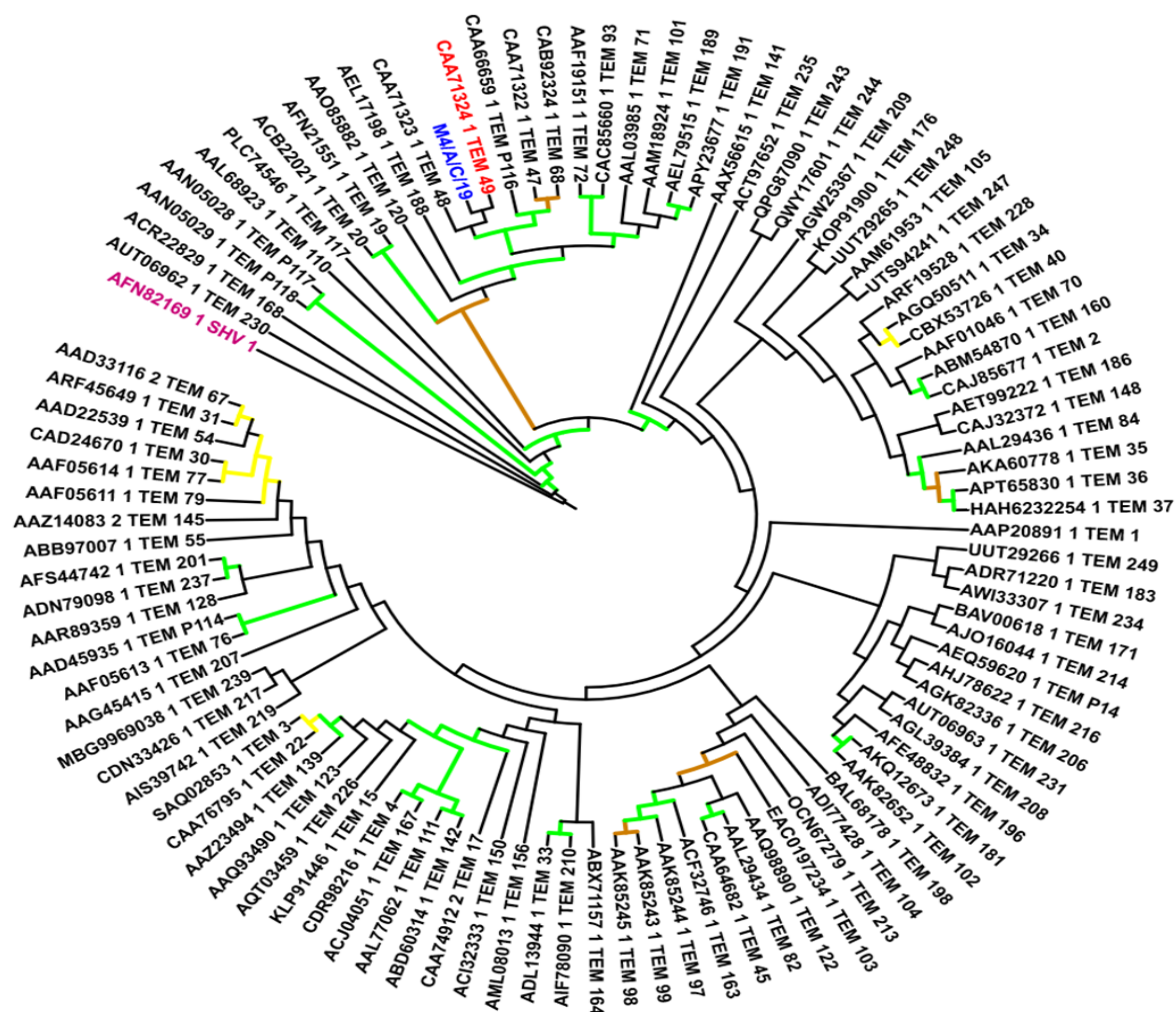
**UFBoot:** Ultrafast Bootstrap, **SH-aLRT:** approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, **aBayes:** Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 41. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM producida por la cepa *E. coli* M2/A/C/29.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo la secuencia de la variante más filogenéticamente próxima, y en violeta el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas UFBoot y SH-aLRT o  $\geq 0,6$  para aBayes. **Nota 3:** se emplearon 67 secuencias tipo TEM para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.





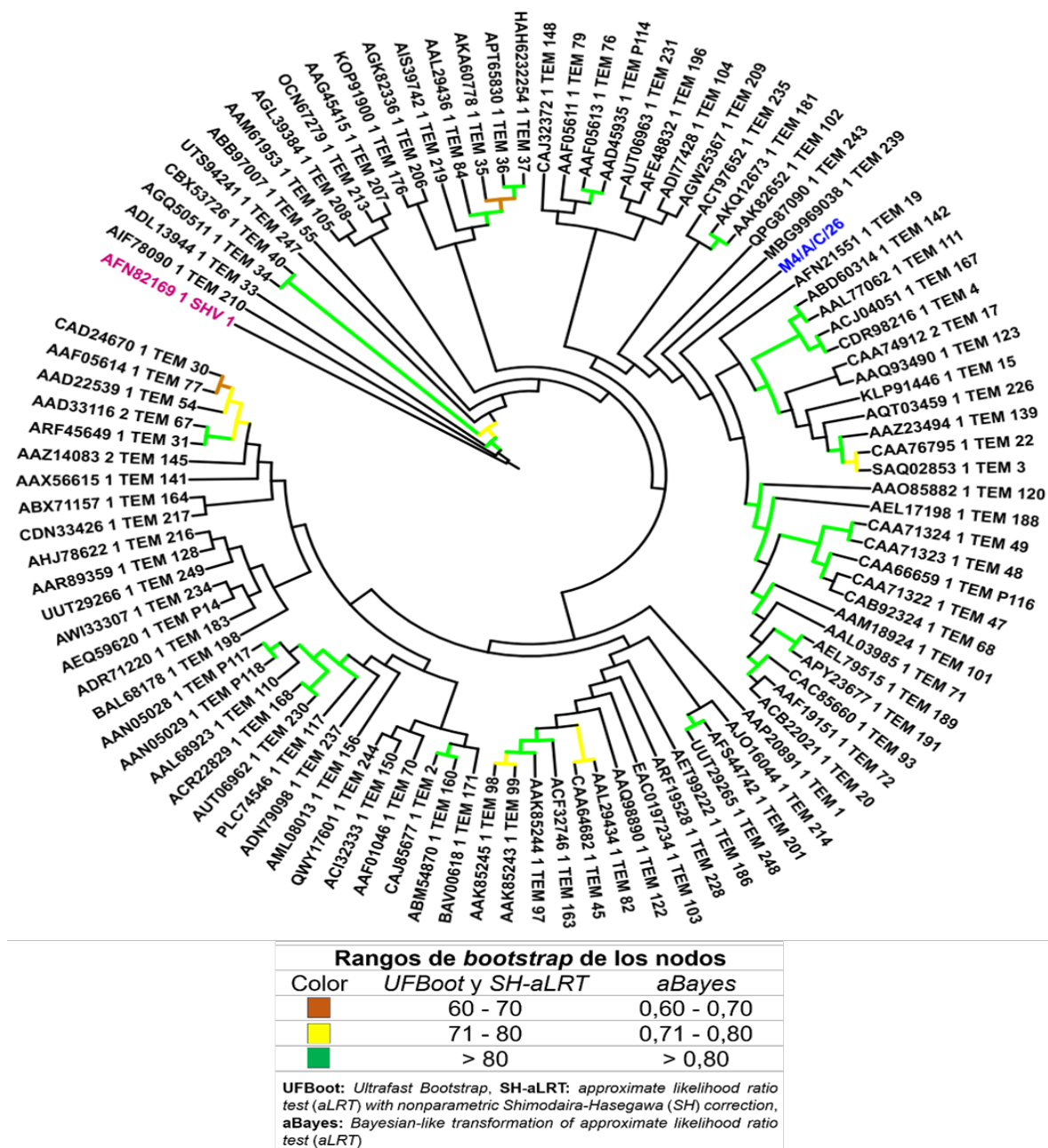
| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
|                                         | 60 - 70          | 0,60 - 0,70 |
|                                         | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
|                                         | > 80             | > 0,80      |

**UFBoot:** Ultrafast Bootstrap, **SH-aLRT:** approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, **aBayes:** Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 42. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM producida por la cepa *E. coli* M4/A/C/19.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo la secuencia de la variante más filogenéticamente próxima, y en violeta el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBoot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 101 secuencias tipo TEM para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 43. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM producida por la cepa *E. coli* M4/A/C/26.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, y en violeta el grupo externo.

**Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas UFBboot y SH-aLRT o  $\geq 0,6$  para aBayes. **Nota 3:** se emplearon 101 secuencias tipo TEM para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

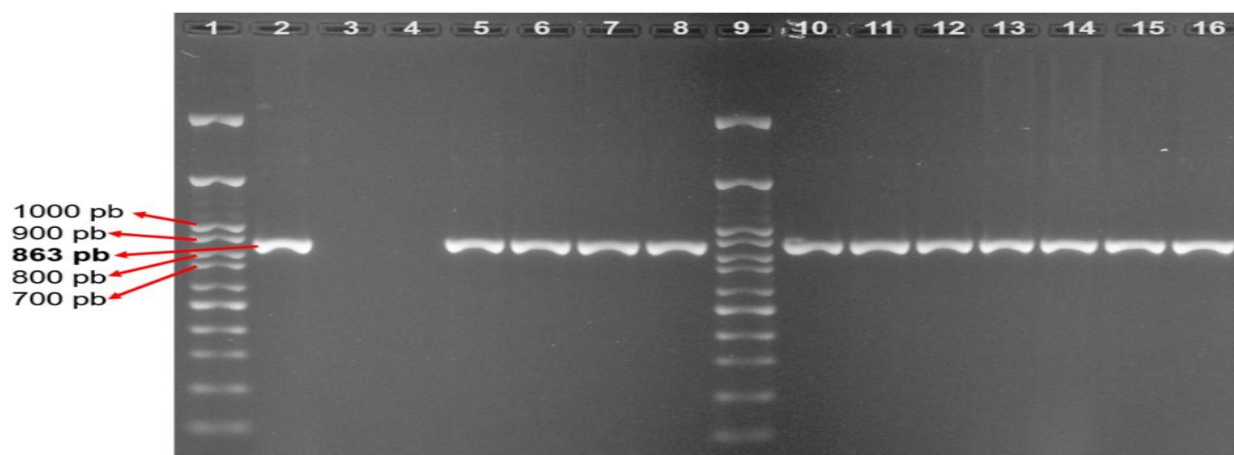
Fuente: Elaboración propia.

### 3.6.3. Detección molecular de grupos de *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Las reacciones de PCR realizadas para el estudio de los grupos que conforman a la familia *bla*<sub>CTX-M</sub>, revelaron que, en 18 de las 50 cepas investigadas, se visualizó un producto de amplificación de 863 bp, similar al obtenido en la cepa control (carril 2 de las **Figuras 44A, 44B y 44C**), lo que indica presencia del gen *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>. Todas las cepas que presentaron este gen se aislaron desde AF. Adicionalmente, la SGC de la cepa *K. pasteurii* M2/A/C/34 permitió identificar la variante *bla*<sub>CTX-M-177</sub>, incluyendo a un segundo gen codificante de BLEE, el gen *bla*<sub>OXY-4-1</sub> (**Tabla 12**).

Por otra parte, sólo una cepa procedente de AF fue portadora del gen *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub> y correspondió a la cepa *K. pneumoniae* complex M4/A/C/17. Esta cepa presentó un producto de PCR de 901 bp, al igual al observado en la cepa control *K. pneumoniae* UCO217 portadora del gen *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub><sup>+</sup> (**Figura 45**), y una situación idéntica ocurrió con *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub> (**Figura 46**).

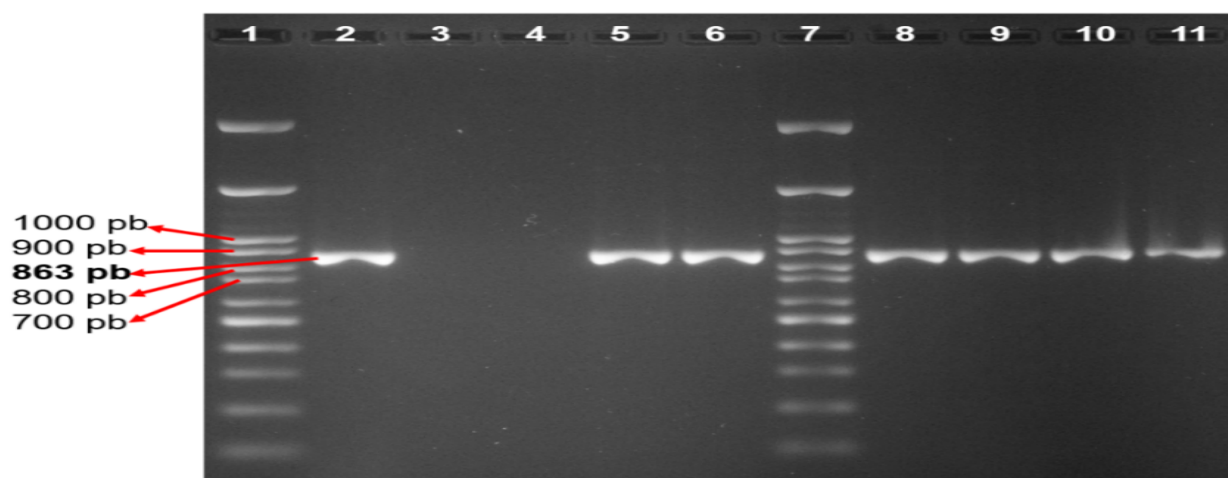
En el caso de *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub>, se detectaron 3 cepas positivas del total de 50 estudiadas, donde dos provinieron de AF y una de EF. (**Figura 47**).



**Figura 44A. Detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**Carriles 1 y 9:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO327 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>+</sup>) **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *K. pneumoniae* complex M1/A/C/26, **carril 6:** *K. oxytoca* complex M1/A/C/27, **carril 7:** *K. oxytoca* complex M1/A/C/28, **carril 8:** *E. coli* M2/A/C/29, **carril 10:** *E. coli* M2/A/C/30, **carril 11:** *E. coli* M2/A/C/35, **carril 12:** *K. pneumoniae* complex M3/A/M/4, **carril 13:** *K. pneumoniae* complex M3/A/C/20, **carril 14:** *K. pneumoniae* complex M3/A/C/21, **carril 15:** *K. pneumoniae* complex M3/A/C/22, **carril 16:** *K. pneumoniae* complex M3/A/C/23 **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

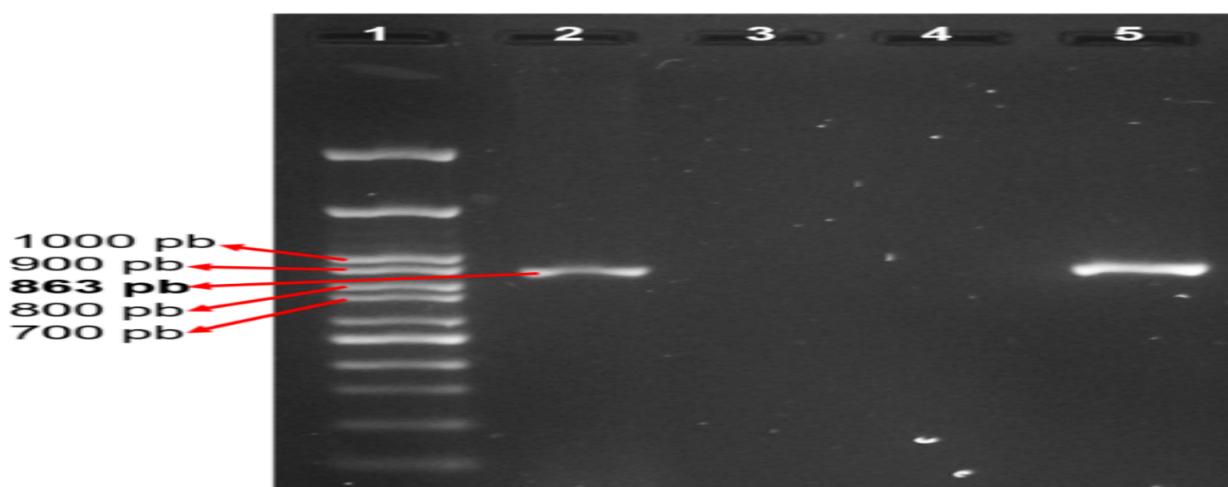
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 44B. Detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS (Continuación).**

**carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO327 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *E. coli* M4/A/C/18, **carril 6:** *E. coli* M4/A/C/19, **carril 8:** *E. coli* M4/A/C/21, **carril 9:** *E. coli* M4/A/C/26, **carril 10:** *E. coli* M4/A/C/27, **carril 11:** *E. coli* M4/A/C/29, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

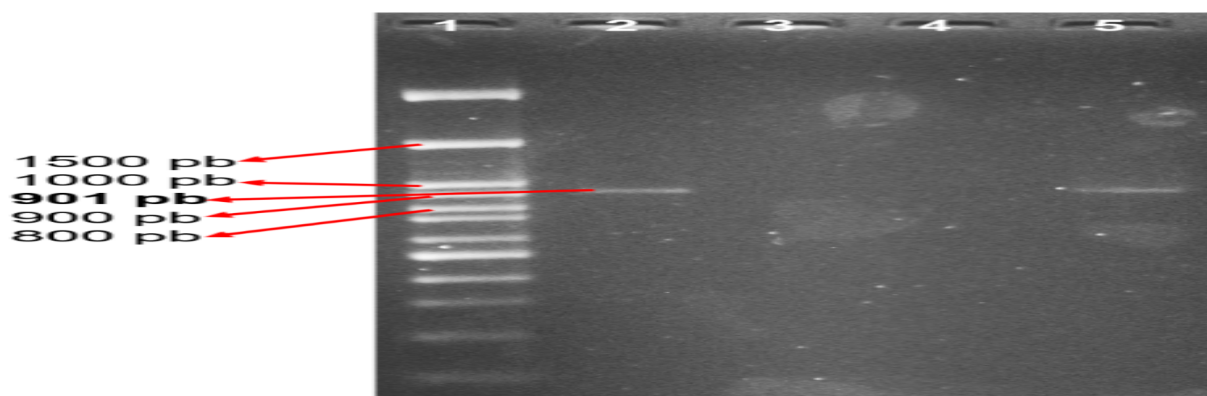


**Figura 44C. Detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS (Continuación).**

**carril 1:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO327 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *K. pasteurii* M2/A/C/34, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

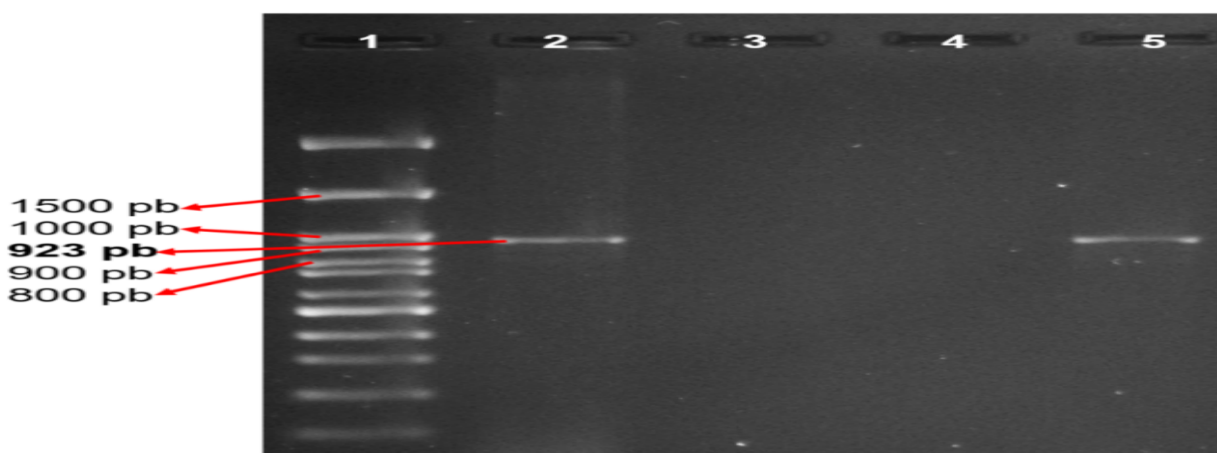




**Figura 45. Detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**Carril 1:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO217 (*bla*<sub>CTX-M-2-like</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>CTX-M-2-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *K. pneumoniae* complex M4/A/C/17, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

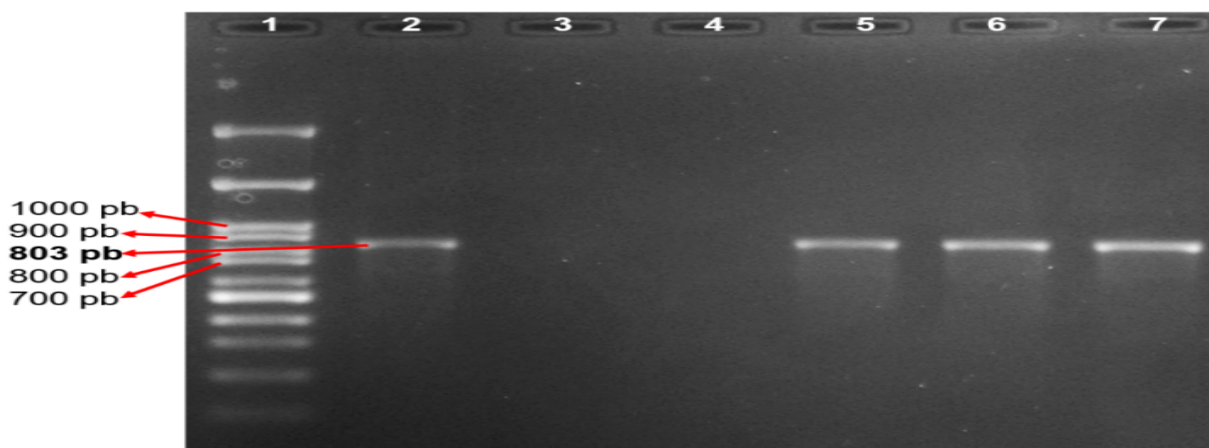
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 46. Detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**Carril 1:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO298 (*bla*<sub>CTX-M-8-like</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>CTX-M-8-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *E. coli* M1/A/C/29, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia



**Figura 47. Detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

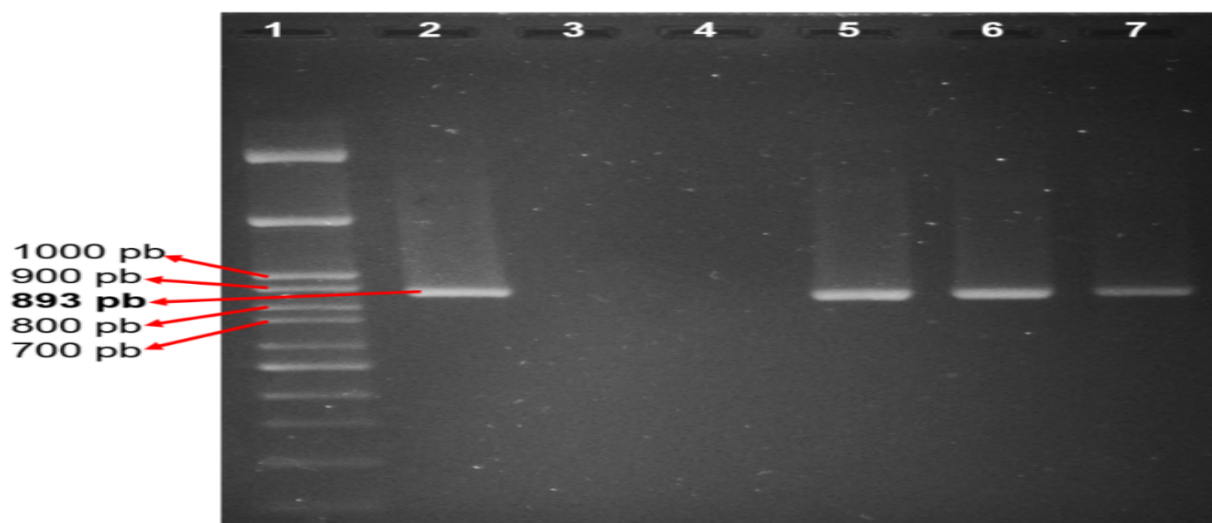
**Carril 1:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO250 (*bla*<sub>CTX-M-9-like</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>CTX-M-9-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *E. coli* M4/A/C/20, **carril 6:** *E. coli* M4/A/C/41, **carril 7:** *E. asburiae* M4/E/MCC/FW, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.6.4. Detección molecular de *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub>.

La búsqueda de genes codificantes de carbapenemasas, resultó en el hallazgo de 3 cepas portadoras de *bla*<sub>KPC</sub> del total de 50 investigadas, todas procedentes de AF (**Figura 48**). Consecuentemente, la SGC de las 3 cepas *K. pasteurii* M2/A/C/34, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, y *C. freundii* s.str. M4/A/C/32, permitió la identificación de la variante *bla*<sub>KPC-2</sub> en todas ellas. (**Tabla 12**).

No se encontraron cepas que portaran los otros genes de carbapenemasas investigados tales como: *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub>.



**Figura 48. Detección molecular de *bla*<sub>KPC</sub> en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**Carril 1:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO327 (*bla*<sub>KPC</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>KPC</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** *K. pasteurii* M2/A/C/34, **carril 6:** *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, **carril 7:** *C. freundii* s.str. M4/A/C/32, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.7. Secuenciación genómica completa (SGC) y análisis *in silico* de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.

La identificación de especies utilizando datos de SGC, reveló que los aislados investigados correspondieron a *Escherichia coli* M1/A/C/29, *Klebsiella pasteurii* M2/A/C/34, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, y *Citrobacter freundii sensu stricto* M4/A/C/32, lo que fue respaldado por los resultados de rMLST, ANIb y DDH (**Tabla 11**). El análisis de GRAs en la cepa *E. coli* M1/A/C/29, identificó los genes *bla*<sub>CTX-M-8</sub> y *bla*<sub>EC-like</sub> (este último gen demostró 98% de identidad con *bla*<sub>EC-15</sub>). Mientras que en las otras tres bacterias se identificó el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, junto con múltiples genes codificantes de β-lactamasas (cuatro en M3/A/M/3, tres en M4/A/C/32 y dos en M2/A/C/34). Es notable que la cepa M2/A/C/34 portaba el gen codificante de BLEE *bla*<sub>CTX-M-177</sub>, mientras que en M4/A/C/32, se detectó el gen de β-lactamasa plasmidial AmpC, *bla*<sub>CMY-48</sub> (**Tabla 12**).



Mientras que, de igual forma, se identificaron genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglicósidos (EMAs) en las cepas M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32 (**Tabla 12**). El resistoma de dichas bacterias, se correlacionó con los respectivos resultados de su índice MAR, donde M4/A/C/32 demostró el valor de MAR más alto y el resistoma más extenso, seguido por M3/A/M/3, y M2/A/C/34 (**Tabla 12**). Es interesante el hecho de haber hallado en M3/A/M/3, el gen de resistencia a fosfomicina *fosA*, debido a que tal antibiótico se está reintroduciendo en la práctica clínica.

El análisis de MLST, determinó que *E. coli* M1/A/C/29, *K. pasteurii* M2/A/C/32, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, y *C. freundii* s.str M4/A/C/32 pertenecen a los ST540, ST470, ST273 y ST214, respectivamente (**Tabla 12**). Además, el análisis de EGMS reveló la presencia de 3 plásmidos en M1/A/C/29, M2/A/C/34, y M4/A/C/32, mientras que en M3/A/M/3 se detectaron 2 plásmidos. (**Tabla 12**). Por otra parte, tanto en M2/A/C/34 como en M3/A/M/3 se detectó el integron clase 1 (*Int1*). Después, en M2/A/C/34 se detectó un gen de yersiniabactina (*ybt*), mientras que la indagación de SCs, reveló la presencia de *k-loci* desconocidos relacionados con KL29 y KL74 en M2/A/C/34 y *K. M3/A/M/3*, respectivamente. (**Tabla 12**).

No fue posible determinar los SCs de *E. coli* M1/A/C/29, y *C. freundii* s.str M4/A/C/32 utilizando la base de datos *Kaptive*, ya que esta específicamente diseñada para el género *Klebsiella*. Sin embargo, la búsqueda en *Ecoli\_VF*, y *VFDB* para M1/A/C/29, y M4/A/C/32 respectivamente, identificó 12 genes de factores de virulencia en la primera cepa y 8 en la segunda. Entre los genes hallados, se encuentran varios *ecp*-like, involucrados en la síntesis de pili, *cusC*, el cual forma parte del complejo de genes *cusCFBA*, codificante de una bomba de expulsión de cobre y plata, *fimH*, codificante de una proteína de síntesis de fimbrias tipo 1, *chuX*, codificante de una proteína de unión al grupo hemo, *fliG*, codificante de una proteína de cambio del motor flagelar, y varios genes *csg*-like involucrados en la síntesis de fimbrias tipo curli. (**Tabla 12**).

**Tabla 11.** Identificación genómica bacteriana de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.

| Aislados                       | Cepas de referencia                                                        | %ANiB | %DDH  |
|--------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|-------|-------|
| M1/A/C/29<br>(GCA_041079325.1) | <i>Escherichia coli</i> (GCA_000005845.2)                                  | 98,69 | 91,80 |
|                                | <i>Escherichia coli</i> (GCA_000008865.2)                                  | 97,51 | 81,30 |
| M2/A/C/34<br>(GCA_042159875.1) | <i>Klebsiella pasteurii</i> (GCA_018139045.1)                              | 99,27 | 97,90 |
|                                | <i>Klebsiella grimontii</i> (GCA_902164675.1)                              | 95,97 | 70,60 |
|                                | <i>Klebsiella michiganensis</i> (GCA_015139575.1)                          | 93,75 | 57,60 |
|                                | <i>Klebsiella oxytoca</i> (GCA_003812925.1)                                | 91,15 | 47,10 |
| M3/A/M/3<br>(GCA_042159955.1)  | <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> (GCA_000240185.2)            | 98,58 | 93,90 |
|                                | <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> (GCA_000163455.1)      | 97,96 | 92,00 |
|                                | <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> (GCA_001598715.1)               | 97,94 | 93,10 |
|                                | <i>Klebsiella variicola</i> (GCA_009648975.1)                              | 94,24 | 60,80 |
|                                | <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> (GCA_020525545.1)              | 94,24 | 58,60 |
|                                | <i>K. variicola</i> subsp. <i>tropica</i> (GCA_026802135.1)                | 93,85 | 60,90 |
|                                | <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> (GCA_016415705.1)                        | 93,54 | 57,50 |
|                                | <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> (GCA_020525925.1)  | 93,48 | 57,10 |
| M4/A/C/32<br>(GCA_042159915.1) | <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> (GCA_003181175.1) | 93,64 | 57,50 |
|                                | <i>Citrobacter freundii</i> (GCA_003812345.1)                              | 98,51 | 92,10 |
|                                | <i>Citrobacter portucalensis</i> (GCA_008693605.1)                         | 94,44 | 60,50 |
|                                | <i>Citrobacter braakii</i> (GCA_009648935.1)                               | 92,44 | 50,60 |
|                                | <i>Citrobacter youngae</i> (GCA_030294585.1)                               | 90,61 | 47,00 |

**%ANiB:** porcentaje de identidad nucleotídica promedio usando algoritmo BLAST+, **%DDH:** porcentaje de hibridación ADN-ADN *in silico*, **Nota:** en amarillo se destacan las especies de referencia con los valores de %ANiB y %DDH más altos, y junto a cada especie se indica el número de acceso de *GenBank* correspondiente. Además, las cuatro cepas tuvieron porcentajes de identidad de 100% en rMLST frente a las especies resaltadas en amarillo.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 12.** Características genómicas de cepas M1/A/C/29, M2/A/C/34, M3/A/M/3, y M4/A/C/32.

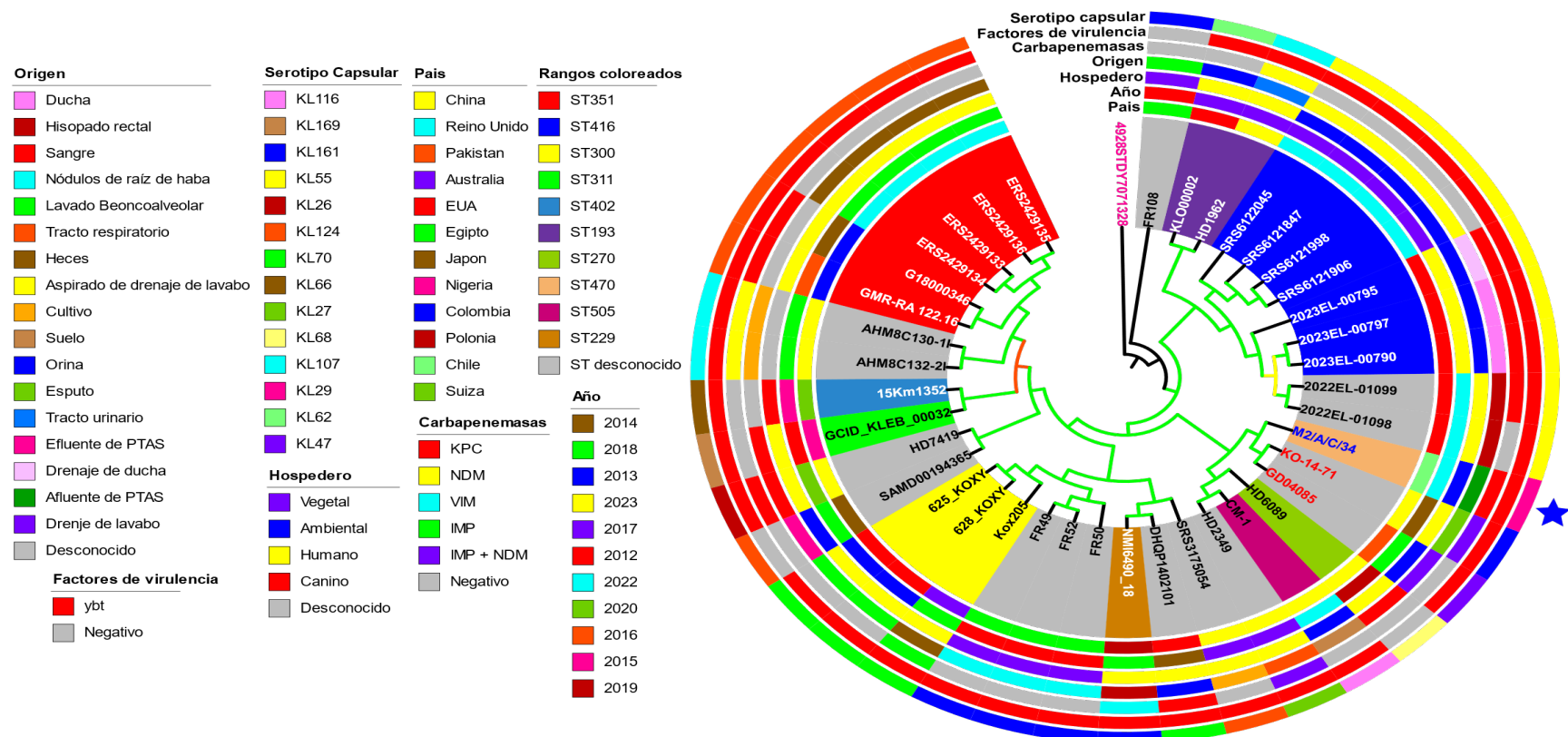
| Cepa                                                            | GRAs                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | ST  | Plásmidos                               | In          | GFVs                                                                                                                                                                             | SC          |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------|-------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>E. coli</i> M1/A/C/29                                        | <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub><br><i>bla</i> <sub>EC-like</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                         | 540 | IncHI2<br>Col8282<br>IncI1-I(Alpha)     | NE          | <i>csgB</i><br><i>csgC</i><br><i>csgD</i><br><i>csgF</i><br><i>fimH</i><br><i>fimF</i><br><i>fimG</i><br><i>cusC</i><br><i>ecpA</i><br><i>ecpB</i><br><i>ecpC</i><br><i>ecpD</i> | -           |
| <i>K. pasteurii</i><br>M2/A/C/34                                | <i>bla</i> <sub>CTX-M-177</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXY-4-1</sub> ; <b><i>bla</i><sub>KPC-2</sub></b> ; <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> ;                                                                                                                                                                                                  | 470 | IncFIB(K)<br>IncP6<br>IncFII<br>(pECLA) | <i>Int1</i> | <i>ybt</i>                                                                                                                                                                       | KL29<br>(U) |
| <i>K. pneumoniae</i><br>subsp.<br><i>pneumoniae</i><br>M3/A/M/3 | <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> ; <i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> ;<br><i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> ; <b><i>bla</i><sub>KPC-2</sub></b> ;<br><i>aac</i> (3)- <i>IIa</i> ; <i>aac</i> (6')- <i>lb-cr</i> ; <i>fosA</i> ;                                                                                                                       | 273 | IncFIB<br>(pQil)<br>IncFIB(K)           | <i>Int1</i> | -                                                                                                                                                                                | KL74<br>(U) |
| <i>C. freundii</i> s.str.<br>M4/A/C/32                          | <i>bla</i> <sub>CMY-48</sub> ; <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> ;<br><i>bla</i> <sub>TEM-1A</sub> ; <b><i>bla</i><sub>KPC-2</sub></b> ;<br><i>aadA1</i> ; <i>aph</i> (3'')- <i>lb</i> ;<br><i>aph</i> (6)- <i>Id</i> ; <i>aac</i> (6')- <i>lb</i> ; <i>aac</i> (3)- <i>la</i> ; <i>sat2</i> ;<br><i>sul1</i> ; <i>tet</i> (B); <i>dfrA1</i> | 214 | IncA<br>IncP6<br>pKPC-<br>CAV1321       | NE          | <i>chuX</i><br><i>ompA</i><br><i>fliG</i><br><i>csgB</i><br><i>csgD</i><br><i>csgE</i><br><i>csgF</i><br><i>csgG</i>                                                             | -           |

**GRAs:** genes de resistencia antibiótica, **ST:** Secuencia tipo, **In:** integron, **GFVs:** genes de factores de virulencia, **SC:** serotipo capsular (k-locus), **NE:** no encontrado. Las variantes *bla*<sub>KPC</sub> de las cepas en estudio están resaltadas en rojo. La búsqueda de SC no está disponible para *E. coli* y *C. freundii* en la base de datos *Kaptive*. **"(U)"** significa que los SCs de las cepas son desconocidos, aunque similares a los indicados.

Fuente: Elaboración propia.

En la filogenia de *K. pasteurii* M2/A/C/34, se analizaron un total de 40 taxa, incluyendo dicha cepa junto con 38 genomas de la misma especie, provenientes de diferentes áreas geográficas, y un genoma de *Klebsiella grimontii* como grupo externo. El análisis reveló que M2/A/C/34 está estrechamente relacionado con las cepas KO-14-71 y GD0485, ambas recuperadas en China y Pakistán en 2014, y 2018, respectivamente, sin ST asignado, obtenidas de esputo humano, y desagüe de fregadero, respectivamente. **(Figura 49)**. Además, se evidenció que la mayoría de los genomas de *K. pasteurii*, no están asignados a STs específicos, aunque los ST416 y ST351 fueron los más frecuentes. La mayoría de los genomas de *K. pasteurii* provinieron de aislados recolectados en Reino Unido, Estados Unidos y China, predominantemente entre 2017 y 2018, a partir de muestras humanas. Es destacable que la mayoría de los genomas de *K. pasteurii*, no portan genes de carbapenemasas. Sin embargo, entre los aislados positivos para tales enzimas, *bla*<sub>KPC</sub> fue el más prevalente **(Figura 49)**. Adicionalmente, se evidencio una proporción significativa de genomas portadores de genes de virulencia *ybt*, asociados particularmente con los SCs KL55 y KL124 **(Figura 49)**.

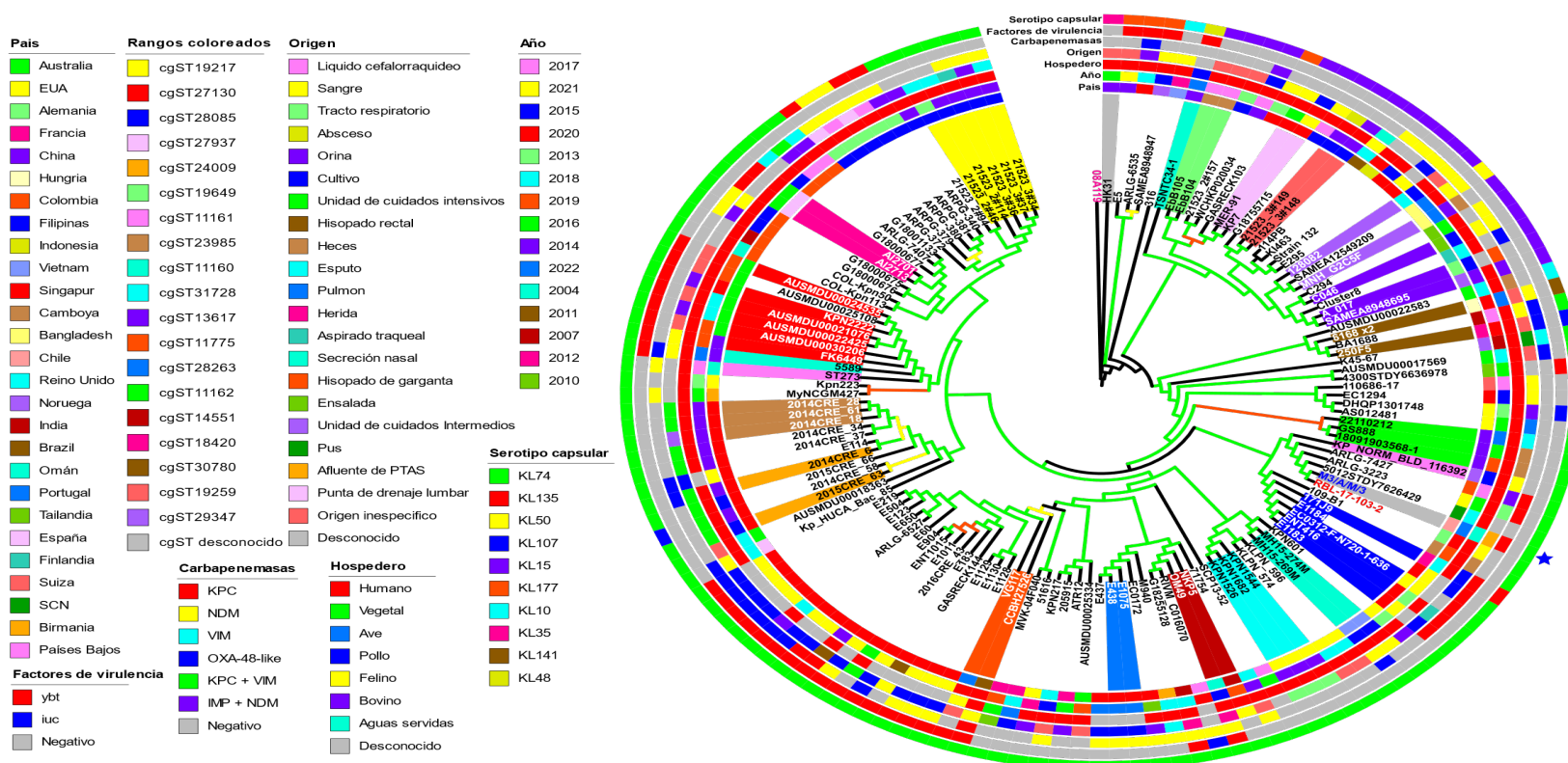
En la filogenia de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, se estudiaron un conjunto de 140 taxa, incluyendo dicha bacteria junto a 138 genomas de la misma especie (ST273) recolectados globalmente, y un genoma de *Klebsiella quasivariicola* como grupo externo. El análisis reveló que M3/A/M/3 se encuentra estrechamente relacionado con la cepa RBL-17-103-2, obtenido de sangre humana en Alemania en 2020. **(Figura 50)**. La mayoría de los genomas del ST273 analizados, provienen de aislados recolectados en Singapur, China, Filipinas, Colombia, Australia y Estados Unidos, principalmente entre 2014 y 2021, obtenidos de muestras humanas. Los cuales se destacaron por albergar diversos genes de carbapenemasas, siendo *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>OXA-48-like</sub> los más frecuentemente identificados. Además, los genes *ybt* fueron los genes de virulencia, más comunmente encontrados entre las cepas del ST273 **(Figura 50)**. En cuanto a los SCs, los más predominantes entre las cepas integrantes de la filogenia, fueron KL74 y KL15, siendo M3/A/M/3 principalmente asociado con KL74 **(Figura 50)**. No fue posible construir una filogenia para *C. freundii* s.str. M4/A/C/32 debido a la falta de genomas de ST214 en las bases de datos disponibles.



**Figura 49. Árbol filogenómico de máxima verosimilitud que muestra la relación entre *K. pasteurii* M2/A/C/34 y otras 38 cepas de la misma especie recolectadas alrededor del mundo.**

La filogenia fue inferida en *IQ-TREE* v2.1.2 a partir de *core-genomes* alineados por *Roary* v3.13.0 y filtrados por *SNP-sites* v2.5.1. Los valores de *SH-aLRT*, *aBayes* y *UFboot* están indicados en colores en las ramas, basados en 1000 réplicas. Las ramas naranjas, amarillas y verdes representan valores entre [70 - 80], [81 - 90] y  $\geq 91$  para *SH-aLRT* y *UFboot* respectivamente, y [0,7 - 0,8], [0,81 - 0,9] y  $\geq 0,91$  para *aBayes* respectivamente. Los rangos coloreados representan los STs de las cepas. EUA: Estados Unidos de América. La cepa M2/A/C/34 está etiquetada en azul e identificada con una estrella azul y las cepas filogenéticamente cercanas están en rojo. El árbol fue anotado y visualizado en *ITOL* v6.8.2 y *Klebsiella grimontii* 4928STDY7071328, etiquetada en morado, fue utilizada como grupo externo. Las longitudes de las ramas no están a escala.

Fuente: Elaboración propia.



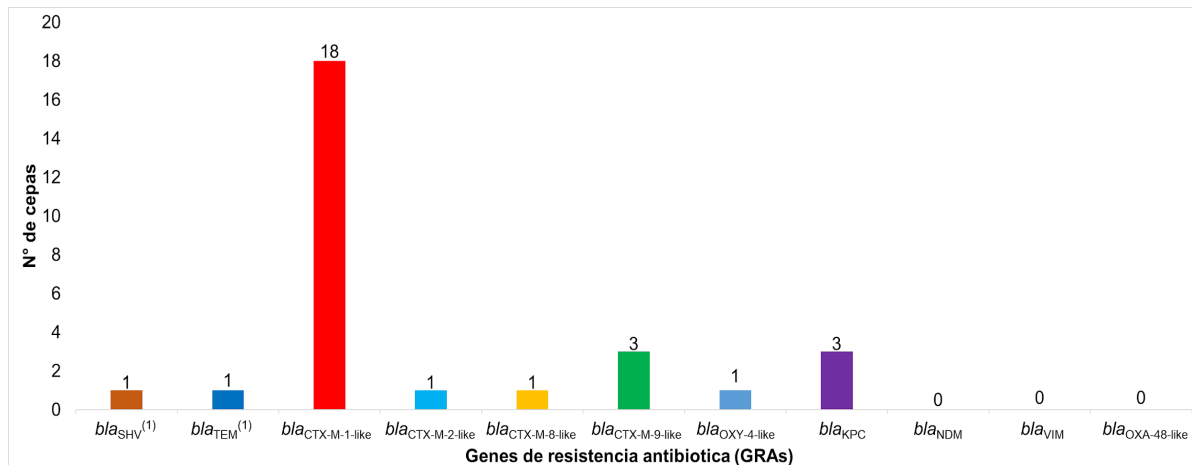
**Figura 50. Árbol filogenómico de máxima verosimilitud que muestra la relación entre *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 ST273 y otras 138 cepas de la misma especie y STs recolectadas alrededor del mundo.**

La filogenia fue inferida en *IQ-TREE* v2.1.2 a partir de *core-genomes* alineados por *Roary* v3.13.0 y filtrados por *SNP-sites* v2.5.1. Los valores de *SH-aLRT*, *aBayes* y *UFboot* están indicados en colores en las ramas, basados en 1000 réplicas. Las ramas naranjas, amarillas y verdes representan valores entre [70 - 80], [81 - 90] y  $\geq 91$  para *SH-aLRT* y *UFboot* respectivamente, y [0,7 - 0,8], [0,81 - 0,9] y  $\geq 0,91$  para *aBayes* respectivamente. Los rangos coloreados representan los *core-genomes sequence types* (cgSTs) más frecuentes de las cepas. SCN: San Cristóbal y Nieves. EUA: Estados Unidos de América. La cepa M3/A/M/3 está etiquetada en azul e identificada con una estrella azul y la cepa filogenéticamente cercana está en rojo. El árbol fue anotado y visualizado en *ITOL* v6.8.2 y *Klebsiella quasivariicola* 08A119, etiquetada en morado, fue utilizada como grupo externo. Las longitudes de las ramas no están a escala.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.8. Prevalencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas.

De las 48 cepas investigadas de AF, 23 resultaron portadoras de genes codificantes de BLEE, y 3 de genes codificantes de carbapenemasas. Mientras que, de las 2 cepas investigadas de EF, una resulto portadora de un gen de BLEE, y ninguna presentó genes de carbapenemasas. Finalmente, se evidencio que el gen *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> fue el prevalente entre los 50 *Enterobacterales* estudiados. (Tablas 13A, 13B, y Figura 51).



**Figura 51. Prevalencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.**

**(1):** variantes de espectro extendido de *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub>.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 13A.** Presencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.

| Cepa                                                   | <i>bla</i> <sub>SHV</sub> | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-2-like</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-8-like</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub> | <i>bla</i> <sub>KPC</sub> |
|--------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/18                 | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/23                 | +(1)                      | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/26                 | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/27                    | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/28                    | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M1/A/C/29                               | -                         | -                         | -                                  | -                                  | +                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/37               | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M1/A/MCC/38                             | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. roggenkampii</i> M1/A/MCC/39                     | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/40               | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>S. marcescens</i> M2/A/C/25                         | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/29                               | -                         | +                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/30                               | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pasteurii</i> M2/A/C/34                          | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | +                         |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/35                               | -                         | +                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/36                               | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M2/A/MCC/39                             | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>C. freundii</i> complex. M2/A/MCC/40                | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/41                    | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/42                    | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M2/A/MCC/43               | +                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> M3/A/M/3 | -                         | +                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | +                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/M/4                  | +                         | +                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/20                 | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/21                 | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |

(1): *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido.

Fuente: Elaboración propia.



**Tabla 13B.** Presencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS (continuación).

| Cepa                                   | <i>bla</i> <sub>SHV</sub> | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-2-like</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-8-like</sub> | <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub> | <i>bla</i> <sub>KPC</sub> |
|----------------------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/22 | +                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/23 | +                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/43        | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/44        | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/45  | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. cloacae</i> complex M3/A/MCC/46  | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/47  | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/48  | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/49  | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/50         | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>Enterobacter</i> sp. M3/A/MCC/51    | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/52         | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M4/A/C/17 | +                         | +                         | -                                  | +                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/18               | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/19               | -                         | +(1)                      | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/20               | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | +                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/21               | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/26               | -                         | +                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/27               | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/29               | -                         | -                         | +                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>C. freundii</i> s.str. M4/A/C/32    | -                         | +                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | +                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/41               | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | +                                  | -                         |
| <i>E. coli</i> M4/A/MCC/49             | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. asburiae</i> M3/E/MCC/FW         | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | -                                  | -                         |
| <i>E. asburiae</i> M4/E/MCC/FW         | -                         | -                         | -                                  | -                                  | -                                  | +                                  | -                         |

(1): *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.9. Asociación entre detección fenotípica y molecular de BLEE y/o carbapenemasas en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.

Se observó una alta concordancia entre la detección fenotípica de BLEE, y las pruebas moleculares para la detección los respectivos genes codificantes en casi la totalidad de las cepas estudiadas, salvo algunas excepciones. (**Tablas 14A y 14B**).

La cepa *K. pasteurii* M2/A/C/34 presentó una prueba fenotípica negativa para BLEE, pese a ser portadora del gen *bla*<sub>CTX-M-177</sub> (variante de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>) (**Tabla 14A**). Mientras que *C. freundii* s.str. M4/A/C/32 presentó una prueba fenotípica positiva para BLEE y AmpC, no portando genes codificantes para BLEE, pero sí de AmpC (*bla*<sub>CMY-48</sub>.[variante de *bla*<sub>CMY-2-like</sub>]) (**Tabla 14B**).

**Tabla 14A.** Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas v/s detección molecular de sus genes codificantes en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS.

| Cepa                                                   | DF-BLEE | Blue Carba | NG-Test® CARBA-5 | GRAs                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------------------------------|---------|------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/18                 | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/23                 | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>SHV</sub> <sup>(1)</sup>                                                                                                                                                       |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/C/26                 | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/27                    | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>K. oxytoca</i> complex M1/A/C/28                    | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>E. coli</i> M1/A/C/29                               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-8-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/37               | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>E. coli</i> M1/A/MCC/38                             | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>E. roggenkampii</i> M1/A/MCC/39                     | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M1/A/MCC/40               | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>S. marcescens</i> M2/A/C/25                         | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/29                               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/30                               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>K. pasteurii</i> M2/A/C/34                          | -       | +          | KPC              | <i>bla</i> <sub>CTX-M-177</sub> <sup>(3)</sup><br><i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> <sup>(3)</sup>                                                                                                   |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/35                               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>E. coli</i> M2/A/C/36                               | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>E. coli</i> M2/A/MCC/39                             | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>C. freundii</i> complex. M2/A/MCC/40                | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/41                    | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>Enterobacter</i> sp. M2/A/MCC/42                    | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M2/A/MCC/43               | -       | -          | NA               | -                                                                                                                                                                                              |
| <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> M3/A/M/3 | -       | +          | KPC              | <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> <sup>(2)(3)</sup><br><i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> <sup>(2)(3)</sup><br><i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> <sup>(2)(3)</sup><br><i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> <sup>(3)</sup> |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/M/4                  | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/20                 | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/21                 | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>                                                                                                                                                             |

(1): *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido, (2): *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, y *bla*<sub>OXA</sub> de espectro amplio, (3): genes identificados mediante SGC. **DF-BLEE**: detección fenotípica BLEE, **NA**: no aplica, **GRAs**: genes de resistencia antibiótica.

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla 14B.** Detección fenotípica de BLEE y/o carbapenemasas v/s detección molecular de sus genes codificantes en cepas de *Enterobacterales* aisladas de AS. (Continuación).

| Cepa                                   | DF-BLEE | Blue Carba | NG-Test® CARBA-5 | GRAs                                           |
|----------------------------------------|---------|------------|------------------|------------------------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/22 | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M3/A/C/23 | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/43        | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>K. aerogenes</i> M3/A/MCC/44        | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/45  | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>E. cloacae</i> complex M3/A/MCC/46  | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/47  | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/48  | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>K. oxytoca</i> complex M3/A/MCC/49  | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/50         | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>Enterobacter</i> sp. M3/A/MCC/51    | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>P. vulgaris</i> M3/A/MCC/52         | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>K. pneumoniae</i> complex M4/A/C/17 | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-2-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/18               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/19               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>(1)</sup>       |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/20               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/21               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/21               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/26               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/27               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/29               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub>             |
|                                        |         |            |                  | <i>bla</i> <sub>CMY-48</sub> <sup>(3)(4)</sup> |
| <i>C. freundii</i> s.str. M4/A/C/32    | +       | +          | KPC              | <i>bla</i> <sub>OXA-9</sub> <sup>(2)(4)</sup>  |
|                                        |         |            |                  | <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> <sup>(2)(4)</sup>  |
|                                        |         |            |                  | <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> <sup>(4)</sup>     |
| <i>E. coli</i> M4/A/C/41               | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub>             |
| <i>E. coli</i> M4/A/MCC/49             | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>E. asburiae</i> M3/E/MCC/FW         | -       | -          | NA               | -                                              |
| <i>E. asburiae</i> M4/E/MCC/FW         | +       | -          | NA               | <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub>             |

(1): *bla*<sub>SHV</sub> y *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido, (2): *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, y *bla*<sub>OXA</sub> de espectro amplio, (3): AmpC, (4): genes identificados mediante SGC. **DF-BLEE**: detección fenotípica BLEE, **NA**: no aplica, **GRAs**: genes de resistencia antibiótica.

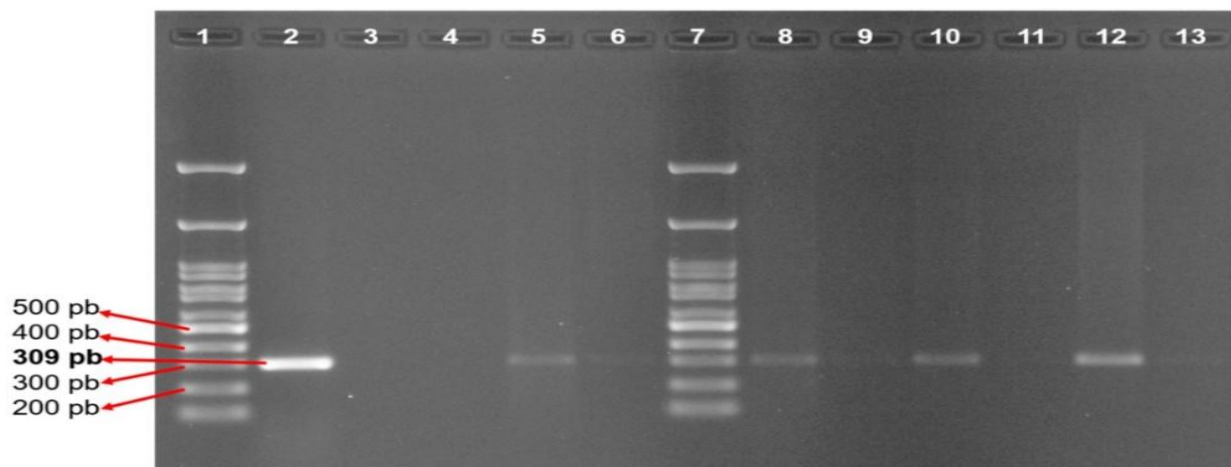
Fuente: Elaboración propia.

### 3.10. Detección directa e identificación de genes codificantes BLEE y/o carbapenemasas en muestras de AS.

#### 3.10.1. Detección molecular de *bla<sub>SHV</sub>* de espectro extendido.

La investigación del gen *bla<sub>SHV</sub>* en las ocho muestras de AS determinó que dicho gen se encontró presente en todas ellas, observándose el producto de amplificación de 309 pb. Además, se pudo observar una mayor intensidad en las bandas de los amplicones de AF (carriles 5, 8, 10 y 12) en comparación con las de EF (carriles 6, 9, 11, y 13) (**Figura 52**).

No fue posible realizar digestión enzimática para establecer la presencia de variantes de espectro extendido, así como tampoco secuenciación, debido a insuficiente enzima *NheI* disponible, y a escasos volúmenes remanentes del proceso de extracción de ADN directo de las muestras de AS, los que fueron empleados en su mayoría para la pesquisa de otros GRAs de mayor prioridad, lo cual se detalla a lo largo de la extensión del presente apartado **3.10**.



**Figura 52. Detección molecular de *bla<sub>SHV</sub>* en muestras de AS.**

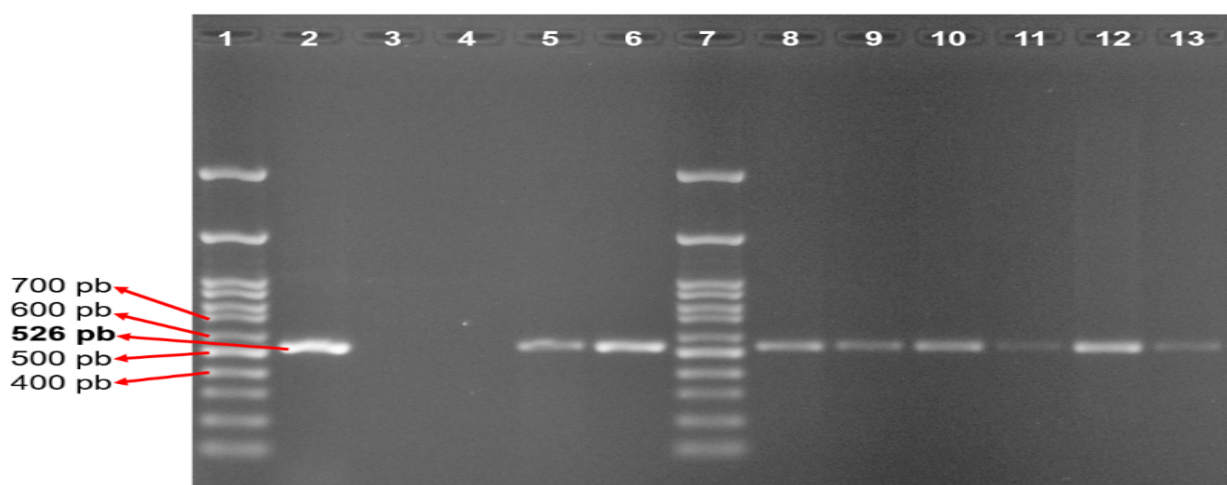
**Carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO168 (*bla<sub>SHV</sub>*<sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla<sub>SHV</sub>*<sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** 1A, **carril 6:** 1E, **carril 8:** 2A, **carril 9:** 2E, **carril 10:** 3A, **carril 11:** 3E, **carril 12:** 4A, **carril 13:** 4E, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.10.2. Detección molecular de *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido.

La investigación del *bla*<sub>TEM</sub> determinó que dicho gen se amplificó en todas las muestras de AS (**Figura 53**), y la secuenciación tipo Sanger confirmó la detección molecular de dicho gen en todas las muestras.

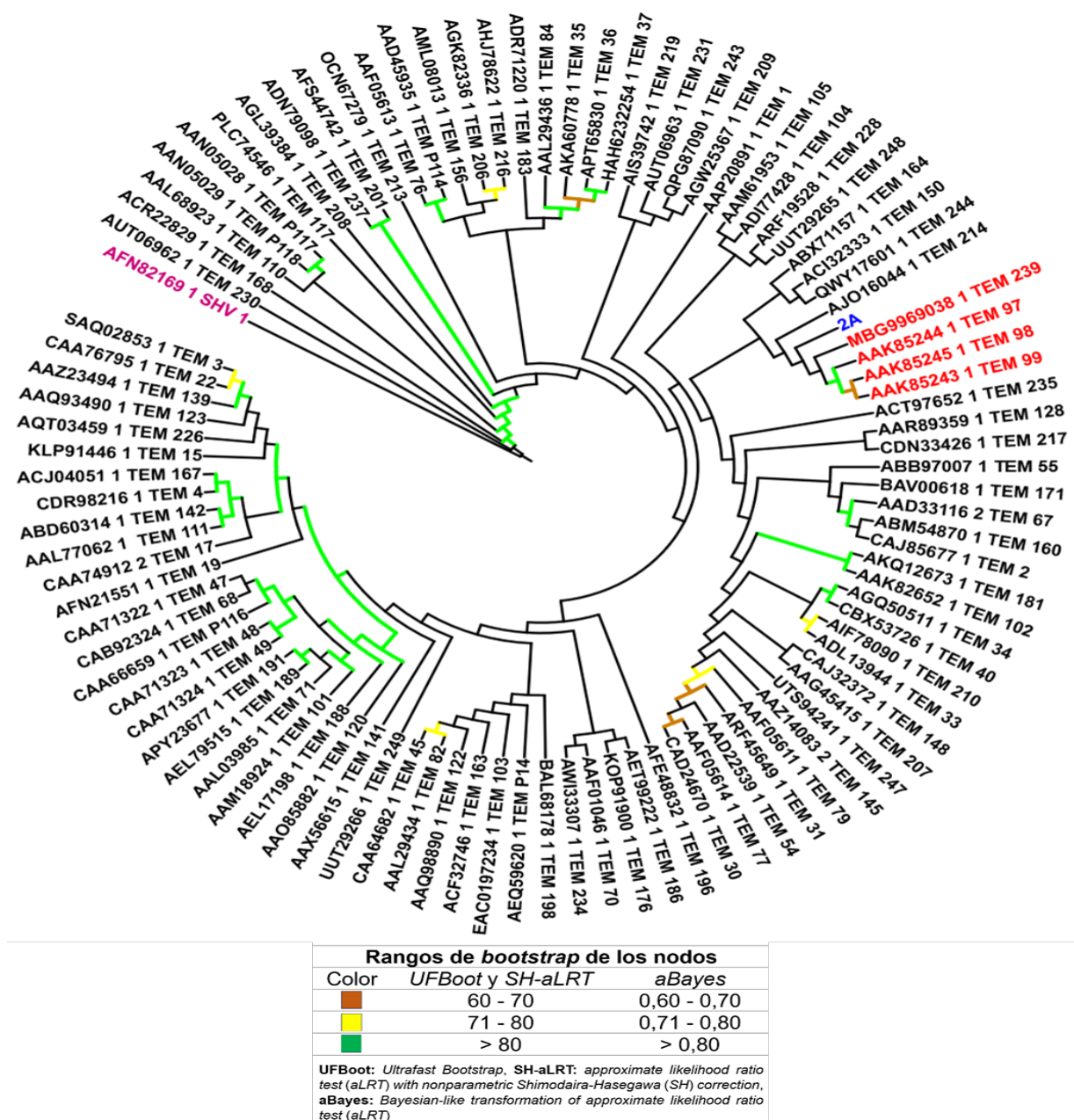
El análisis filogenético efectuado en *IQ-TREE* v2.1.2 (Minh et al., 2020), de la SA de la muestra 2A, estableció una relación próxima con las variantes TEM-97, TEM-98, TEM-99 y TEM-239, pero no resolvió la más probable (**Figura 54**), mientras que el análisis filogenético de la SA de la muestra 2E demostró una relación filogenéticamente próxima con la variante de TEM-217 (**Figura 55**). Todas las variantes de TEM antes mencionadas no poseen un espectro hidrolítico establecido de acuerdo con las bases de datos *BLDB* (Naas et al., 2017), *CARD* (Alcock et al., 2023), y *NDARO* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>).



**Figura 53. Detección molecular de *bla*<sub>TEM</sub> en muestras de AS.**

**Carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO168 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>SHV</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** 1A, **carril 6:** 1E, **carril 8:** 2A, **carril 9:** 2E, **carril 10:** 3A, **carril 11:** 3E, **carril 12:** 4A, **carril 13:** 4E, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

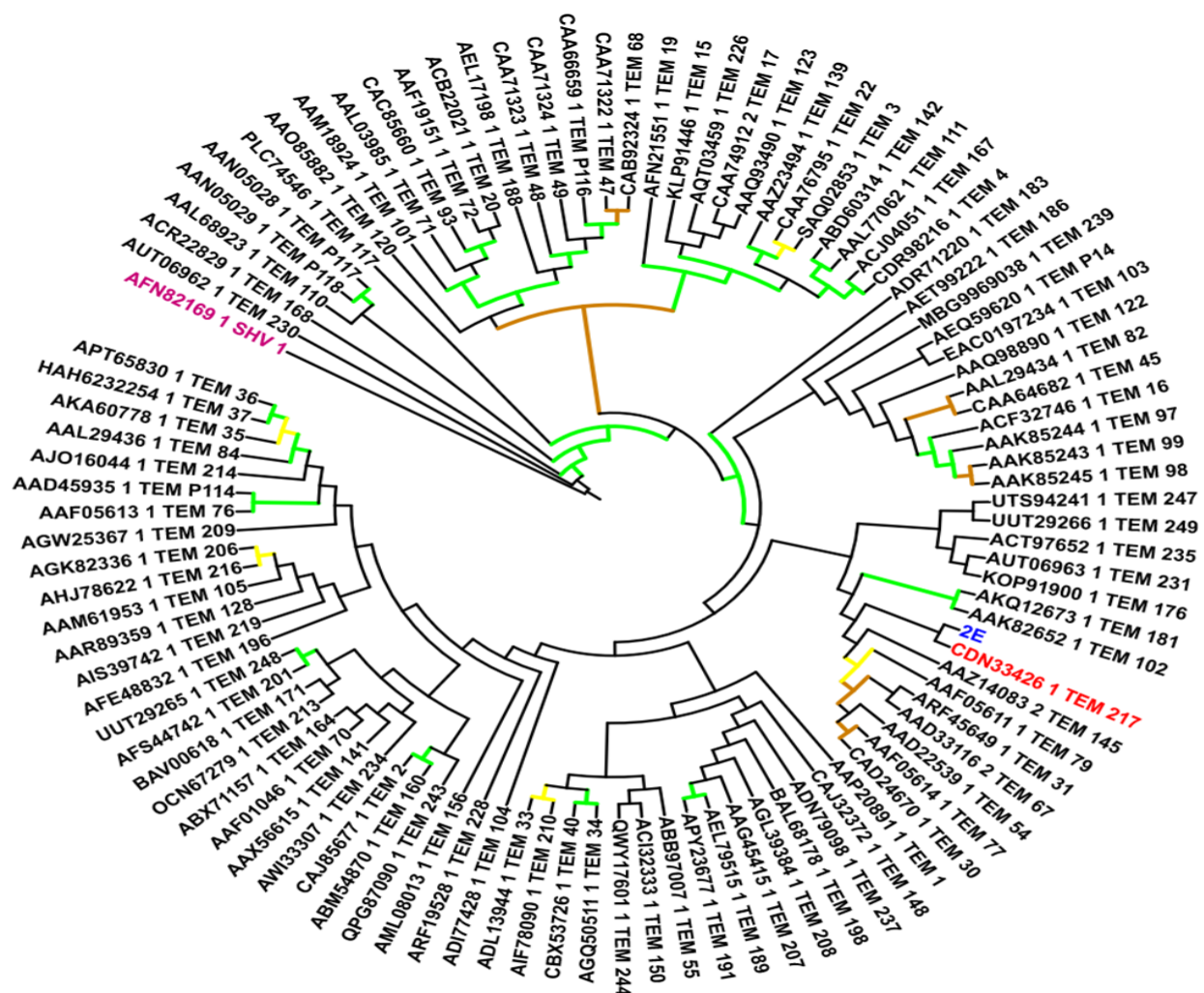


**Figura 54. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM detectada en la muestra de AS 2A.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo las secuencias de las variantes más filogenéticamente próximas, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBoot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 98 secuencias tipo TEM para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.





| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
| Orange                                  | 60 - 70          | 0,60 - 0,70 |
| Yellow                                  | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
| Green                                   | > 80             | > 0,80      |

**UFBoot:** Ultrafast Bootstrap, **SH-aLRT:** approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, **aBayes:** Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 55. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de  $\beta$ -lactamasa tipo TEM detectada en la muestra de AS 2E.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo la secuencia de la variante más filogenéticamente próxima, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBoot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 101 secuencias tipo TEM para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

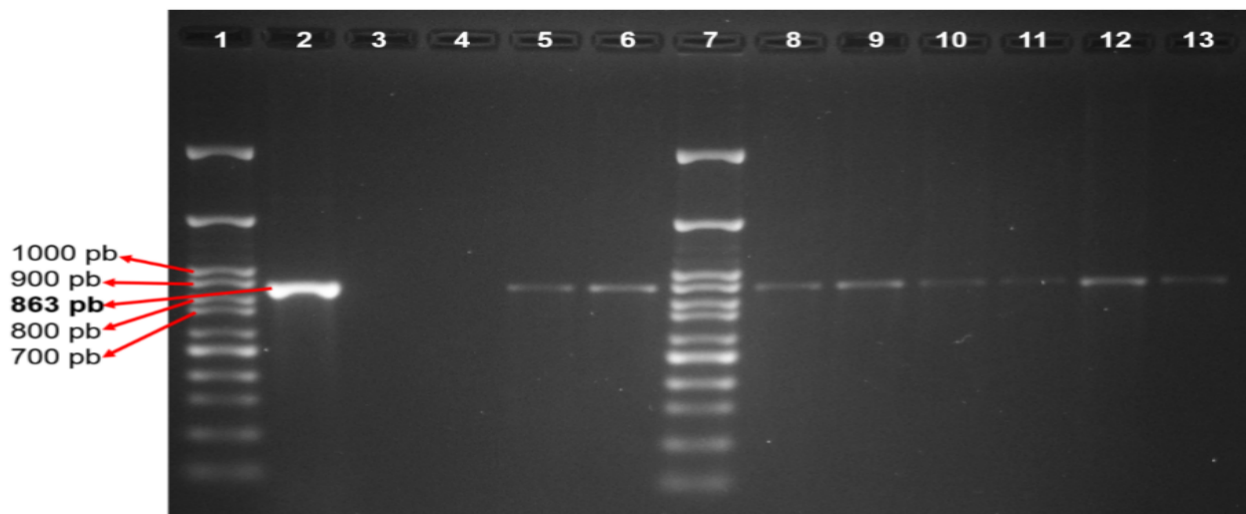
Fuente: Elaboración propia.



Por otro lado, la investigación de las SAs de las muestras 1A, 1E, 3A y 3E, 4A, y 4E en BLDB (Naas et al., 2017), produjo porcentajes de identidad insuficientes para ejecutar hipótesis filogenéticas. Por ende, no pudo ser establecida la variante enzimática en dichas muestras.

### 3.10.3. Detección molecular de grupos de *bla*<sub>CTX-M</sub>.

Las reacciones de PCR realizadas para la detección de los grupos que conforman a la familia *bla*<sub>CTX-M</sub>, revelaron la presencia del *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> en todas las muestras de AS (**Figura 56**). Por el contrario, la pesquisa de genes resultó negativa para *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub>, y *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub>.



**Figura 56. Detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> en muestras de AS.**

**Carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO327 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>CTX-M-1-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** 1A, **carril 6:** 1E, **carril 8:** 2A, **carril 9:** 2E, **carril 10:** 3A, **carril 11:** 3E, **carril 12:** 4A, **carril 13:** 4E, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

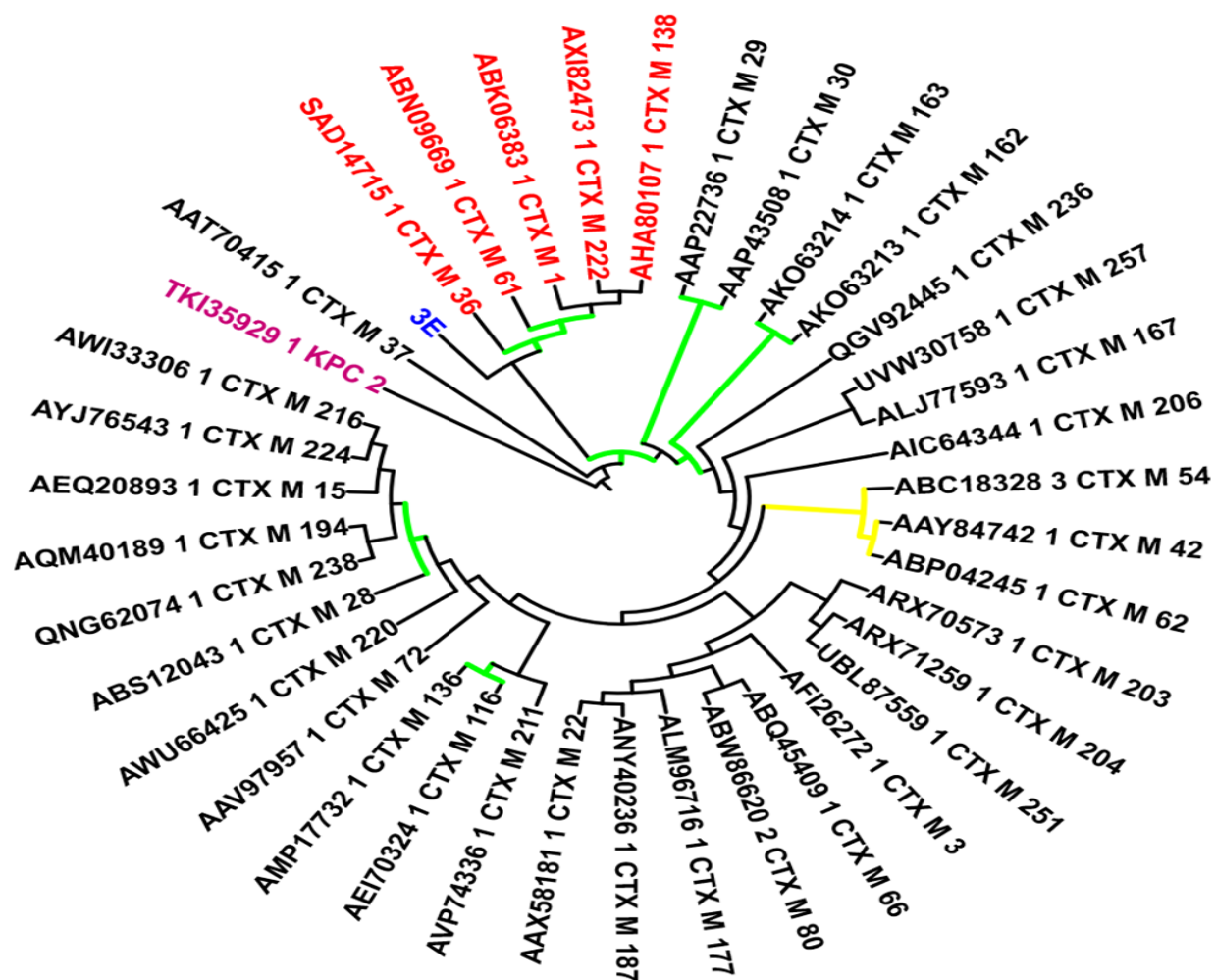
Fuente: Elaboración propia.

La secuenciación tipo Sanger confirmó la detección molecular de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> en las muestras ensayadas (3E y 4A). Por otro lado, el análisis filogenético realizado en *IQ-TREE* v2.1.2 (Minh et al., 2020), de la SA de la muestra 3E, estableció una relación próxima con las variantes CTX-M-1, CTX-M-36, CTX-M-61, CTX-M-122 y CTX-M-138, pero no definió la más probable (**Figura 57**). Una situación similar ocurrió con el análisis filogenético de la SA de la muestra 4A, en la que se estableció una relación próxima con las variantes CTX-M-22, CTX-M-29, CTX-M-30 y CTX-M-36, pero de igual manera no se resolvió la más probable (**Figura 58**).

#### **3.10.4. Detección molecular de *bla*<sub>KPC</sub>.**

La investigación sobre *bla*<sub>KPC</sub> resultó en el hallazgo de dicho gen en todas las muestras de AS. (**Figura 59**). Por otro lado, la secuenciación tipo Sanger confirmó la detección molecular de dicho gen en las muestras ensayadas (3E y 4A).

El análisis filogenético realizado en *IQ-TREE* v2.1.2 (Minh et al., 2020) de la SA de la muestra 3A, estableció una relación filogenéticamente próxima con la variante KPC-20 (**Figura 60**). Por otro lado, el análisis filogenético de la SA de la muestra 3E no reveló relación con ninguna variante analizada (**Figura 61**).



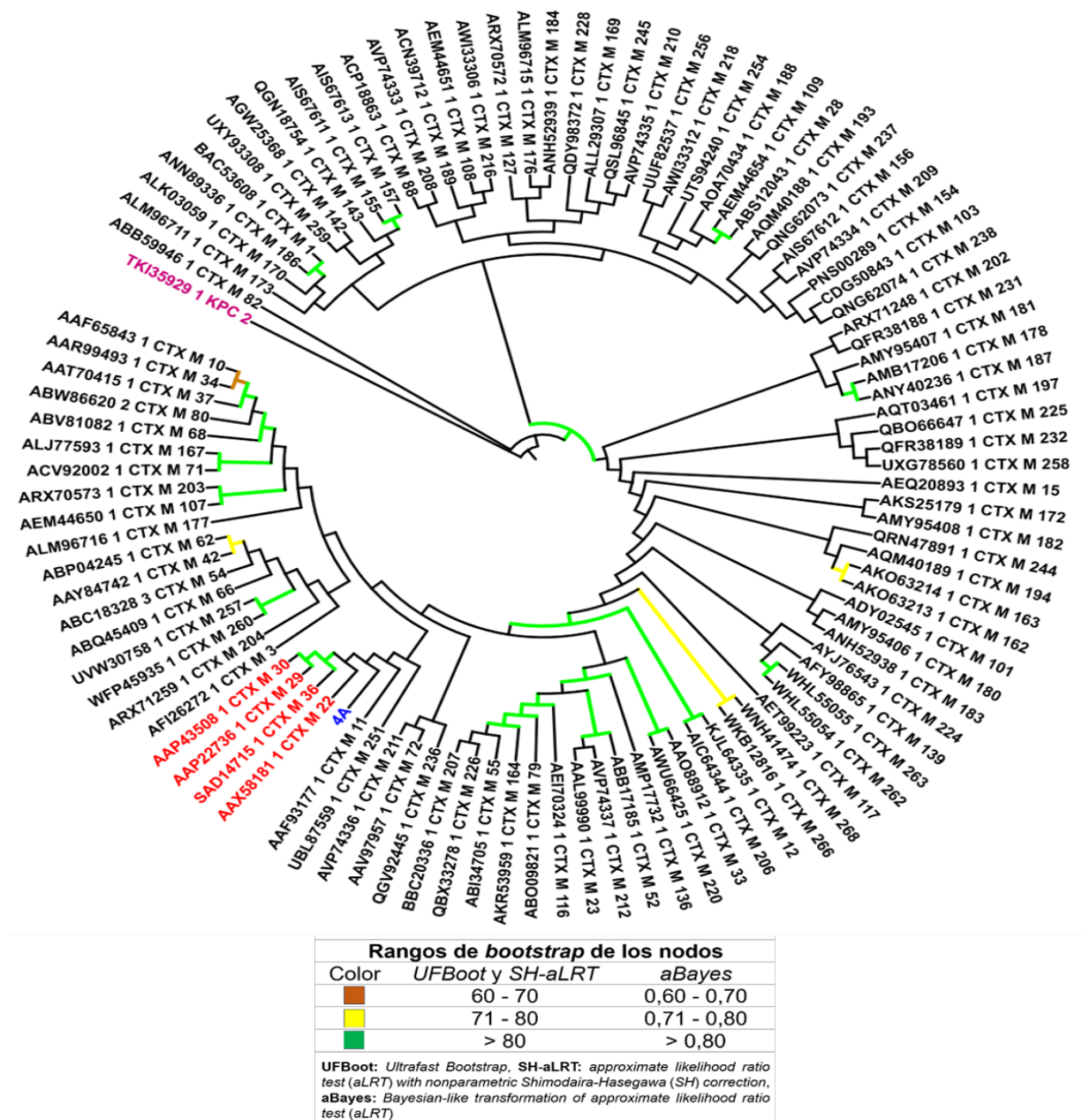
| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
| Orange                                  | 60 - 70          | 0,60 - 0,70 |
| Yellow                                  | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
| Green                                   | > 80             | > 0,80      |

**UFBoot:** Ultrafast Bootstrap, **SH-aLRT:** approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, **aBayes:** Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 57. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de  $\beta$ -lactamasa tipo CTX-M-1-like detectada en la muestra de AS 3E.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo las secuencias de las variantes más filogenéticamente próximas, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBoot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 39 secuencias tipo CTX-M para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

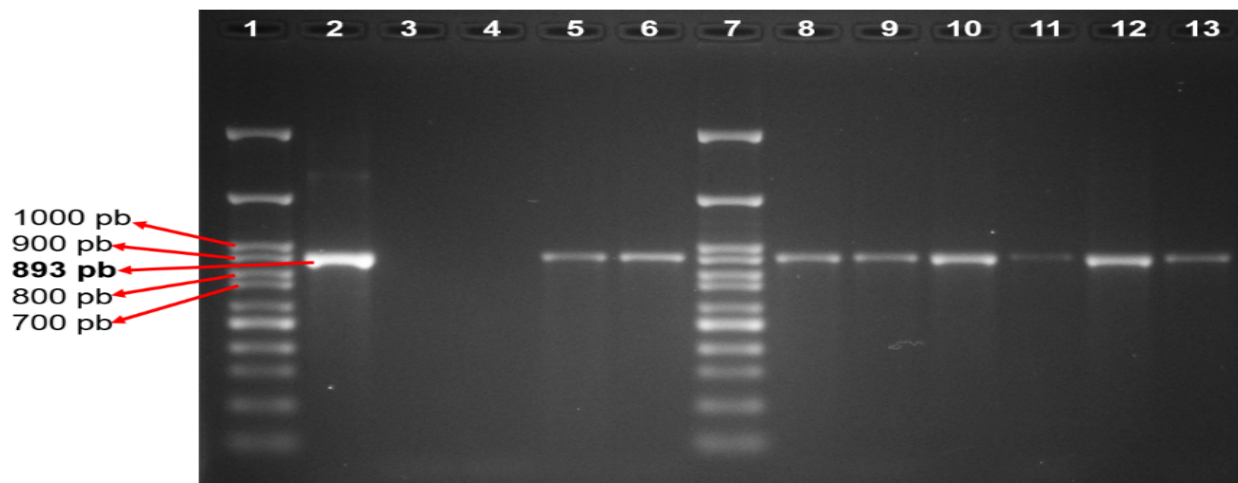
Fuente: Elaboración propia.



**Figura 58. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de  $\beta$ -lactamasa tipo CTX-M-1-like detectada en la muestra de AS 4A.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo las secuencias de las variantes más filogenéticamente próximas, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBboot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 101 secuencias tipo CTX-M para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 59. Detección molecular de *bla*<sub>KPC</sub> en muestras de AS.**

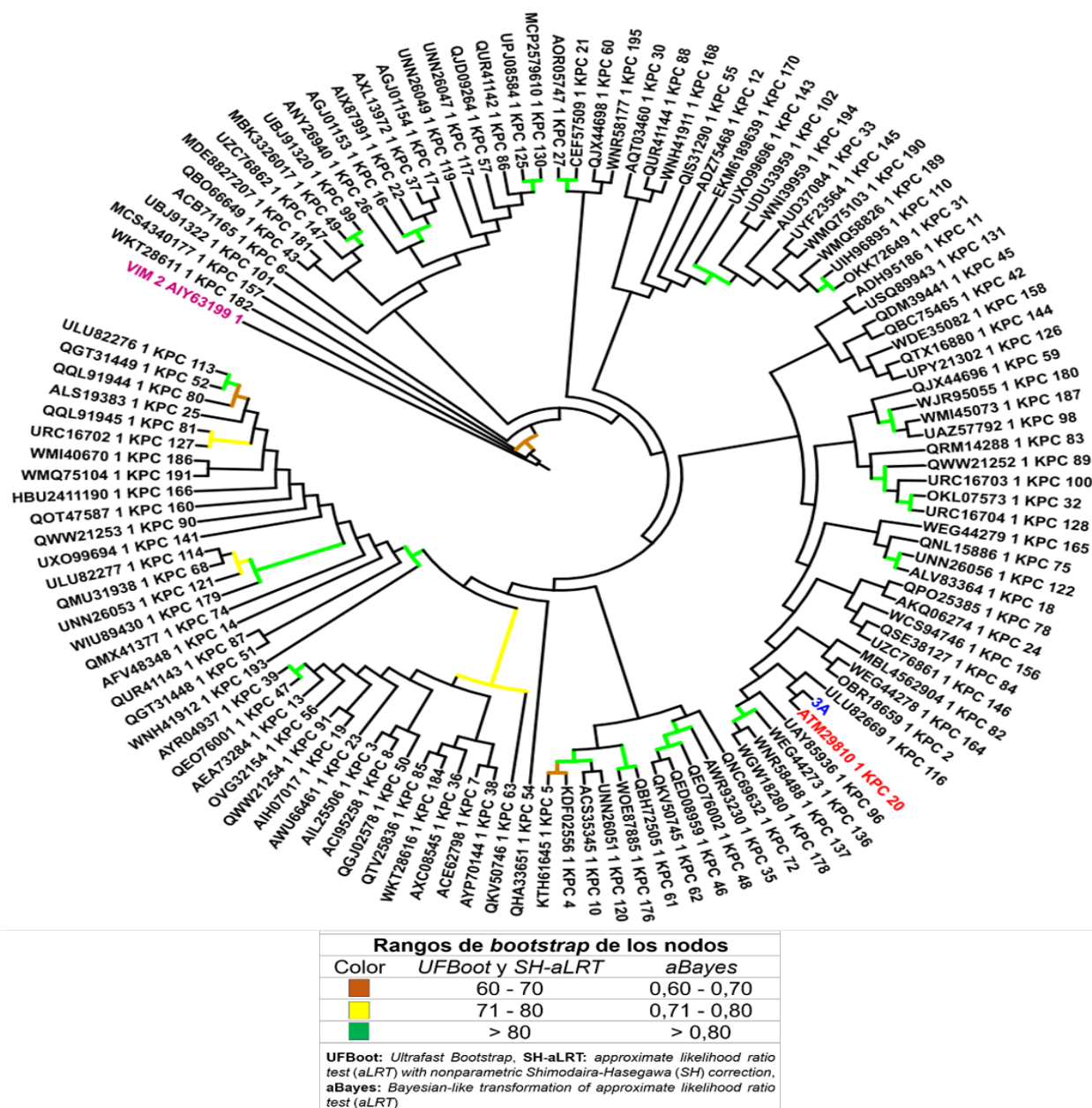
**Carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *E. coli* UCO327 (*bla*<sub>KPC</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>KPC</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** 1A, **carril 6:** 1E, **carril 8:** 2A, **carril 9:** 2E, **carril 10:** 3A, **carril 11:** 3E, **carril 12:** 4A, **carril 13:** 4E, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

### 3.10.5. Detección molecular de *bla*<sub>NDM</sub>.

La detección de *bla*<sub>NDM</sub> resultó negativa en todas las muestras de AS.

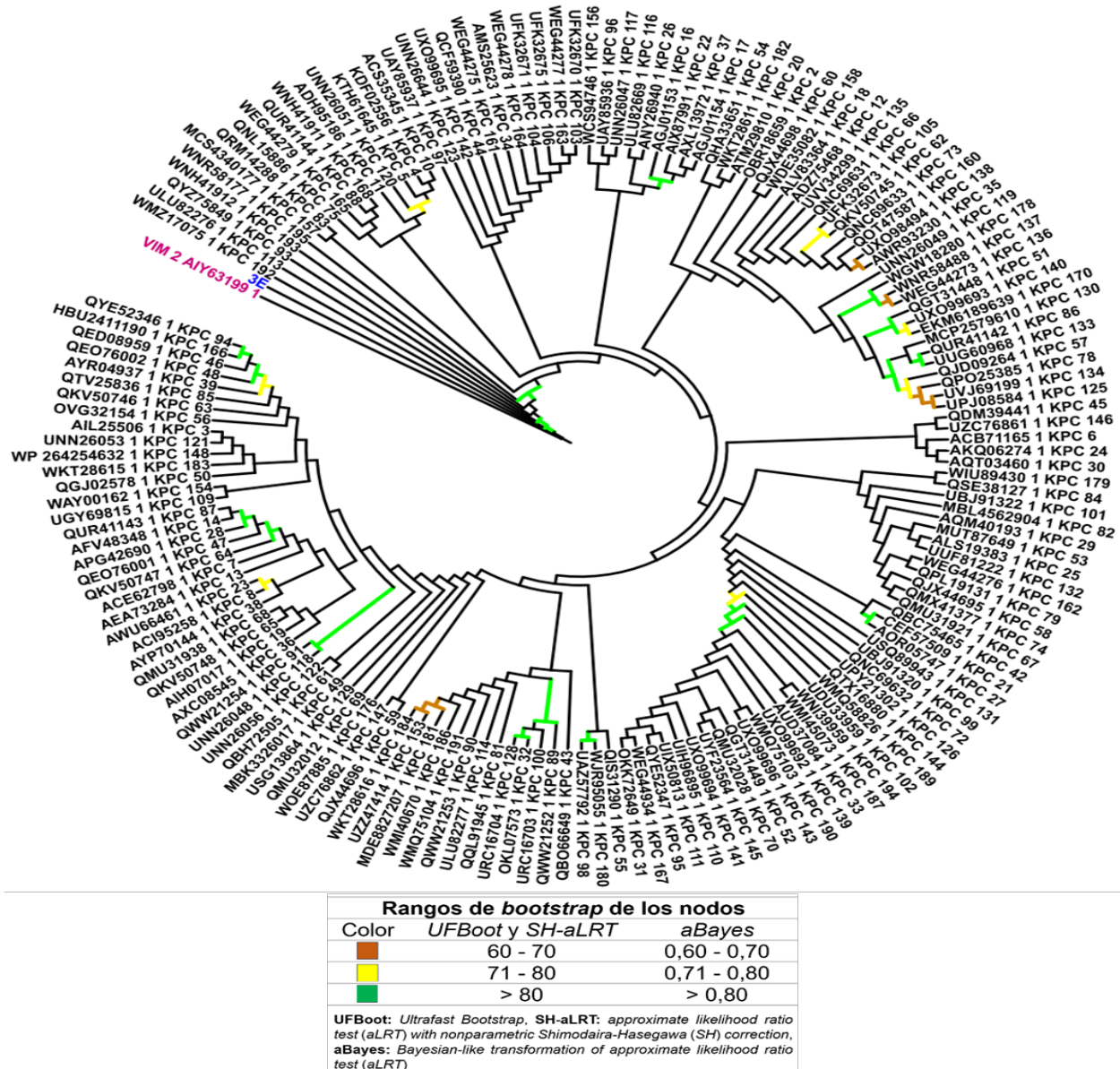




**Figura 60. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo KPC detectada en la muestra de AS 3A.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo la secuencia de la variante más filogenéticamente próxima, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBboot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 123 secuencias tipo KPC para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.



**Figura 61. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo KPC detectada en la muestra de AS 3E.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas UFBoot y SH-aLRT o  $\geq 0,6$  para aBayes. **Nota 3:** se emplearon 165 secuencias tipo KPC para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.

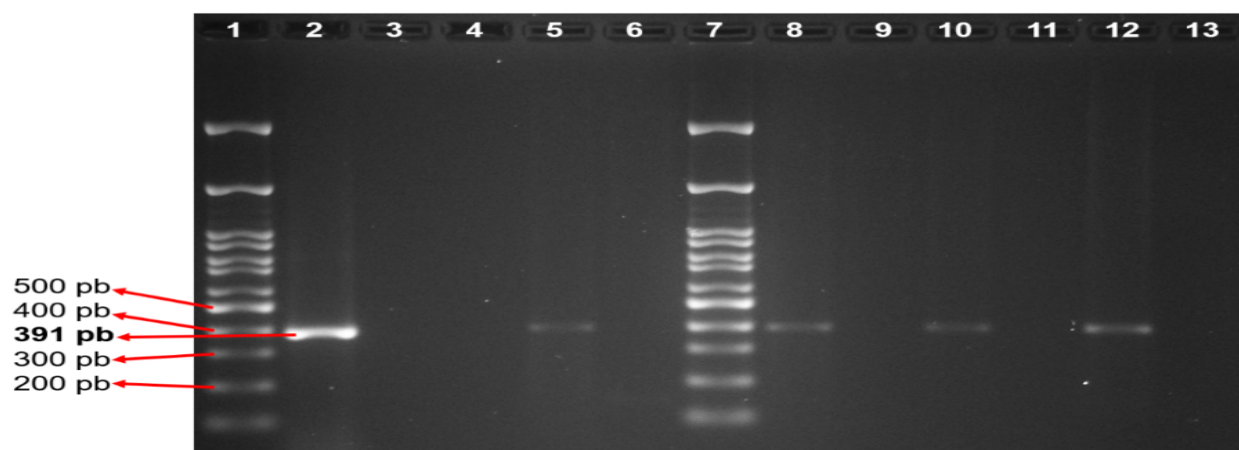
### 3.10.6. Detección molecular de *bla<sub>VIM</sub>*.

En todas las muestras de AF, la reacción de PCR convencional resultó positiva para *bla<sub>VIM</sub>*, mientras que en las muestras de EF resultó negativa (**Figura 62**). La secuenciación tipo Sanger confirmó la detección molecular de dicho gen en las muestras ensayadas (2A y 3A, y 4A), al ingresar sus secuencias nucleotídicas (SNs) consenso en la herramienta *blastn* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)).

La traducción de la SN de 2A en la herramienta EMBOSS Transeq ([https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss\\_transeq](https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/st/emboss_transeq)), junto a un análisis posterior en la base de datos BLDB (Naas et al., 2017), y filogenia molecular de la SA correspondiente, reveló una relación filogenéticamente estrecha con las variantes VIM-51 y VIM-65 (**Figura 63**).

Por otro lado, la traducción de las SNs de 3A y 4A en la herramienta *blastx* ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK\\_LOC=blasthome&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastx](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?LINK_LOC=blasthome&PAGE_TYPE=BlastSearch&PROGRAM=blastx)), seguido de análisis realizados en la base de datos BLDB (Naas et al., 2017), y filogenia molecular de las SAs correspondientes, expusieron asociaciones filogenéticamente próximas con las variantes VIM-46 y VIM-86, en las muestras 3A y 4A respectivamente (**Figuras 64 y 65**).



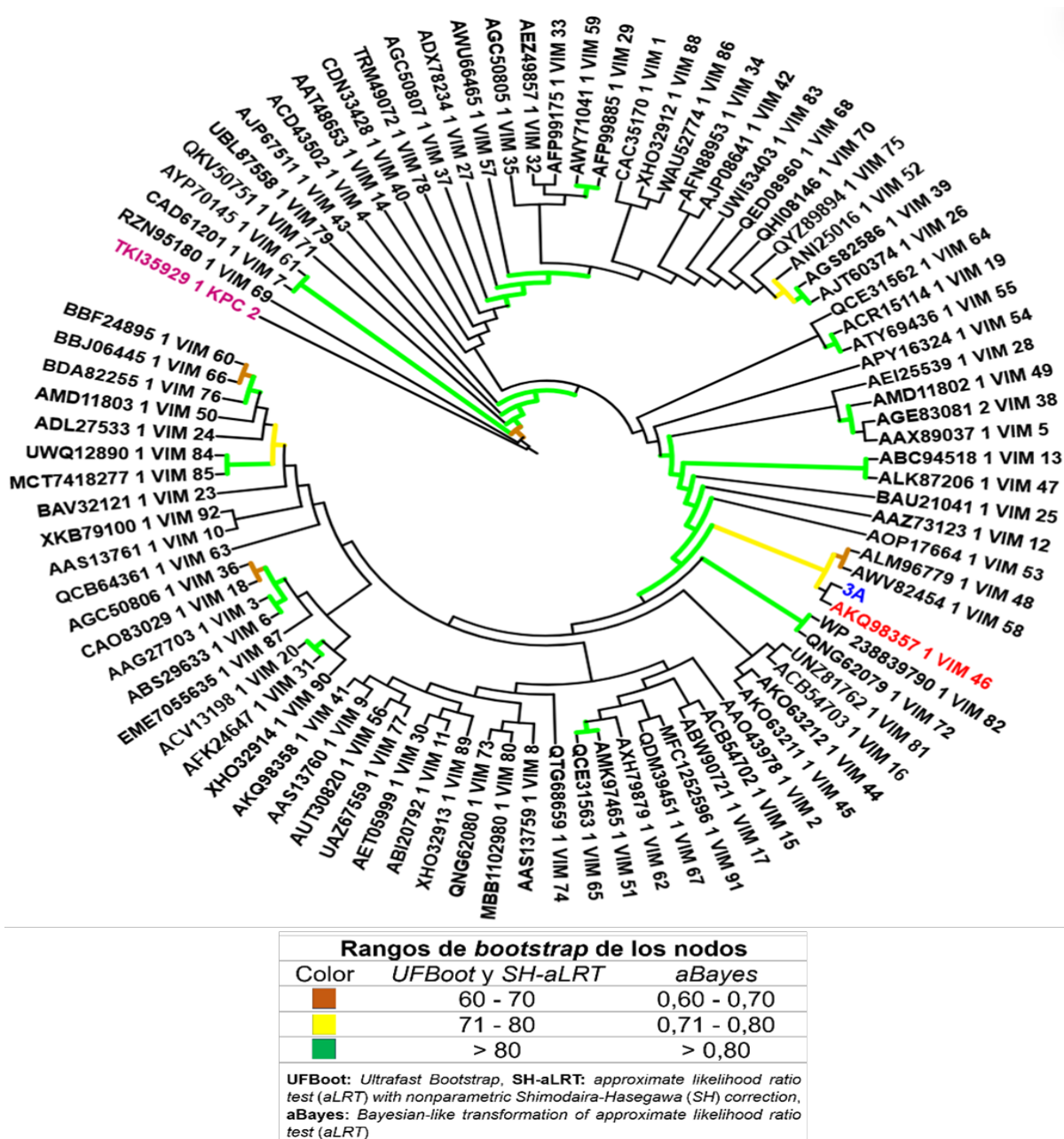


**Figura 62. Detección molecular de *bla*<sub>VIM</sub> en muestras de AS.**

**Carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *P. aeruginosa* UCO236 (*bla*<sub>VIM</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>VIM</sub><sup>+</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** 1A, **carril 6:** 1E, **carril 8:** 2A, **carril 9:** 2E, **carril 10:** 3A, **carril 11:** 3E, **carril 12:** 4A, **carril 13:** 4E, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.

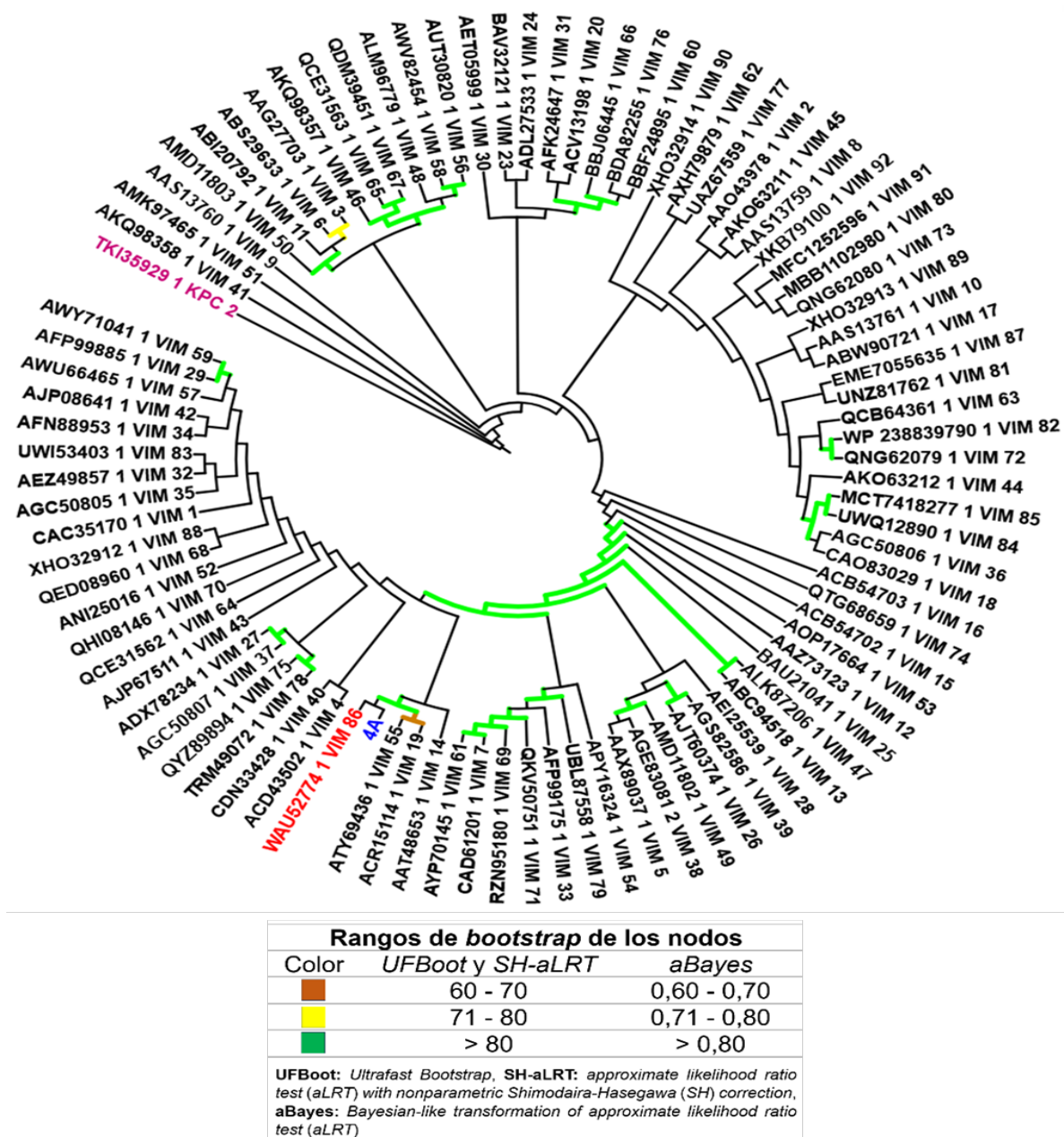




**Figura 64. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo VIM detectada en la muestra de AS 3A.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo las secuencias de las variantes más filogenéticamente próximas, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBoot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 90 secuencias tipo VIM para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia



**Figura 65. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo VIM detectada en la muestra de AS 4A.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo las secuencias de las variantes más filogenéticamente próximas, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBoot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 90 secuencias tipo VIM para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

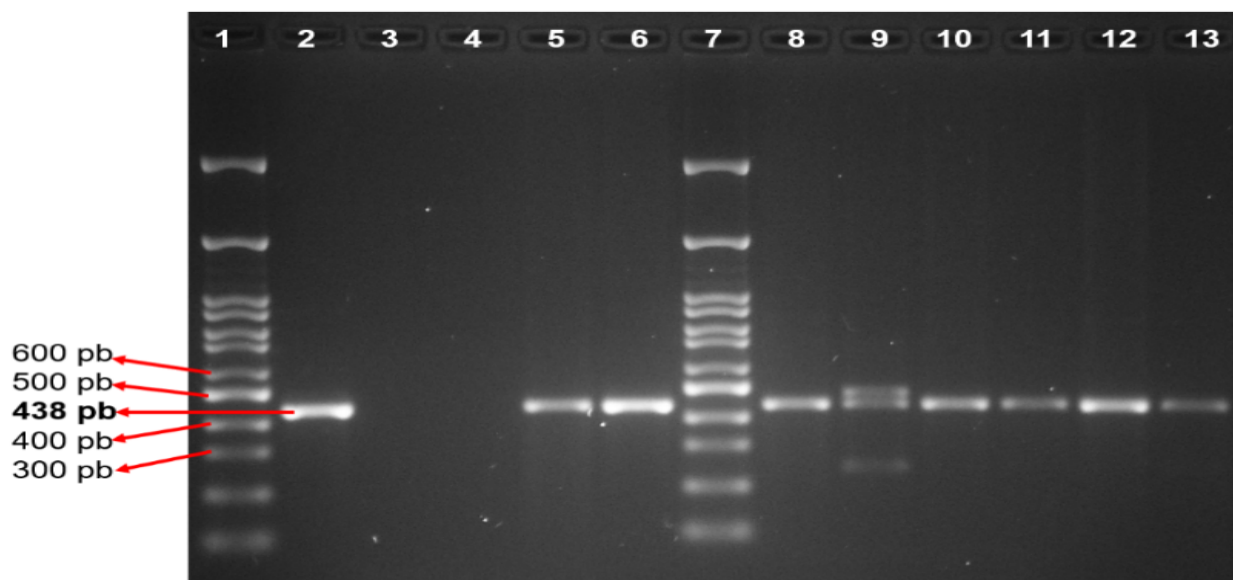
Fuente: Elaboración propia.

### 3.10.7. Detección molecular de *bla*<sub>OXA-48-like</sub>.

La detección del gen *bla*<sub>OXA-48-like</sub> resultó positivo en las ocho muestras de AS. (**Figura 66**). Se observa en las muestras 1A (carril 5), 1E (carril 6), 2A (carril 8), 3A (carril 10), 3E (carril 11), 4A (carril 12), y 4E (carril 13), un producto de amplificación de 483 pb, coincidente con el obtenido en la cepa control *K. pneumoniae* UCO322 (*bla*<sub>OXA-48-like</sub><sup>+</sup>) (carril 2). No obstante, en la muestra 2E (carril 9), se detectaron dos amplicones adicionales al de 483 pb, siendo uno de 500 pb, y otro de 350 pb aproximadamente. Por otro lado, la secuenciación tipo Sanger confirmó la detección molecular de dicho gen en las muestras ensayadas (3E y 4A).

El análisis filogenético efectuado en *IQ-TREE* v2.1.2 (Minh et al., 2020), de la SA de la muestra 3E, estableció una relación próxima con las variantes OXA-244, y OXA-1213, pero no definió la más probable (**Figura 67**), mientras que el análisis filogenético de la SA de la muestra 4A, reveló una relación filogenéticamente estrecha con la variante OXA-505. (**Figura 68**)

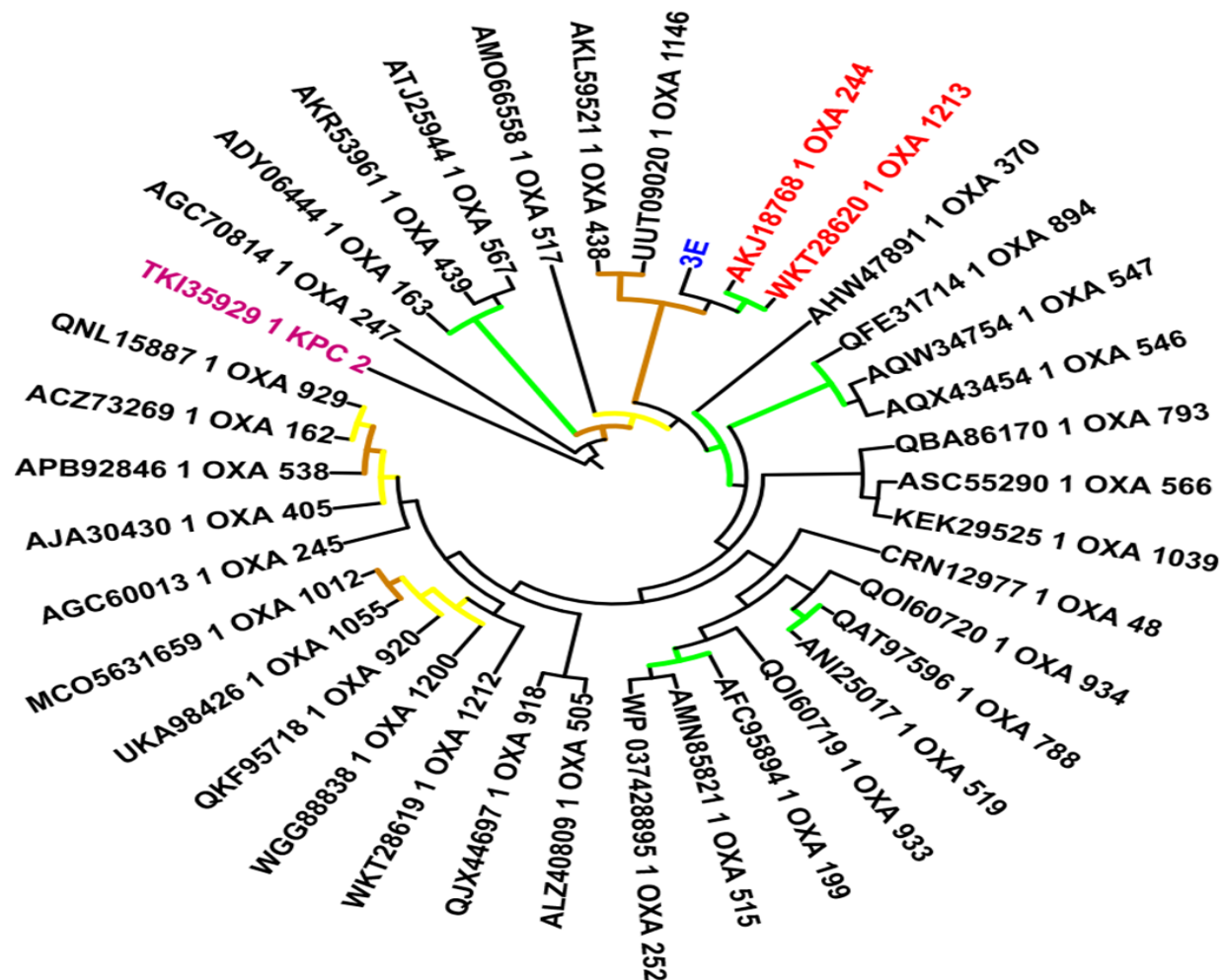




**Figura 66. Detección molecular de *bla*<sub>OXA-48-like</sub> en muestras de AS.**

**Carriles 1 y 7:** *AccuRuler 100 bp Plus DNA RTU Ladder* (MaestroGen), **carril 2:** *K. pneumoniae* UCO322 (*bla*<sub>OXA-48-like</sub><sup>+</sup>), **carril 3:** *S. aureus* ATCC 25923 (*bla*<sub>OXA-48-like</sub><sup>-</sup>), **carril 4:** ALN, **carril 5:** 1A, **carril 6:** 1E, **carril 8:** 2A, **carril 9:** 2E, **carril 10:** 3A, **carril 11:** 3E, **carril 12:** 4A, **carril 13:** 4E, **pb:** pares de bases, **Nota:** en negrita se indica el tamaño molecular del gen en estudio.

Fuente: Elaboración propia.



| Rangos de <i>bootstrap</i> de los nodos |                  |             |
|-----------------------------------------|------------------|-------------|
| Color                                   | UFBoot y SH-aLRT | aBayes      |
| Orange                                  | 60 - 70          | 0,60 - 0,70 |
| Yellow                                  | 71 - 80          | 0,71 - 0,80 |
| Green                                   | > 80             | > 0,80      |

**UFBoot:** Ultrafast Bootstrap, **SH-aLRT:** approximate likelihood ratio test (aLRT) with nonparametric Shimodaira-Hasegawa (SH) correction, **aBayes:** Bayesian-like transformation of approximate likelihood ratio test (aLRT)

**Figura 67. Análisis filogenético mediante máxima verosimilitud de carbapenemasa tipo OXA-48-like detectada en la muestra de AS 3E.**

**Nota 1:** en azul se indica la secuencia de la cepa en estudio, en rojo las secuencias de las variantes más filogenéticamente próximas, y en morado el grupo externo. **Nota 2:** en colores se destacan los nodos con valores de bootstrap  $\geq 60$  para las pruebas *UFBoot* y *SH-aLRT* o  $\geq 0,6$  para *aBayes*. **Nota 3:** se emplearon 37 secuencias OXA-48 para el análisis filogenético, y junto a cada una se indica el número de acceso a GenBank correspondiente.

Fuente: Elaboración propia.





### 3.10.8. Prevalencia de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas.

En la **Tabla 15** se presenta un resumen de todos los genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas detectados en las muestras de aguas servidas del Gran Concepción. Puede observarse que de los 8 GRAs pesquisados se detectaron 4, y fueron los siguientes *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub>.

**Tabla 15.** Resumen de genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas detectados en muestras de AS del Gran Concepción.

| GRAs                               | N° de muestra |    |    |    |    |    |    |    |
|------------------------------------|---------------|----|----|----|----|----|----|----|
|                                    | 1             |    | 2  |    | 3  |    | 4  |    |
|                                    | AF            | EF | AF | EF | AF | EF | AF | EF |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub> | +             | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-2-like</sub> | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-8-like</sub> | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub> | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>bla</i> <sub>KPC</sub>          | +             | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |
| <i>bla</i> <sub>NDM</sub>          | -             | -  | -  | -  | -  | -  | -  | -  |
| <i>bla</i> <sub>VIM</sub>          | +             | -  | +  | -  | +  | -  | +  | -  |
| <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>  | +             | +  | +  | +  | +  | +  | +  | +  |

**GRAs:** genes de resistencia antibiótica, **AF:** afluyente, **EF:** efluente, **Nota:** no se detectó *bla*<sub>SHV</sub> ni *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido en las muestras de aguas servidas.

Fuente: Elaboración propia

#### 4. DISCUSION.

En cuanto a los RBT, los resultados obtenidos indicaron disminuciones significativas (valores de P de comparaciones de Turkey  $< 0,0001$ ), de todos los recuentos de EF en comparación con AF, en todos los periodos de muestreo, con reducciones de entre 5 a 6 logaritmos. Además, hubo reducciones en variados valores logarítmicos de los RBGN, RBGN-C, y de RBGN-M tanto en AF como EF en todos los muestreos. Mientras que la prueba ANOVA de dos vías resultó estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ). Por lo tanto, estos resultados demuestran la efectividad del tratamiento de la PTAS del Gran Concepción en la remoción de bacterias.

Los hallazgos obtenidos son consistentes con lo publicado por Silva et al. (2006), quienes demostraron reducciones  $>99\%$  ( $p < 0,05$ ) en recuentos de coliformes totales, y de coliformes resistentes a ampicilina (AMP), en muestras de EF en comparación con AF, obtenidas entre septiembre de 2001 y julio de 2002 desde una PTAS de Antofagasta. De manera similar Zhang et al. (2015), demostraron disminuciones de 75 - 99% ( $p < 0,01$ ), y 96 - 99% ( $p < 0,01$ ), en recuentos de heterótrofos totales, y de coliformes totales respectivamente, en muestras de EF v/s AF, colectadas desde 3 PTAS diferentes entre marzo y julio de 2012, localizadas en Wuxi, provincia de Jiangsu, China.

En contraste, Hamed et al. (2016) evaluaron recuentos bacterianos totales (RBT), recuentos de *Enterobacteriaceae* totales (RET), recuentos de coliformes totales (RCT), y recuentos de *Salmonella* y *Shigella* (RSST), en muestras de AF y EF obtenidas entre abril de 2011 y enero de 2012 desde una PTAS ubicada en Zagazig, Egipto. Desde lo cual, informaron reducciones en EF en comparación con AF, de 20 - 74% en RBT en todo el periodo de muestreo, de 85% en RET en todo el periodo, (excepto junio y diciembre de 2011 registrándose una reducción de 29 - 37%), y de 11 - 83% en RCT y RSST.

Adicionalmente, Bonetta et al. (2023) detectaron reducciones moderadas en recuentos de heterótrofos totales desde 7 hasta 4 - 5 logUFC/ml, y en recuentos de bacterias resistentes a AMP desde 5,7 - 6,4, hasta 2,1 - 4,5 logUFC/ml, entre muestras de AF y EF, obtenidas entre marzo de 2019 y enero de 2020, desde 3 PTAS ubicadas al noroeste de Italia. En concordancia a lo anterior, de acuerdo con Cirja et al., (2008); Vidal & Araya, (2014) existen factores implicados en la capacidad de las PTAS para la erradicación de contaminantes incluyendo a bacterias, los cuales pueden explicar las diferencias presentadas en las reducciones de los recuentos bacterianos. Entre dichos factores están; el tiempo de retención de lodos (TRL), definido como el tiempo promedio de residencia de los microorganismos al interior de la PTAS, el pH y la temperatura durante el tratamiento, los constituyentes del AS, y el tiempo de contacto y concentración del agente físico o químico empleado durante la desinfección.

Seguidamente, valores de TRL de 8 días o más, se relacionan con una mayor eficacia en la remoción bacteriana. También se ha registrado que las PTAS en países con temperaturas entre 15 - 20°C, consiguen mayores remociones bacterianas, que las PTAS en países con temperaturas < 10°C. En el caso del pH, se ha visto que, a diferentes valores de este, se incrementa la remoción de contaminantes mediante adsorción a los lodos, por lo que su control a lo largo del tratamiento sería importante de manejar. Por otra parte, en la etapa de desinfección, la presencia de sólidos suspendidos y otros elementos orgánicos pueden proteger a los microorganismos, ocasionando que se deban incrementar la concentraciones y tiempos de exposición al agente desinfectante para lograr destruir la vida microbiana. (Cirja et al., 2008; Vidal & Araya, 2014).

De los 205 BGN aislados, 175 fueron de AF, y 30 de EF, lo que se correlaciona con los recuentos obtenidos, al haber recuperado menos bacterias en EF en comparación con AF. Además, lo anterior evidencia que, aunque se detectaron reducciones de entre 5 y 6 logaritmos, en los RBT de AF versus EF en todos los muestreos, de igual manera están sobreviviendo bacterias a la etapa de desinfección con cloro empleada por la PTAS.

Es así como Shekhawat et al. (2020), exploraron dicho fenómeno, realizando estudios de sobrevivencia bacteriana y recrecimiento bacteriano (después de 24 h de incubación), en bacterias Gram negativas recuperadas de EF de una PTAS ubicada en Jaipur, India. Los resultados indicaron que, aunque las dosis letales de cloro de los aislamientos variaron de 0,5 - 1,25 mg/L<sup>-1</sup>, las dosis para provocar la inhibición completa del recrecimiento bacteriano fueron más elevadas (0,75 - 1,75 mg/L<sup>-1</sup>). Seguidamente, las especies que presentaron las mayores dosis tanto letales y de inhibición de recrecimiento fueron *C. freundii*, *Klebsiella* sp., y *Stenotrophomonas maltophilia*. Adicionalmente, en ensayos de cinética de recrecimiento, aplicados a dichas bacterias, se observó un máximo de recrecimiento después de 6 horas de exposición a cloro. (Shekhawat et al., 2020)

Esta capacidad de sobrevivencia al cloro se puede atribuir a respuestas adaptativas de las bacterias frente a dicho compuesto, entre las cuales se encuentran; la activación de chaperonas (Hsp33, RidA, Cnox y poliP), y reguladores transcripcionales (HypT, RclR y NemR), como respuesta inmediata al estrés producido por el cloro. Además, se ha visto un incremento en la producción de biopelículas, e inducción de un estado viable no cultivable (dormancia). Adicionalmente, se ha evidenciado que el cloro puede promover la RA, por medio de la sobreexpresión de bombas de expulsión (poS, marA, ygfA, relE), e inducción de THG. Donde esto último es provocado por la generación intracelular de radicales libres, que incrementan la permeabilidad, y disminuyen la expresión de genes regulatorios globales, estimulando la transferencia conjugativa de plásmidos. (Sultana et al., 2020; da Cruz Nizer et al., 2020).

De los 50 *Enterobacterales* aislados, las especies más frecuentemente detectadas fueron *E. coli* (16/50), *K. pneumoniae* complex (12/50), y *K. oxytoca* complex (6/50), siendo casi la totalidad (48/50). Por otro lado, aunque se aislaron abundantes BGN-NF y BGN-F-Ox[+], estos se excluyeron de esta tesis, debido a que se escapaban del objetivo principal de pesquisa de *Enterobacterales*.

Varios autores han pesquisado *Enterobacterales*, como también BGN-NF y BGN-F-Ox[+] en AS, como, por ejemplo; Silva et al. (2006), quienes aislaron 248 coliformes desde muestras de AF y EF, siendo *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Klebsiella* spp., las especies más frecuentes. Luego. Zhang et al. (2015) aislaron 188 aislados, de los cuales identificaron los géneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* entre otros, en muestras de AF y EF. Seguidamente, Müller et al. (2018) aislaron 659 bacterias, de las cuales *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., y *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex, fueron las especies más frecuentemente detectadas en muestras de AF y EF, colectadas durante septiembre de 2016 y julio de 2017, desde dos PTAS localizadas en Alemania, siendo una de emplazamiento urbano, y la otra rural. Adicionalmente, Sekizuka et al. (2022) recuperaron 404 aislados, de los cuales *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp., y *Aeromonas* spp., resultaron ser las especies más frecuentemente aisladas en muestras de EF, obtenidas entre agosto de 2017 y febrero de 2019, desde 8 PTAS a lo largo del río Tama, y alrededor de la bahía de Tokio, en Japón.

Respecto de la susceptibilidad antibiótica, resaltó el hecho de haber encontrado 7/50 cepas con índices MAR > 0,5, siendo resistentes de 9 a 13 antibióticos de los 16 ensayados. Mientras que 8/50 presentaron perfiles MDR de acuerdo con Jiménez-Pearson et al. (2019). Por otro lado, al observar los perfiles de resistencia, se apreció que las cepas M4/A/C/18, M4/A/C/21, M4/A/C/26, M4/A/C/27, presentaron resistencia a CRO y CTX, por lo que al ser todas *E. coli*, y pertenecer al muestreo N°4, es altamente sospechoso de que correspondan a clones, lo cual podría descifrarse al someter a dichas cepas a técnicas de epidemiología molecular como ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction*), PFGE, MLST, o bien secuenciando su genoma completo (Gebreyes et al., 2020; Tümmeler, 2020).

Entre otros resultados similares, se encuentran lo informado por Zhang et al. (2015), quienes hallaron 46 cepas de *Aeromonas* spp. en AF, y 14 en EF con índices MAR de 0,75 y 0,63 respectivamente, así como también 2 cepas de *Providencia* spp. en AF y, 4 en EF con MAR de 0,58 y 0,51 respectivamente.

Paralelamente en AF encontraron 2 cepas de *Citrobacter* spp., 6 de *Enterobacter* spp., 1 de *Escherichia* sp., 2 de *Klebsiella* spp., y 5 de *Proteus* spp., con MAR que oscilaron entre 0,62 y 0,78. Mientras que, en EF, además identificaron 4 de cepas de *Pseudomonas* spp., y 1 de *Serratia* sp. con índices de 0,73 y 0,69, respectivamente. Por otra parte, Müller et al. (2018), comunicaron el aislamiento de 4 cepas de *P. aeruginosa* obtenidos de EF, con perfiles XDR de acuerdo con Magiorakos et al. (2012), resistentes a 9/10 antibacterianos ensayados. Posteriormente, Araújo et al. (2021) informaron 34 cepas de *Enterobacterales* aislados de muestras de AF, obtenidas entre junio y septiembre de 2020, desde una PTAS ubicada al norte de Portugal. Las bacterias aisladas en este estudio pertenecieron a los géneros *Lelliottia*, *Leclercia*, *Citrobacter*, y *Enterobacter*, las cuales se destacaron por presentar resistencia a entre 11 a 14 antibióticos de 18 ensayados. Así también, Mutuku et al. (2022) informaron 26 *Enterobacterales* recuperados de muestras de AF, de lodos activados (LA), y de lodos digeridos (LD), colectados durante 2019 y 2020, desde una PTAS localizada en la ciudad de Pécs, al suroeste de Hungría. De estos aislamientos, 9 de AF, 12 de LA, y 5 de LD, presentaron índices MAR de 0,59; 0,51 y 0,56, respectivamente. Mientras que 4/9 de AF, 8/12 de LA, y 2/5 de LD, tenían perfiles MDR de acuerdo con Rabbani et al. (2017).

En relación con la detección de BLEE, 24/50 de las cepas resultaron positivas a la detección fenotípica de dicho mecanismo de resistencia (23/48 de AF y 1/2 de EF). No obstante, de entre los aislamientos positivos, la cepa *C. freundii* s.str. M4/A/C/32, no resultó portadora genes codificantes de BLEE. Mientras que la cepa *K. pasteurii* M2/A/C/34, resultó negativa a la detección fenotípica de BLEE, pese a portar el gen codificante *bla*<sub>CTX-M-177</sub>. (se efectuaron 2 réplicas de la prueba fenotípica de BLEE en ambas bacterias). De acuerdo con Poulou et al., (2014) y Perera et al., (2023), resultados falsos positivos y negativos, pueden ser debido a la coportación de múltiples genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas como BLEEs, AmpCs plasmídicas, AmpCs cromosómicas desreprimidas, y/o carbapenemasas, por lo que la presencia de *bla*<sub>KPC-2</sub> en las dos cepas, así como de *bla*<sub>CMY-48</sub>, así como de otro gen no detectado mediante SGC en M4/A/C/32, podría explicar las ambigüedades encontradas.

Acerca de la detección molecular de *bla*<sub>TEM</sub> de espectro extendido, 1/8 cepas resultó positivas. Luego, en el caso de *E. coli* M4/A/C/26, su filogenia no permitió esclarecer la identidad de TEM, sugiriendo la posibilidad de tratarse una variante nueva. Mientras que en el caso de las cepas *E. coli* M2/A/C/35, *K. pneumoniae* complex M3/A/M/4, y *K. pneumoniae* complex M4/A/C/17, tampoco fue posible determinar la identidad de sus variantes de TEM. De modo que para estas 4 bacterias sería necesario efectuarles PCR convencional, empleando partidores que provean un amplicón de tamaño más próximo al del gen en estudio (1000 pb aproximadamente), seguido de secuenciación tipo Sanger, y filogenia molecular, o bien de ser posible secuenciar su genoma completo. (Tajbakhsh et al., 2016; Hasan Ejaz et al., 2021).

La familia *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub> se encuentra integrada por las variantes *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>CTX-M-40</sub>, y *bla*<sub>CTX-M-63</sub> (Naas et al., 2017), de las cuales, la primera fue detectada por primera vez en Chile, en 3 cepas de *E. coli* aisladas de hisopado cloacal de búhos salvajes, originarios de las ciudades de Concepción, Yungay, y San Fabián (Fuentes-Castillo et al., 2019). En concordancia con aquello, la SGC de la cepa *E. coli* M1/A/C/29 reveló la presencia de *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, por lo que este correspondería al segundo hallazgo de esta variante en Chile, así como el primero en AS.

La SGC de M1/A/C/29 también determinó la portación del gen *bla*<sub>EC-like</sub>, de codificación cromosómica, conformado por cerca de 2281 variantes, siendo la mayoría de espectro reducido, y algunas como; *bla*<sub>EC-7</sub>, *bla*<sub>EC-8</sub>, *bla*<sub>EC-9</sub>, *bla*<sub>EC-10</sub>, *bla*<sub>EC-11</sub>, y *bla*<sub>EC-12</sub>, de espectro extendido (Schmidt et al., 2023). Además, el análisis genómico efectuado, demostró un 98% de identidad con la variante *bla*<sub>EC-15</sub> de espectro extendido, cuyo porcentaje fue ratificado, al ejecutar un alineamiento mediante *MultAlin* (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>), entre las proteínas EC-like de M1/A/C/29, y EC-15 del *National Center for Biotechnology* (NCBI), observándose una diferencia de 6 aminoácidos entre ambas proteínas. Por lo que este, correspondería al primer registro chileno de tal familia de  $\beta$ -lactamasas, así como también de una posible variante nueva. Por otra parte, M1/A/C/29 resultó pertenecer al ST540, el cual se encuentra registrado en 145 genomas de *E. coli* de diversos países del mundo (Olson et al., 2022), no habiendo ninguna otra descripción de Chile.

Esto sugiere que tal cepa o bien un ancestro de esta, probablemente fue traída desde el extranjero, por lo que sería necesario efectuar una filogenia, junto a dichos 145 genomas, para poner a prueba tal hipótesis. Además, M1/A/C/29 se destacó por presentar un amplio viruloma, compuesto de 12 genes, en contraste con los únicos 2 GRAs encontrados. Finalmente, M1/A/C/29 presentó los plásmidos IncHI2, IncI1-I(Alpha), y Col8282, los cuales se hallan distribuidos ampliamente en especies del orden *Enterobacterales* (Mandal & Paul, 2019). Siendo IncHI2 destacable por su capacidad de transportar no solo GRAs de diferentes familias, sino también genes de resistencia a metales pesados, y a desinfectantes (Algarni et al., 2024). Seguidamente, IncI1-I(Alpha) se asocia principalmente a genes codificantes de BLEE (Hurtado et al., 2022; De Koster et al., 2023). Mientras que Col8282, perteneciente a la familia Col-like, ha incrementado su reporte progresivamente como transportadores de GRAs, postulándose como elementos versátiles de captura de genes (Cerdeira et al., 2019).

Respecto de hallazgos de similar naturaleza, se encuentran el trabajo de Alouache et al. (2014), quienes obtuvieron muestras de AF y EF, en 3 días diferentes de marzo de 2010, desde una PTAS ubicada en Boumerdes, Algeria. Logrando aislar 21 *Enterobacterales* portadores de la familia *bla*<sub>CTX-M</sub>, siendo 14 originarias de AF (5 *E. coli*, y 9 de *K. pneumoniae*), y 7 de EF (1 *E. coli* y 6 *K. pneumoniae*). Mientras que *bla*<sub>CTX-M-3</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> fueron las variantes encontradas, siendo esta última la predominante (15/21). Luego Čornejová et al. (2015), recolectaron muestras de AF y EF, en 2011 - 2013 predominantemente entre abril y noviembre, desde una PTAS localizada en Slovakia. Ellos aislaron 9 cepas de *E. coli* portadoras de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, habiendo además, 1/9 co-portando *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub>. Consecutivamente, Conte et al. (2017), comunicaron que 19 cepas de *Enterobacterales* (12 *E. coli* y 7 *K. pneumoniae*), eran portadoras de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, recuperados de muestras de AF, del tanque de aireación, y de EF, desde una PTAS ubicada en Curitiba, Brasil, en periodos de escasas precipitaciones, entre octubre de 2012 y julio de 2013. Mientras que *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub> fue el gen más frecuentemente detectado (12/19 cepas), seguido de *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub> (4/19 cepas), *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub> (2/19), y *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> (1/19), respectivamente.



Posteriormente, Jiang et al. (2019), secuenciaron el genoma completo de 18 cepas de *E. coli* portadoras de genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, recuperadas de muestras de lodos activados en abril de 2017, desde el tanque de aireación de una PTAS localizada en Taizhou, China, identificando las variantes, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-14</sub>, *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, y *bla*<sub>CTX-M-55</sub>, en 11, 9, 4, y 1 cepas, respectivamente. Finalmente, Soni et al. (2024) recuperaron 3 cepas portadoras de la familia *bla*<sub>CTX-M</sub>, desde muestras de AF (2/3), y de la salida del biorreactor (1/3), de una PTAS emplazada en Lucknow, India, en marzo de 2022.

En el caso del escrutinio de carbapenemasas, las cepas *K. pasteurii* M2/A/C/34, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, y *C. freundii* s.str. M4/A/C/32, resultaron positivas para KPC, detectándose mediante SGC el gen codificante *bla*<sub>KPC-2</sub> en todas ellas. Las tres cepas resultaron no susceptibles (resistentes o intermedias) a la mayoría de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos probados, a excepción de M4/A/C/32 y M2/A/C/34, que fueron susceptibles a CAZ y FOX, respectivamente. Tal discrepancia podría ser producto de cambios aminoacídicos en la KPC sintetizada por M4/A/C/32 y M2/A/C/34, reduciendo su actividad hidrolítica específica frente a CAZ y FOX (Mehta et al., 2015; Parwana et al., 2024; Sanz et al., 2024). Las tres cepas presentaron perfiles MDR de acuerdo con Jiménez-Pearson et al. (2019). La cepa M3/A/M/3 destacó por demostrar los valores más altos de MAR (0,81) y MIC frente a IPM ( $\geq 32$   $\mu$ g/ml), debido posiblemente a la superior actividad hidrolítica de la KPC producida por M3/A/M/3 frente a IPM, en comparación con las KPC producidas por las otras dos cepas (Yoon et al., 2020).

La SGC también identificó otros genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas, incluyendo un gen de BLEE en la cepa M2/A/C/34, y otro de betalactamasa AmpC plasmídica en M4/A/C/32. Por otro lado, aunque se encontraron genes codificantes de enzimas modificantes de aminoglucósidos (EMAs) en las tres cepas, M2/A/C/34 presentó susceptibilidad a GEN y AMK. Dicha ambigüedad puede ser explicada debido a la presencia del gen *aac(6')-Ib-cr*, que confiere susceptibilidad disminuida a quinolonas en diferentes niveles, (Shin et al., 2009; Elgorriaga-Islas., et al 2012), y a AMK, tobramicina, kanamicina, pero no a GEN (Vaziri et al., 2011; Bodendoerfer et al., 2020).

No obstante, de acuerdo con Kim et al., (2009); (2011), la resistencia fenotípica a kanamicina no siempre se expresa, debido a cambios aminoacídicos en la enzima, que afectan su capacidad acetilante frente a tal antibiótico.

El análisis de MLST determinó que las cepas *K. pasteurii* M2/A/C/32, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3 y *C. freundii* s.str M4/A/C/32 pertenecen a los STs ST470, ST273 y ST214, respectivamente, los cuales no habían sido detectados en Chile hasta ahora. Además, este estudio representa el primer registro en Chile de la especie *K. pasteurii*. El ST273 se encuentra distribuido mundialmente, tal como se observó en el análisis filogenómico de M3/A/M/3. Por otro lado, el ST470 se ha detectado únicamente en una cepa de *K. pasteurii* aislada en 2014 desde bovino en Japón (Jolley et al., 2018). Mientras que el ST214, ha sido encontrado en dos cepas de *Citrobacter* sp. aislados en China, de origen humano y alimentario, en los años 2015 y 2017, respectivamente (Jolley et al., 2018).

Los plásmidos más frecuentemente encontrados en las tres bacterias pertenecieron a los grupos IncFIB e IncP, caracterizados por su amplio rango de hospedero, que abarca diversas varias especies de *Enterobacterales*, e incluso bacilos no fermentadores como *P. aeruginosa* (Mandal & Paul, 2019). Así también, de entre los plásmidos detectados, IncFIB(K), encontrado en *K. pasteurii* M2/A/C/32 y en *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, se ha asociado a los genes *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, y *bla*<sub>OXA-9</sub> (Boettger et al., 2023; Furlan et al., 2023; Russo et al., 2024). Adicionalmente, IncFIB(pQil) detectado en M3/A/M/3, se ha relacionado a los genes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> y *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (Su et al., 2020; Takei et al., 2022; Zeng et al., 2022). Por otra parte, el grupo IncP6 fue identificado en las cepas M2/A/C/32 y M4/A/C/32, el cual se ha relacionado a *bla*<sub>KPC-2</sub> principalmente (Li et al., 2023; Wang et al., 2023; Abril et al., 2024; Viñes et al., 2024). Adicionalmente, *C. freundii* s.str M4/A/C/32 destacó por presentar el mayor resistoma y viruloma de entre las tres cepas. Esto resulta particularmente interesante, ya que las cepas de *Citrobacter* spp. suelen ser informadas solo ocasionalmente como patógenos nosocomiales, con baja virulencia y generalmente susceptibles a carbapenémicos, aminoglucósidos y tetraciclinas, en contraste con lo observado en las cepas M4/A/C/32, aislada en esta tesis (Zhao et al., 2021).

El análisis filogenómico de *K. pasteurii* M2/A/C/34, reveló que esta comparte un antepasado común con las cepas KO-14-71 y GD0485, debido a la formación de un clado principal entre las tres bacterias. Mientras que, desde dicho clado, se formó un segundo grupo monofilético entre estas cepas bacterianas, excluyendo a M2/A/C/34. Por tal motivo, se infiere que posiblemente KO-14-71 y GD0485 sean clones; sin embargo, no se puede afirmar lo mismo al considerar las tres bacterias. Así pues, es posible que en un momento entre el 2014 (año de aislamiento de KO-14-71), y 2022 (año de aislamiento de M2/A/C/34), el antepasado común de las tres cepas bacterianas, o bien una bacteria descendiente, haya sido transportada hasta Chile, permitiendo la emergencia de M2/A/C/34. Por otra parte, la filogenia de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* M3/A/M/3, determinó que esta comparte un ancestro común con la cepa RBL-17-103-2, estableciéndose un grupo monofilético, por lo que se infiere que ambas posiblemente sean clones. De manera que, en un momento entre el 2020 y 2022, la cepa RBL-17-103-2 fue trasladada desde Alemania hasta Chile, adquiriendo en este último país el gen *bla*<sub>KPC-2</sub>, mediante THG desde una bacteria autóctona portadora de dicho GRA. Puesto que originalmente la cepa alemana no presentaba tal GRA, ni tampoco otros genes codificantes de carbapenemasas (Adler et al., 2016; Conlan et al., 2019; Rada et al., 2020).

Respecto de registros similares de *bla*<sub>KPC</sub>, así como de otros genes codificantes de carbapenemasas en AS, está el trabajo de Mesquita et al. (2021), quienes identificaron genómicamente una cepa de *K. oxytoca* portadora de *bla*<sub>KPC-3</sub>, de un total de 161 *Enterobacterales* recuperados entre 2016 y 2019, desde AS de 2 PTAS ubicadas en Portugal. También, Shin et al. (2021), de igual manera, identificaron genómicamente una cepa de *E. coli* portadora de *bla*<sub>NDM-5</sub>, de un total de 50 aislados obtenidos desde AF de una PTAS emplazada en Seul, Corea. Después, Tiwari et al. (2022), reportaron 59 bacilos Gram negativos productores de carbapenemasas (BGNPC) en muestras de AS, obtenidas entre octubre de 2011 y agosto de 2012 de una PTAS en Finlandia, de los cuales 51/59, 6/59, y 2/59 fueron portadores de *bla*<sub>GES-like</sub> (*Guiana extended-spectrum carbapenemase*), *bla*<sub>KPC-like</sub>, y *bla*<sub>VIM-like</sub>, respectivamente.

Posteriormente, Aristizabal-Hoyos et al. (2023), aislaron 116 cepas portadoras de genes codificantes de carbapenemasas, desde AS de una PTAS localizada en Colombia, entre noviembre de 2018 y abril de 2019. Mientras que de 54 aislados de AF, 52 fueron portadores de *bla*<sub>KPC-like</sub>, y 2 de *bla*<sub>VIM-like</sub>. Por otro lado, de 56 bacterias de EF, 52 fueron portadores de *bla*<sub>KPC-like</sub> al igual que en AF, 3 coportadoras de *bla*<sub>KPC-like</sub> + *bla*<sub>VIM-like</sub>, y una de *bla*<sub>NDM-like</sub>. Recientemente, Puljko et al. (2024) secuenciaron genómicamente 13 cepas de en *Enterobacterales* productores de carbapenemasas, aislados de EF de una PTAS emplazada en Zagreb, Croacia, detectándose las variantes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, y *bla*<sub>IMP-13</sub>, en 7/13, 1/13, 4/13, 1/13, y 1/13, respectivamente. Finalmente, Nasser-Ali et al. (2024), informan 252 BGNPC desde muestras de AS, obtenidas entre abril de 2020 y febrero de 2022 de una PTAS en España, de los cuales 55 BGNPC, fueron secuenciadas genómicamente (SGC), lográndose identificar las variantes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>GES-5</sub>, *bla*<sub>GES-6</sub>, *bla*<sub>VIM-2</sub>, *bla*<sub>IMP-11</sub>, *bla*<sub>IMP-28</sub>, *bla*<sub>OXA-24</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-58</sub>, y *bla*<sub>OXA-217</sub>, en 34/55, 7/55, 1/55, 5/55, 1/55, 3/55, 2/55, 5/55, 1/55, 1/55 cepas, respectivamente.

En cuanto a la detección de genes codificantes de BLEE y carbapenemasas directamente desde las muestras de AS, se encontró el gen *bla*<sub>SHV</sub> en todas las muestras analizadas. Sin embargo, no fue posible determinar si estas variantes correspondían a betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Una situación similar se observó con el gen *bla*<sub>TEM</sub>. Por otra parte, entre los grupos de *bla*<sub>CTX-M</sub> analizados, únicamente *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> fue pesquisado en todas las muestras. Sin embargo, los análisis filogenéticos de CTX-M-1-like en 3E y 4A, no lograron identificar las variantes más probables. En este sentido, para esclarecer las ambigüedades halladas, sería necesario emplear PCR convencional, utilizando partidores que generen un amplicón de tamaño más cercano al de los genes *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, y *bla*<sub>TEM</sub> (1000 pb aproximadamente), seguido de secuenciación tipo Sanger, y análisis filogenético molecular, Alternativamente, se podría optar por la secuenciación del metagenoma de cada muestra de aguas servidas (Tajbakhsh et al., 2016; Davis et al., 2023).

Los hallazgos de *bla<sub>SHV</sub>* y *bla<sub>TEM</sub>* son concordantes con lo informado por Makowska et al. (2020), quienes estimaron abundancias relativas de dichos genes en muestras de AF, del tanque de aireación, y de EF, obtenidas entre marzo de 2015 y enero de 2017, de una PTAS ubicada en Kozięglowy, Polonia. Además, se apreció mayores abundancias relativas de *bla<sub>SHV</sub>* en EF, en contraste con las otras muestras, junto con abundancias similares de *bla<sub>TEM</sub>* en todas las muestras. En el caso de los genes *bla<sub>CTX-M</sub>* investigados, la detección de *bla<sub>CTX-M-1-like</sub>* fue consistente con lo informado por varios autores, pero contrastante respecto de los demás grupos de *bla<sub>CTX-M-like</sub>* indagados. Así, Schages et al. (2020) determinaron abundancias absolutas de varios genes codificantes de beta-lactamasas, en muestras de AF, lodos activados, y EF, obtenidas entre mayo de 2018 y abril de 2019, de una PTAS emplazada en el distrito de Kleve, Alemania. Entre los genes evaluados, se encontraron *bla<sub>CTX-M-1-like</sub>*, y *bla<sub>CTX-M-9-like</sub>*, presentando el primero una distribución de abundancia en el orden AF > LA > EF. Por su parte, *bla<sub>CTX-M-9-like</sub>* mostró una mayor abundancia en AF en comparación con EF, mientras que no fue detectado en LA. De manera similar, Dropa et al. (2024), investigaron varios genes codificantes de betalactamasas en muestras de AF, EF secundario y EF final, recolectadas entre agosto de 2017 y julio de 2018, en una PTAS ubicada en Sao Paulo, Brasil. Entre los genes evaluados, *bla<sub>CTX-M-1-like</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2-like</sub>*, *bla<sub>CTX-M-8-like</sub>*, y *bla<sub>CTX-M-9-like</sub>*, fueron detectado con diferentes frecuencias en todas las muestras, excepto *bla<sub>CTX-M-8-like</sub>*, que no fue identificado en EF final, pero si en AF, y EF secundario.

Se detectó *bla<sub>KPC</sub>* en todas las muestras, mientras que la filogenia de la proteína detectada en la muestra 3A, estableció una relación próxima con la variante KPC-20, informada previamente por Moghnia et al. (2021) en dos cepas de *E. coli*, aisladas de hisopado rectal de manipuladores de alimentos en Kuwait, y también por Zouaoui et al. (2023), en una cepa de *K. pneumoniae*, aislada de catéter de un paciente ingresado en una UCI, del hospital de Ben Arous en Tunicia. Por el contrario, la filogenia de la proteína identificada en la muestra 3E no permitió inferir con certeza la variante más probable, lo que sugiere que podría tratarse de una nueva variante.

La detección de *bla*<sub>KPC</sub> en todas las muestras de AS, es consistente con lo reportado por Yang et al. (2016), quienes determinaron abundancias relativas de varios genes codificantes de carbapenemasas en muestras de AS y de lodos, de varias etapas de tratamiento, de una PTAS ubicada en Tianjin, China, encontrándose *bla*<sub>KPC</sub> en todas las muestras. Además Dropa et al. (2024), encontraron el mencionado gen en todas las muestras de AF, EF secundario, y EF final, al igual que los diferentes genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, con excepción de *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub>. Seguidamente, se destacó la detección de *bla*<sub>VIM</sub> en todas las muestras de AF, pero no en EF, lo cual contrasta con lo reportado por Yang et al. (2016), quienes no detectaron *bla*<sub>VIM</sub> en ninguna muestra de AS ni tampoco desde lodos. Por el contrario, Srathongneam et al. (2024), evaluaron las abundancias relativas de genes de resistencia a varias clases de antibacterianos, incluyendo  $\beta$ -lactámicos, en muestras de AF y EF, recolectadas durante 2022, provenientes de tres PTAS localizadas en Bangkok, Tailandia, y detectaron *bla*<sub>VIM</sub> en todas las muestras analizadas.

Posteriormente, en cuanto a *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, este gen fue detectado en todas las muestras, lo que contrasta con lo reportado por Yang et al. (2016), quienes, al igual que con *bla*<sub>VIM</sub>, tampoco detectaron *bla*<sub>OXA-48-like</sub>. Por su parte, Dropa et al. (2024) identificaron este gen en AF y EF secundario, pero no en EF final, de manera similar a lo observado con *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub>. Adicionalmente, es destacable la aparición de más de una banda de ADN en la muestra 2E, lo cual podría deberse a la presencia de más de una variante *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, de las cerca de 60 identificadas hasta fecha, así como a la portación de más de una variante de Tn1999, de las nueve descritas hasta el momento, siendo Tn1999.2, Tn1999.1, e invTn1999.2 las más frecuentes (Naas et al., 2017b; Sattler et al., 2022). A continuación, en relación con *bla*<sub>NDM</sub>, este gen no fue detectado en ninguna muestra de AS, lo cual discrepa con lo informado por Srathongneam et al. (2024), quienes de manera similar a lo descrito para *bla*<sub>VIM</sub>, encontraron *bla*<sub>NDM</sub> en todas las muestras de AF y EF de las tres PTAS mencionadas. Además, Dropa et al. (2024), detectaron *bla*<sub>NDM</sub> en AF, pero no en EF secundario ni en EF final, a diferencia de lo informado por los autores para *bla*<sub>OXA-48-like</sub> y *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub>.

Los hallazgos de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, y *bla*<sub>KPC</sub> en las muestras de AS fueron concordantes ya que estos genes se detectaron en 21/50 y 3/50 *Enterobacterales* respectivamente. Por otro lado, la ausencia de *bla*<sub>NDM</sub> en AS también fue consistente, dado que dicho gen no se identificó en ninguno de los *Enterobacterales* estudiados.

Por otra parte, la detección negativa de *bla*<sub>CTX-M-2-like</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8-like</sub>, y *bla*<sub>CTX-M-9-like</sub> en AS, resultó discrepante, ya que estos genes fueron identificados en 5/50 *Enterobacterales*. Esta discrepancia podría explicarse por la baja carga genética de dichos genes en las muestras de AS, así como por la insuficiente sensibilidad de la PCR convencional para detectarlos, lo que hace necesario efectuar el uso de qPCR o metagenómica para esclarecer esta anomalía. (Davis et al., 2023; Knight et al., 2024). Posteriormente, se observó una situación diferente con *bla*<sub>VIM</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub>: el primero solo se detectó en las muestras de AF, mientras que el segundo estuvo presente en todas las muestras de AS. Sin embargo, ninguno de los dos genes se encontró en los *Enterobacterales* investigados. Esta discrepancia podría explicarse por la posible presencia de dichos genes en el grupo de 155 aislados excluidos de esta tesis, conformado por BGN-NF y BGN-F-Ox[+]. Por ello, sería necesario indagar *bla*<sub>VIM</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub> con PCR convencional en estas bacterias, para resolver tal discrepancia. Esta hipótesis se respalda en el estudio de Dekić Rozman et al. (2024), quienes identificaron *bla*<sub>VIM</sub> y *bla*<sub>OXA-48-like</sub> en bacilos Gram negativos de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Aeromonas*, aislados de muestras de AS recolectadas de dos PTAS en Zagreb y Varazdin, Croacia, durante 3 días consecutivos en septiembre de 2021.

La presente tesis presenta importantes limitaciones metodológicas, como se detalla a continuación;. Las muestras de AS analizadas se obtuvieron con interrupciones temporales y en periodos de tiempo acotados, siendo ideal haberlas recolectado en meses sucesivos, para así mantener una continuidad y reproducibilidad en la pesquisa de bacterias y de GRAs (Harnisz et al., 2020; Majlander et al., 2021; Bonetta et al., 2023). Además, se estudiaron únicamente AS. Mientras que la inclusión de muestras de lodos habría maximizado la información resultante respecto del funcionamiento de la PTAS (Zhang et al., 2022; J. Wang et al., 2023; Yin et al., 2024).

El método de dilución en agar empleado para el aislamiento bacteriano, únicamente permite la pesquisa de un 2 - 3% de bacterias cultivables dentro de una muestra, siendo requerida la implementación de metagenómica para la detección de bacterias no cultivables (Kang et al., 2022; Ma et al., 2022; Raju et al., 2024). Las pruebas bioquímicas de identificación empleadas a 29/50 cepas de *Enterobacterales* son poco específicas, siendo necesaria la utilización de métodos alternos como, secuenciación del gen *ARNr16S*, secuenciación Multilocus, MALDI-TOF, o SGC para establecer con mayor precisión la identidad de las bacterias (Sloan et al., 2017; Hayashi Sant'Anna et al., 2019; Ferone et al., 2020). Los antibiogramas aplicados a las cepas analizadas, solo evalúan su susceptibilidad de manera cualitativa, siendo necesaria la aplicación de métodos alternos, como epsilometría o microdilución en caldo para obtener valores cuantitativos de CMI (Khan et al., 2019; Benkova et al., 2020). Por otra parte, existe la posibilidad de la existencia de otros genes codificantes de BLEE y/o carbapenemasas presentes en las cepas y/o en las AS, distintos a los indagados, por lo que sería necesario un nuevo tamizaje empleando partidores para otros genes, como, por ejemplo; *bla*<sub>CTX-M-25-like</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>SME</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, o bien aplicar secuenciación genómica en las cepas y/o en las muestras de AS. (Bush & Bradford, 2020; García-Betancur et al., 2021).

En un principio se había considerado la cuantificación de *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, y de *bla*<sub>KPC</sub> mediante qPCR en las muestras de AS. Sin embargo, varios factores llevaron a excluir esta actividad de la tesis: el tiempo invertido en múltiples intentos infructuosos por establecer curvas estándar para cada gen, el alto costo de la Taq polimerasa, los escasos volúmenes de ADN<sub>g</sub> obtenidos de las muestras y la extensión del trabajo más allá de la duración formal del programa de Magíster.

Respecto de otras PTAS de Chile, las altas reducciones halladas de los RBT (5 - 6 logaritmos), RBGN, RBGN-C, y de RBGN-M en AF versus EF, constituyen hallazgos extrapolables a las altas disminuciones de recuentos de coliformes totales (>99%) informadas por Silva et al., (2006), y a las altas reducciones de recuentos de BRA (2 - 4 logaritmos) informadas por Leiva et al., (2024), quienes también encontraron *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, y *sul1* en muestras de EF.



Es así como la pesquisa de dichos genes también es extrapolable a los estudios genéticos aplicados en esta tesis, pues *bla*<sub>TEM</sub>, y *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub> se hallaron tanto en cepas de *Enterobacterales* como en las muestras de AS de AF y EF, mientras que *sul1* fue encontrado en 1/50 cepas.

Aunque los resultados de esta tesis son alentadores, y parcialmente extrapolables a estudios chilenos similares, se requiere llevar a cabo muestreos a una mayor cantidad de PTAS, así como en diferentes regiones de Chile, empleando métodos como los aplicados en este trabajo u otros alternos, para consolidar una visión mas global a nivel de País, sobre la resistencia a antibióticos en AS, recabando abundantes evidencias que propicien la creación de mejores políticas públicas, para enfrentar dicha problemática.

## 5. CONCLUSIONES.

- 1) Los recuentos bacterianos totales (RBT) disminuyeron significativamente entre 5 y 6 logaritmos en todos los muestreos de aguas servidas (AS). Asimismo, los recuentos de bacilos Gram negativos (RBGN), bacilos Gram negativos en agar MCC suplementado con ceftriaxona (4 µg/ml) (RBGN-C) y bacilos Gram negativos en agar MCC suplementado con meropenem (2 µg/ml) (RBGN-M) también mostraron reducciones variables en todos los muestreos. Estos resultados evidencian la eficacia del tratamiento en la PTAS del Gran Concepción para la remoción de bacterias, aunque no así para la eliminación de genes codificantes de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas presentes en las AS.
- 2) Los *Enterobacterales* representaron solo el 27% de los 205 bacilos Gram negativos totales aislados. Por lo tanto, los bacilos Gram negativos no fermentadores (BGN-NF) y los bacilos Gram negativos fermentadores oxidasa negativos (BGN-F-Ox[-]), que no fueron trabajados en esta tesis, podrían desempeñar un papel más relevante en la persistencia y diseminación de genes de resistencia antibiótica (GRAs) en AS.
- 3) La resistencia a cefalosporinas de tercera generación en las cepas de *Enterobacterales* estuvo mediada por BLEE, siendo el gen *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, el más frecuentemente detectado. Además, tres cepas de *Enterobacterales* resultaron portadoras del gen codificante de carbapenemasas *bla*<sub>KPC-2</sub>. Por lo tanto, la detección de estos mecanismos de resistencia, frente a dos de las familias de antibacterianos más utilizados, constituye un importante antecedente epidemiológico, que denota la conexión existente entre bacterias de las interfaces humana y acuática.

- 4) La identificación de los genes *bla*<sub>CTX-M-1-like</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, y *bla*<sub>OXA-48-like</sub> en todas las muestras de AS, así como la detección de *bla*<sub>VIM</sub> exclusivamente en muestras de afluyente (AF), representa un importante antecedente de contaminación genética en estos cuerpos de agua. Esto sugiere que dichos genes podrían estar siendo transportados por los BGN-NF y BGN-F-Ox[-] que fueron excluidos de este estudio.
- 5) La hipótesis planteada se acepta parcialmente. Se confirmó que el tratamiento de la PTAS del Gran Concepción es efectivo en la reducción de la carga bacteriana. Sin embargo, no fue posible determinar su impacto sobre la carga de genes codificantes de BLEE y carbapenemasas, limitándose este estudio únicamente a la detección de dichos genes. No obstante, los resultados obtenidos demuestran que las AS actúan como reservorios y potenciales vehículos de diseminación de GRAs de alto impacto en la salud pública.

## **6. PROYECCIONES.**

- 1) Identificar los BGN-NF y BGN-F-Ox[-] que fueron excluidos de esta tesis, para luego efectuarles antibiograma, junto con detección fenotípica y genotípica de BLEE y carbapenemasas, y de ser posible secuenciar genómicamente los aislados más interesantes
- 2) Implementar qPCR en las muestras de AS, para cuantificar la carga de genes codificantes de BLEE y carbapenemasas. En su defecto, aplicar metagenómica, para caracterizar la diversidad microbiana, el metarresistoma (conjunto de genes de resistencia) y el metamoviloma (conjunto de elementos genéticos móviles asociados a la resistencia) presentes en las AS.
- 3) Utilizar RT-qPCR para evaluar la expresión de genes codificantes de BLEE y carbapenemasas en muestras de AS. Alternativamente, implementar metatranscriptómica, lo que permitiría analizar la expresión global de genes de resistencia antibiótica (GRAs) y comprender en detalle la actividad de estos genes en el ecosistema analizado.

## 7. REFERENCIAS.

- Abramova, A., Isakov, V., Nepogodin, A., Grakhova, E., & Dyagelev, M. (2020). Classification of antibiotics contained in urban wastewater. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 548, 052078. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/548/5/052078>
- Abril, D., Lesmes-Leon, D. N., Marquez-Ortiz, R. A., Leal, A. L., Tovar-Acero, C., Rozo, Z. L. C., Gómez, N. V., & Escobar-Perez, J. (2024). Draft genome of the *Klebsiella pneumoniae* 24Kpn33 and complete sequence of its pCOL-1, a plasmid related to the *bla*<sub>KPC-2</sub> acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Resource Announcements*, 13(4), e00071-00024. <https://doi.org/doi:10.1128/mra.00071-24>
- Adams-Haduch, J. M., Paterson, D. L., Sidjabat, H. E., Pasculle, A. W., Potoski, B. A., Muto, C. A., Harrison, L. H., & Doi, Y. (2008). Genetic basis of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates at a tertiary medical center in Pennsylvania. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(11), 3837-3843. <https://doi.org/10.1128/AAC.00570-08>
- Adler, A., Khabra, E., Paikin, S., & Carmeli, Y. (2016). Dissemination of the *bla*<sub>KPC</sub> gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), 2143-2146. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw106>
- Aguayo-Reyes, A., & Mella Montecinos, S. (2023). *Principios de Terapia Antimicrobiana* (Segunda ed.).
- Ahmed, J., Thakur, A., & Goyal, A. (2021). Industrial Wastewater and Its Toxic Effects. In M. P. Shah (Ed.), *Biological Treatment of Industrial Wastewater* (pp. 0). The Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/9781839165399-00001>
- Alcock, B. P., Huynh, W., Chalil, R., Smith, K. W., Raphenya, Amogelang R., Wlodarski, M. A., Edalatmand, A., Petkau, A., Syed, S. A., Tsang, K. K., Baker, S. J. C., Dave, M., McCarthy, Madeline C., Mukiri, K. M., Nasir, J. A., Golbon, B., Imtiaz, H., Jiang, X., Kaur, K., . . . McArthur, A. G. (2023). CARD 2023: expanded curation, support for machine learning, and resistome prediction at the Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D690-D699. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac920>
- Algarni, S., Gudeta, D. D., Han, J., Nayak, R., & Foley, S. L. (2024). Genotypic analyses of IncHI2 plasmids from enteric bacteria. *Scientific Reports*, 14(1), 9802. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59870-2>
- Alouache, S., Estepa, V., Messai, Y., Ruiz, E., Torres, C., & Bakour, R. (2014). Characterization of ESBLs and Associated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates from an Urban Wastewater Treatment Plant in Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 20(1), 30-38. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0264>

- Álvarez, J., Rojas, Á., Carvajal, C., Revello, J., Meza, P., Guggiana, P., Garcí-a, P., & Labarca, J. (2018). Evaluación de susceptibilidad y respuesta al tratamiento con piperacilina/tazobactam en pacientes con infecciones por *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE) CTX-M. *Revista chilena de infectología*, 35, 343-350. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182018000400343&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182018000400343&nrm=iso)
- Alzohairy, A. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2, 60-61.
- Amini, K., & Konkori, M. (2020). Identification of Broad-Spectrum Beta-lactamase CTX-M-2, CTX-M-8, and Ampc-dependent CMY Genes in *Shigella sonnei* Isolated from Pediatric Diarrhea Specimens by Multiplex-PCR and Antibiotic Resistance Pattern Determination [Original Research Article]. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 14(5), 501-511. <https://doi.org/10.30699/ijmm.14.5.501>
- An, X.-L., Su, J.-Q., Li, B., Ouyang, W.-Y., Zhao, Y., Chen, Q.-L., Cui, L., Chen, H., Gillings, M. R., Zhang, T., & Zhu, Y.-G. (2018). Tracking antibiotic resistome during wastewater treatment using high throughput quantitative PCR. *Environment International*, 117, 146-153. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.05.011>
- Anisimova, M., Gil, M., Dufayard, J.-F., Dessimoz, C., & Gascuel, O. (2011). Survey of Branch Support Methods Demonstrates Accuracy, Power, and Robustness of Fast Likelihood-based Approximation Schemes. *Systematic Biology*, 60(5), 685-699. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr041>
- Araújo, S., Sousa, M., Tacão, M., Baraúna, R. A., Silva, A., Ramos, R., Alves, A., Manaia, C. M., & Henriques, I. (2021). Carbapenem-resistant bacteria over a wastewater treatment process: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in untreated wastewater and intrinsically-resistant bacteria in final effluent. *Science of The Total Environment*, 782, 146892. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146892>
- Argimón, S., David, S., Underwood, A., Abrudan, M., Wheeler, N. E., Kekre, M., Abudahab, K., Yeats, C. A., Goater, R., Taylor, B., Harste, H., Muddyman, D., Feil, E. J., Brisse, S., Holt, K., Donado-Godoy, P., Ravikumar, K. L., Okeke, I. N., Carlos, C., & Aanensen, D. M. (2021). Rapid Genomic Characterization and Global Surveillance of *Klebsiella* Using Pathogenwatch. *Clin Infect Dis*, 73(Suppl\_4), S325-s335. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab784>
- Argimón, S., Yeats, C. A., Goater, R. J., Abudahab, K., Taylor, B., Underwood, A., Sánchez-Busó, L., Wong, V. K., Dyson, Z. A., Nair, S., Park, S. E., Marks, F., Page, A. J., Keane, J. A., Baker, S., Holt, K. E., Dougan, G., & Aanensen, D. M. (2021). A global resource for genomic predictions of antimicrobial resistance and surveillance of *Salmonella Typhi* at pathogenwatch. *Nature Communications*, 12(1), 2879. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23091-2>

- Aristizabal-Hoyos, A. M., Rodríguez, E. A., Torres-Palma, R. A., & Jiménez, J. N. (2023). Concern levels of beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in hospital wastewater: hotspot of antimicrobial resistance in Latin-America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 105(1), 115819. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2022.115819>
- Arumugham, V., Gujarathi, R., & Cascella, M. (2024). *Third-Generation Cephalosporins*. StatPearls Publishing. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549881/>
- Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook [Review]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
- Asokan, G. V., Ramadhan, T., Ahmed, E., & Sanad, H. (2019). WHO Global Priority Pathogens List: A Bibliometric Analysis of Medline-PubMed for Knowledge Mobilization to Infection Prevention and Control Practices in Bahrain. *Oman Med J*, 34(3), 184-193. <https://doi.org/10.5001/omj.2019.37>
- Bakthavatchalam, Y. D., Anandan, S., & Veeraraghavan, B. (2016). Laboratory Detection and Clinical Implication of Oxacillinase-48 like Carbapenemase: The Hidden Threat. *Journal of global infectious diseases*, 8(1), 41-50. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.176149>
- Baraño, P. A. (2005). Tratamiento de las Aguas Servidas: Situación en Chile. <https://research.csiro.au/gestionrapel/wp-content/uploads/sites/79/2016/11/Tratamiento-de-las-aguas-servidas-Situaci%C3%B3n-en-Chile-2005.pdf>
- Barría-Loaiza, C., Pincheira, A., Quezada, M., Vera, A., Valenzuela, P., Domínguez, M., Lima, C. A., Araya, I., Araya, P., Prat, S., Aguayo, C., Fernández, J., Hormazábal, J. C., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2016). Molecular typing and genetic environment of the *bla<sub>KPC</sub>* gene in Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 4, 28-34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.01.001>
- Bello, H., Dominguez, M., Dashti, A., Gonzalez-Rocha, G., & Amyes, S. G. B. (2002). *SHV-39: a new extended-spectrum beta-lactamase found throughout Chile*
- Bello T, H., Trabal F, N., Ibáñez C, D., Reyes J, A., Domínguez Y, M., Mella M, S., Zemelman M, C., Zemelman Z, R., & González R, G. (2005).  $\beta$ -Lactamasas de familias diferentes a TEM y SHV en cepas de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* aisladas en hospitales chilenos. *Revista Médica de Chile*, 133, 737-739. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872005000600018&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872005000600018&nrm=iso)
- Benavides, J. A., Salgado-Caxito, M., Opazo-Capurro, A., González Muñoz, P., Piñeiro, A., Otto Medina, M., Rivas, L., Munita, J., & Millán, J. (2021). ESBL-Producing *Escherichia coli* Carrying CTX-M Genes Circulating among Livestock, Dogs, and Wild Mammals in Small-Scale Farms of Central Chile. *Antibiotics*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050510>

- Benkova, M., Soukup, O., & Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*, 129(4), 806-822. <https://doi.org/10.1111/jam.14704>
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue), D36-42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>
- Berendonk, T. U., Manaia, C. M., Merlin, C., Fatta-Kassinos, D., Cytryn, E., Walsh, F., Bürgmann, H., Sørum, H., Norström, M., Pons, M. N., Kreuzinger, N., Huovinen, P., Stefani, S., Schwartz, T., Kisand, V., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol*, 13(5), 310-317. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- Berríos, C. S., & Ilabaca, R. G. (2018). *Manual de Microbiología. Ediciones Universidad Católica de Chile*.
- Bodendoerfer, E., Marchesi, M., Imkamp, F., Courvalin, P., Böttger, E. C., & Mancini, S. (2020). Co-occurrence of aminoglycoside and  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in aminoglycoside- non-susceptible *Escherichia coli* isolated in the Zurich area, Switzerland. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 56(1), 106019. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106019>
- Boettger, B. C., Piroupo, C. M., Setubal, J. C., Girardello, R., & Pignatari, A. C. C. (2023). Co-carriage of Plasmid NDM and Chromosomal KPC in *Klebsiella pneumoniae* ST255 Human Wound Isolate in Brazil. *Current Microbiology*, 80(12), 394. <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03509-4>
- 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>
- Bonetta, S., Di Cesare, A., Pignata, C., Sabatino, R., Macrì, M., Corno, G., Panizzolo, M., Bonetta, S., & Carraro, E. (2023). Occurrence of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes in the urban water cycle. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(12), 35294-35306. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-24650-w>
- Bortolaia, V., Kaas, R. S., Ruppe, E., Roberts, M. C., Schwarz, S., Cattoir, V., Philippon, A., Allesoe, R. L., Rebelo, A. R., Florensa, A. F., Fagelhauer, L., Chakraborty, T., Neumann, B., Werner, G., Bender, J. K., Stingl, K., Nguyen, M., Coppens, J., Xavier, B. B., . . . Aarestrup, F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother*, 75(12), 3491-3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2016). Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nature Reviews Microbiology*, 14(5), 320-330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Bueno, I., Verdugo, C., Jimenez-Lopez, O., Alvarez, P. P., Gonzalez-Rocha, G., Lima, C. A., Travis, D. A., Wass, B., Zhang, Q., Ishii, S., & Singer, R. S. (2020). Role of wastewater treatment plants on environmental abundance of Antimicrobial Resistance Genes in Chilean rivers. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223(1), 56-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.10.006>



- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01076-01018. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Bush, K. (2023). Classification for  $\beta$ -lactamases: historical perspectives. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 21(5), 513-522. <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2194633>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of  $\beta$ -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2), 10.1128/cmr.00047-00019. <https://doi.org/doi:10.1128/cmr.00047-19>
- 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. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.39.6.1211>
- Calvo, J., Cantón, R., Cuenca, F. F., Mirelis, B., & Navarro, F. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gramnegativos <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia38.pdf>
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.11.001>
- Canton, R., Gonzalez-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>
- Cao, Y., Yu, M., Dong, G., Chen, B., & Zhang, B. (2020). Digital PCR as an Emerging Tool for Monitoring of Microbial Biodegradation. *Molecules*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/molecules25030706>
- Cappuccino, J. G., & Welsh, C. (2018). *Microbiology A Laboratory Manual* (Eleventh ed.). Pearson Education.
- Carattoli, A., Zankari, E., García-Fernández, A., Voldby Larsen, M., Lund, O., Villa, L., Møller Aarestrup, F., & Hasman, H. (2014). In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(7), 3895-3903. <https://doi.org/10.1128/aac.02412-14>
- 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. *Int J Infect Dis*, 81, 28-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.01.051>
- CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States 2019. 150. <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>
- Cerdeira, L. T., Lam, M. M. C., Wyres, K. L., Wick, R. R., Judd, L. M., Lopes, R., Ribas, R. M., Morais, M. M., Holt, K. E., & Lincopan, N. (2019). Small IncQ1 and Col-Like Plasmids Harboring *bla*<sub>KPC-2</sub> and Non-*Tn4401* Elements (NTEKPC-Ild) in High-Risk Lineages of *Klebsiella pneumoniae* CG258. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(3), 10.1128/aac.02140-02118. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.02140-18>

- Chouchani, C., Marrakchi, R., Henriques, I., & Correia, A. (2013). Occurrence of IMP-8, IMP-10, and IMP-13 metallo- $\beta$ -lactamases located on class 1 integrons and other extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in bacterial isolates from Tunisian rivers. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 45(2), 95-103. <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.717712>
- Cifuentes, M., García, P., San Martín, P., Silva, F., Zúñiga, J., Reyes, S., Rojas, R., Ponce, R., Quintanilla, R., Delpiano, L., & Wolff, M. (2012). Primer caso de detección de *bla*<sub>KPC</sub> en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. *Revista Chilena de Infectología*, 29, 224-228. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182012000200018&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182012000200018&nrm=iso)
- Cirja, M., Ivashechkin, P., Schäffer, A., & Corvini, P. F. X. (2008). Factors affecting the removal of organic micropollutants from wastewater in conventional treatment plants (CTP) and membrane bioreactors (MBR). *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(1), 61-78. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9121-8>
- CLSI. (2018). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—13th ed. CLSI document M02. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- CLSI. (2022). M100-ED32 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. <https://clsi.org/all-free-resources/>
- CLSI. (2023). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- Conlan, S., Lau, A. F., Deming, C., Spalding, C. D., Lee-Lin, S., Thomas, P. J., Park, M., Dekker, J. P., Frank, K. M., Palmore, T. N., & Segre, J. A. (2019). Plasmid Dissemination and Selection of a Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain during Transplant-Associated Antibiotic Therapy. *mBio*, 10(5), 10.1128/mbio.00652-00619. <https://doi.org/doi:10.1128/mbio.00652-19>
- Conte, D., Palmeiro, J. K., da Silva Nogueira, K., de Lima, T. M. R., Cardoso, M. A., Pontarolo, R., Degaut Pontes, F. L., & Dalla-Costa, L. M. (2017). Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 136, 62-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.10.031>
- Čornejová, T., Venglovsky, J., Gregova, G., Kmetova, M., & Kmet, V. (2015). Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* from municipal wastewater [journal article]. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(3), 447-450. <https://doi.org/10.5604/12321966.1167710>
- Criscuolo, A., & Gribaldo, S. (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy): a new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence alignments. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>

- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 305-317. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>
- da Cruz Nizer, W. S., Inkovski, V., & Overhage, J. (2020). Surviving Reactive Chlorine Stress: Responses of Gram-Negative Bacteria to Hypochlorous Acid. *Microorganisms*, 8(8), 1220. <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/8/1220>
- Davis, B. C., Brown, C., Gupta, S., Calarco, J., Liguori, K., Milligan, E., Harwood, V. J., Pruden, A., & Keenum, I. (2023). Recommendations for the use of metagenomics for routine monitoring of antibiotic resistance in wastewater and impacted aquatic environments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 53(19), 1731-1756. <https://doi.org/10.1080/10643389.2023.2181620>
- De Koster, S., Ringenier, M., Xavier, B. B., Lammens, C., De Coninck, D., De Bruyne, K., Mensaert, K., Kluytmans-van den Bergh, M., Kluytmans, J., Dewulf, J., & Goossens, H. (2023). Genetic characterization of ESBL-producing and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* from Belgian broilers and pigs [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1150470>
- Dekić Rozman, S., Puljko, A., Karkman, A., Virta, M., & Udiković-Kolić, N. (2024). Bacterial hosts of clinically significant beta-lactamase genes in Croatian wastewaters. *FEMS Microbiology Ecology*, 100(6). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiae081>
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J. F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., Claverie, J. M., & Gascuel, O. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Research*, 36(suppl\_2), W465-W469. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn180>
- Dropa, M., da Silva, J. S. B., Andrade, A. F. C., Nakasone, D. H., Cunha, M. P. V., Ribeiro, G., de Araújo, R. S., Brandão, C. J., Ghiglione, B., Lincopan, N., Sato, M. I. Z., & Knöbl, T. (2024). Spread and persistence of antimicrobial resistance genes in wastewater from human and animal sources in São Paulo, Brazil. *Tropical Medicine & International Health*, 29(5), 424-433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/tmi.13986>
- Dymond, J. S. (2013). Chapter Twenty Three - Explanatory Chapter: Quantitative PCR. In J. Lorsch (Ed.), *Methods in Enzymology* (Vol. 529, pp. 279-289). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00023-9>
- Ejaz, H., Ahmad, M., Younas, S., Junaid, K., Abosalif, K. O. A., Abdalla, A. E., Alameen, A. A. M., Elamir, M. Y. M., Bukhari, S. N. A., Ahmad, N., & Qamar, M. U. (2021). Molecular Epidemiology of Extensively-Drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 2 Co-Harboring *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA</sub> From Clinical Origin. *Infection and drug resistance*, 14, 1931-1939. <https://doi.org/10.2147/idr.S310478>
- El Bakraoui, H., Slaoui, M., Mabrouki, J., Hmouni, D., & Laroche, C. (2023). Recent Trends on Domestic, Agricultural and Industrial Wastewaters Treatment Using Microalgae Biorefinery System. *Applied Sciences*, 13(1), 68. <https://www.mdpi.com/2076-3417/13/1/68>

- El Salabi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. (2013). Extended spectrum  $\beta$ -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, 39(2), 113-122. <https://doi.org/10.3109/1040841x.2012.691870>
- Elgorriaga-Islas, E., Guggiana-Nilo, P., Domínguez-Yévenes, M., González-Rocha, G., Mella-Montecinos, S., Labarca-Labarca, J., García-Cañete, P., & Bello-Toledo, H. (2012). Prevalencia del determinante de resistencia plasmídica a quinolonas *aac(6')-Ib-cr* en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE aisladas en diez hospitales de Chile [10.1016/j.eimc.2012.01.024]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), 466-468. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.01.024>
- 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>
- Ferone, M., Gowen, A., Fanning, S., & Scannell, A. G. M. (2020). Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3106-3129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>
- Fresnadillo-Martínez, M. J., García-García, M. I., García-Sánchez, E., & García-Sánchez, J. E. (2010). Los carbapenems disponibles: Propiedades y diferencias [10.1016/S0213-005X(10)70031-8]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28, 53-64. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(10\)70031-8](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(10)70031-8)
- Fuentes-Castillo, D., Castro-Tardón, D., Esposito, F., Neves, I., Rodrigues, L., Fontana, H., Fuga, B., Catão-Dias, J. L., & Lincopan, N. (2023). Genomic evidences of gulls as reservoirs of critical priority CTX-M-producing *Escherichia coli* in Corcovado Gulf, Patagonia. *Science of The Total Environment*, 874, 162564. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162564>
- Fuentes-Castillo, D., Farfán-López, M., Esposito, F., Moura, Q., Fernandes, M. R., Lopes, R., Cardoso, B., Muñoz, M. E., Cerdeira, L., Najle, I., Muñoz, P. M., Catão-Dias, J. L., González-Acuña, D., & Lincopan, N. (2019). Wild owls colonized by international clones of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M)-producing *Escherichia coli* and *Salmonella Infantis* in the Southern Cone of America. *Science of The Total Environment*, 674, 554-562. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.149>
- Furlan, J. P. R., da Silva Rosa, R., Ramos, M. S., dos Santos, L. D. R., Savazzi, E. A., & Stehling, E. G. (2023). Genomic features of an extensively drug-resistant and NDM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* ST340 isolated from river water. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(53), 114678-114684. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-30374-2>
- Galarce, N., Arriagada, G., Sánchez, F., Escobar, B., Miranda, M., Matus, S., Vilches, R., Varela, C., Zelaya, C., Peralta, J., Paredes-Osses, E., González-Rocha, G., & Lapierre, L. (2023). Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from household dogs in Chile [Original Research]. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1233127>



- 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(1), 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>
- García, P., P, C., H, D., G, J., C, E., C, G., Domínguez, M., González-Rocha, G., Bello, H., & L, J. (2011). Caracterización clínica y molecular de bacteriemias causadas por Enterobacterias productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido: 2004-2007. *Revista Chilena de Infectología*, 28, 563-571. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182011000700009>
- Gebreyes, W. A., Jackwood, D., Oliveira, C. J. B. d., Lee, C.-W., Hoet, A. E., & Thakur, S. (2020). Molecular Epidemiology of Infectious Zoonotic and Livestock Diseases. *Microbiology spectrum*, 8(2), 10.1128/microbiolspec.ame-0011-2019. <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.ame-0011-2019>
- Gondane, A. A., & Pawar, D. B. (2023). Activity of Cefotaxime versus Ceftriaxone against Pathogens Isolated from Various Systemic Infections: A Prospective, Multicenter, Comparative, In vitro Indian Study. *Journal of Laboratory Physicians*.
- Gutmann, L., Ferré, B., Goldstein, F. W., Rizk, N., Pinto-Schuster, E., Acar, J. F., & Collatz, E. (1989). SHV-5, a novel SHV-type beta-lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(6), 951. <https://doi.org/10.1128/AAC.33.6.951>
- Hamed, S. Z., Abd El-Fattah, H. I., Abd El-Basit, H. M. L., & Mahgoub, S. A. (2016). Efficiency of wastewater treatment plant at zagazig city for removing microbial and chemical pollutants (case study). *Zagazig Journal of Agricultural Research*, 43(3), 849-860. <https://doi.org/10.21608/zjar.2016.101018>
- Harnisz, M., Kiedrzyńska, E., Kiedrzyński, M., Korzeniewska, E., Czatzkowska, M., Koniuszewska, I., Jóźwik, A., Szklarek, S., Niestępski, S., & Zalewski, M. (2020). The impact of WWTP size and sampling season on the prevalence of antibiotic resistance genes in wastewater and the river system. *Science of The Total Environment*, 741, 140466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140466>
- Hauser, A. R. (2019). *Manual de Antibióticos* (Tercera ed.). Wolters Kluwer.
- Hayashi Sant'Anna, F., Bach, E., Porto, R. Z., Guella, F., Hayashi Sant'Anna, E., & Passaglia, L. M. P. (2019). Genomic metrics made easy: what to do and where to go in the new era of bacterial taxonomy. *Critical Reviews in Microbiology*, 45(2), 182-200. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1569587>

- Hennart, M., Guglielmini, J., Bridel, S., Maiden, M. C. J., Jolley, K. A., Criscuolo, A., & Brisse, S. (2022). A Dual Barcoding Approach to Bacterial Strain Nomenclature: Genomic Taxonomy of *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Molecular Biology and Evolution*, 39(7). <https://doi.org/10.1093/molbev/msac135>
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2017). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518-522. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx281>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Rep*, 21(12), e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Hurtado, R., Barh, D., Weimer, B. C., Viana, M. V. C., Profeta, R., Sousa, T. J., Aburjaile, F. F., Quino, W., Souza, R. P., Mestanza, O., Gavilán, R. G., & Azevedo, V. (2022). WGS-Based Lineage and Antimicrobial Resistance Pattern of *Salmonella Typhimurium* Isolated during 2000–2017 in Peru. *Antibiotics*, 11(9), 1170. <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/9/1170>
- IACG. (2019). No podemos esperar: Asegurar el futuro contra las infecciones farmacorresistentes. 27. [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/antimicrobial-resistance/amr-gcp-tjs/iacg/summaries/iacg\\_final\\_summary\\_es.pdf?sfvrsn=9b53aa6d\\_9](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/antimicrobial-resistance/amr-gcp-tjs/iacg/summaries/iacg_final_summary_es.pdf?sfvrsn=9b53aa6d_9)
- ISP, I. d. S. P. d. C. (2018). 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)
- Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1991). More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(9), 1697. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.9.1697>
- Jacoby, G. A., Medeiros, A. A., O'Brien, T. F., Pinto, M. E., & Jiang, H. (1988). Broad-spectrum, transmissible beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 319(11), 723-724. <https://doi.org/10.1056/nejm198809153191114>
- Jiang, X., Cui, X., Xu, H., Liu, W., Tao, F., Shao, T., Pan, X., & Zheng, B. (2019). Whole Genome Sequencing of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolated From a Wastewater Treatment Plant in China [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01797>
- Jiménez-Pearson, M. A., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J. C., Duarte Valderrama, C., Salgado Marcano, N., Ramón-Pardo, P., & Melano, R. G. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. *Rev Panam Salud Publica*, 43, e65. <https://doi.org/10.26633/rpsp.2019.65>

- Jin, M., Liu, L., Wang, D.-n., Yang, D., Liu, W.-l., Yin, J., Yang, Z.-w., Wang, H.-r., Qiu, Z.-g., Shen, Z.-q., Shi, D.-y., Li, H.-b., Guo, J.-h., & Li, J.-w. (2020). Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation. *The ISME Journal*, 14(7), 1847-1856. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0656-9>
- Johansson, M. H. K., Bortolaia, V., Tansirichaiya, S., Aarestrup, F. M., Roberts, A. P., & Petersen, T. N. (2020). Detection of mobile genetic elements associated with antibiotic resistance in *Salmonella enterica* using a newly developed web tool: MobileElementFinder. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 101-109. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa390>
- Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., Wimalaratna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K., Cody, A. J., & Maiden, M. C. J. (2012). Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology (Reading)*, 158(Pt 4), 1005-1015. <https://doi.org/10.1099/mic.0.055459-0>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., & Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., & Park, S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic Susceptibility Testing. *Diagnostics*, 9(2), 49. <https://www.mdpi.com/2075-4418/9/2/49>
- Kim, S.-Y., Park, Y.-J., Yu, J. K., & Kim, Y. S. (2011). Aminoglycoside Susceptibility Profiles of *Enterobacter cloacae* Isolates Harboring the *aac(6')-Ib* Gene. *Annals of Laboratory Medicine*, 31(4), 279-281. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.4.279>
- Kim, S.-Y., Park, Y.-J., Yu, J. K., Kim, Y. S., & Han, K. (2009). Prevalence and characteristics of *aac(6')-Ib-cr* in AmpC-producing *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*: a multicenter study from Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63(3), 314-318. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.11.016>
- Kim, S., & Aga, D. S. (2007). Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 10(8), 559-573. <https://doi.org/10.1080/15287390600975137>
- Knight, M. E., Webster, G., Perry, W. B., Baldwin, A., Rushton, L., Pass, D. A., Cross, G., Durance, I., Muziasari, W., Kille, P., Farkas, K., Weightman, A. J., & Jones, D. L. (2024). National-scale antimicrobial resistance surveillance in wastewater: A comparative analysis of HT qPCR and metagenomic approaches. *Water Research*, 262, 121989. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121989>
- Kon, K., & Rai, M. (2016). *Antibiotic Resistance Mechanisms and New Antimicrobial Approaches* (First ed.). Academic Press.
- Krumperman, P. H. (1983). Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl Environ Microbiol*, 46(1), 165-170. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.165-170.1983>

- Lam, M. M. C., Wick, R. R., Watts, S. C., Cerdeira, L. T., Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2021). A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. *Nature Communications*, 12(1), 4188. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24448-3>
- 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, C.-R., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Leiva, A. M., Gómez, G., González-Rocha, G., Piña, B., & Vidal, G. (2024). Performance of full-scale rural wastewater treatment plants in the reduction of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes from small-city effluents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12(2), 112322. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.112322>
- Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. (2019). NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W260-W265. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz303>
- Letunic, I., & Bork, P. (2006). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, 23(1), 127-128. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529>
- 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>
- Letunic, I., & Bork, P. (2024). Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae268>
- Li, Y., Qiu, Y., Fang, C., Dai, X., & Zhang, L. (2023). Genomic characterisation of a *bla*<sub>KPC-2</sub>- and *mcr-10*-co-harboursing *Enterobacter kobei* isolate with high-level resistance to colistin and carbapenems. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 34, 63-66. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgar.2023.06.008>
- Liu, B., Zheng, D., Zhou, S., Chen, L., & Yang, J. (2021). VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D912-D917. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1107>
- Liu, H., Zhou, X., Huang, H., & Zhang, J. (2019). Prevalence of Antibiotic Resistance Genes and Their Association with Antibiotics in a Wastewater Treatment Plant: Process Distribution and Analysis. *Water*, 11(12), 2495. <https://www.mdpi.com/2073-4441/11/12/2495>



- Liu, S. S., Qu, H. M., Yang, D., Hu, H., Liu, W. L., Qiu, Z. G., Hou, A. M., Guo, J., Li, J. W., Shen, Z. Q., & Jin, M. (2018). Chlorine disinfection increases both intracellular and extracellular antibiotic resistance genes in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res*, 136, 131-136. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.02.036>
- Lolans, K., Queenan, A. M., Bush, K., Sahud, A., & Quinn, J. P. (2005). First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(8), 3538-3540. <https://doi.org/10.1128/aac.49.8.3538-3540.2005>
- Lou, E. G., Fu, Y., Wang, Q., Treangen, T. J., & Stadler, L. B. (2024). Sensitivity and consistency of long- and short-read metagenomics and epicPCR for the detection of antibiotic resistance genes and their bacterial hosts in wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 469, 133939. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.133939>
- Ma, X., Dong, X., Cai, J., Fu, C., Yang, J., Liu, Y., Zhang, Y., Wan, T., Lin, S., Lou, Y., & Zheng, M. (2022). Metagenomic Analysis Reveals Changes in Bacterial Communities and Antibiotic Resistance Genes in an Eye Specialty Hospital and a General Hospital Before and After Wastewater Treatment [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.848167>
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (Global Sixteenth ed.). Pearson Education
- 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>
- Majlander, J., Anttila, V. J., Nurmi, W., Seppälä, A., Tiedje, J., & Muziasari, W. (2021). Routine wastewater-based monitoring of antibiotic resistance in two Finnish hospitals: focus on carbapenem resistance genes and genes associated with bacteria causing hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 117, 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.09.008>
- Makowska, N., Philips, A., Dabert, M., Nowis, K., Trzebny, A., Koczura, R., & Mokracka, J. (2020). Metagenomic analysis of  $\beta$ -lactamase and carbapenemase genes in the wastewater resistome. *Water Research*, 170, 115277. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115277>
- Manaia, C. M., Macedo, G., Fatta-Kassinos, D., & Nunes, O. C. (2016). Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(4), 1543-1557. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7202-0>
- Manaia, C. M., Rocha, J., Scaccia, N., Marano, R., Radu, E., Biancullo, F., Cerqueira, F., Fortunato, G., Iakovides, I. C., Zammit, I., Kampouris, I., Vaz-Moreira, I., & Nunes, O. C. (2018). Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environ Int*, 115, 312-324. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.03.044>
- Mandal, S. M., & Paul, D. (2019). *Bacterial Adaptation to Co-resistance*. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-8503-2>

- Marcano, D., De Jesús, A., Hernández, L., & Torres, L. (2011). Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de Enterobacterias, Caracas, Venezuela [Journal articles]. *Rev Panam Salud Publica*;30(6),dic. 2011.  
[http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1020-49892011001200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892011001200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)  
<https://iris.paho.org/handle/10665.2/9427>
- Mathers, A. J., Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 565-591.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>
- Matus, P., Barra, R., Gómez, G., & Vidal, G. (2023). *Agua, Ecosistemas y Salud Pública*. Editorial Universidad de Concepción. [https://www.crhiam.cl/wp-content/uploads/2023/05/CRHIAM\\_Libro-Agua-Ecosistemas\\_-Alta-res.pdf](https://www.crhiam.cl/wp-content/uploads/2023/05/CRHIAM_Libro-Agua-Ecosistemas_-Alta-res.pdf)
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017. <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.arba-0009-2017>
- Mehta, S. C., Rice, K., & Palzkill, T. (2015). Natural Variants of the KPC-2 Carbapenemase have Evolved Increased Catalytic Efficiency for Ceftazidime Hydrolysis at the Cost of Enzyme Stability. *PLOS Pathogens*, 11(6), e1004949.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004949>
- Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H.-P., & Göker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60>
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2021). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D801-D807.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
- Mendes, R. E., Castanheira, M., Garcia, P., Guzman, M., Toleman, M. A., Walsh, T. R., & Jones, R. N. (2004). First isolation of *bla*<sub>VIM-2</sub> in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4), 1433-1434. <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1433-1434.2004>
- Mesquita, E., Ribeiro, R., Silva, C. J. C., Alves, R., Baptista, R., Condinho, S., Rosa, M. J., Perdigão, J., Caneiras, C., & Duarte, A. (2021). An Update on Wastewater Multi-Resistant Bacteria: Identification of Clinical Pathogens Such as *Escherichia coli* O25b:H4-B2-ST131-Producing CTX-M-15 ESBL and KPC-3 Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca*. *Microorganisms*, 9(3), 576.  
<https://www.mdpi.com/2076-2607/9/3/576>
- Mikheenko, A., Prijbelski, A., Saveliyev, 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>

- Miłobedzka, A., Ferreira, C., Vaz-Moreira, I., Calderón-Franco, D., Gorecki, A., Purkrtova, S., Jan, B., Dziewit, L., Singleton, C. M., Nielsen, P. H., Weissbrodt, D. G., & Manaia, C. M. (2022). Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater environments: The challenges of filling a gap in the One-Health cycle. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127407. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127407>
- 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>
- Moges, F., Endris, M., Belyhun, Y., & Worku, W. (2014). Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from wastewater in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*, 7(1), 215. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-215>
- Moghnia, O. H., Rotimi, V. O., & Al-Sweih, N. A. (2021). Preponderance of *bla*<sub>KPC</sub>-Carrying Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Among Fecal Isolates From Community Food Handlers in Kuwait [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.737828>
- Morales-León, F., Matus-Köhler, M., Araya-Vega, P., Aguilera, F., Torres, I., Vera, R., Ibarra, C., Venegas, S., Bello-Toledo, H., González-Rocha, G., & Opazo-Capurro, A. (2023). Molecular Characterization of the Convergent Carbapenem-Resistant and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* Strain K1-ST23, Collected in Chile during the COVID-19 Pandemic. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e0054023. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00540-23>
- Morales I, R. (2003). Ertapenem: Una nueva clase de carbapenem. *Revista Chilena de Infectología*, 20, 270-276. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182003000400008&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182003000400008&nrm=iso)
- Moreno, A., Bello, H., Guggiana, D., Domínguez, M., & González, G. (2008). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases belonging to CTX-M group produced by *Escherichia coli* strains isolated from companion animals treated with enrofloxacin. *Veterinary Microbiology*, 129(1), 203-208. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.011>
- Mugnier, P. D., Poirel, L., Naas, T., & Nordmann, P. (2010). Worldwide dissemination of the *bla*<sub>OXA-23</sub> carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 35-40. <https://doi.org/10.3201/eid1601.090852>
- Müller, H., Sib, E., Gajdiss, M., Klanke, U., Lenz-Plet, F., Barabasch, V., Albert, C., Schallenberg, A., Timm, C., Zacharias, N., Schmithausen, R. M., Engelhart, S., Exner, M., Parcina, M., Schreiber, C., & Bierbaum, G. (2018). Dissemination of multi-resistant Gram-negative bacteria into German wastewater and surface waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 94(5). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy057>

- Mutuku, C., Melegh, S., Kovacs, K., Urban, P., Virág, E., Heninger, R., Herczeg, R., Sonnevend, Á., Gyenesi, A., Fekete, C., & Gazdag, Z. (2022). Characterization of  $\beta$ -Lactamases and Multidrug Resistance Mechanisms in *Enterobacterales* from Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant. *Antibiotics*, 11(6), 776. <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/6/776>
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retaillieu, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917-919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Nasser-Ali, M., Aja-Macaya, P., Conde-Pérez, K., Trigo-Tasende, N., Rumbo-Feal, S., Fernández-González, A., Bou, G., Poza, M., & Vallejo, J. A. (2024). Emergence of Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria Isolated from the Wastewater Treatment Plant in A Coruña, Spain. *Antibiotics*, 13(2), 194. <https://www.mdpi.com/2079-6382/13/2/194>
- Nath, S. K., Foster, G. A., Mandell, L. A., & Rotstein, C. (1995). Antimicrobial activity of ceftriaxone compared with cefotaxime in the presence of serum albumin. *Can J Infect Dis*, 6(1), 21-27. <https://doi.org/10.1155/1995/617610>
- Nathanson, J. A., & Ambulkar, A. (2024). *Wastewater Treatment*. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/technology/wastewater-treatment>
- Navarro, F., Calvo, J., Cantón, R., Fernández-Cuenca, F., & Mirelis, B. (2011). Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos Gramnegativos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(7), 524-534. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.011>
- Néron, B., Littner, E., Haudiquet, M., Perrin, A., Cury, J., & Rocha, E. P. C. (2022). IntegronFinder 2.0: Identification and Analysis of Integrons across Bacteria, with a Focus on Antibiotic Resistance in *Klebsiella*. *Microorganisms*, 10(4), 700. <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/4/700>
- Nguyen, A. Q., Vu, H. P., Nguyen, L. N., Wang, Q., Djordjevic, S. P., Donner, E., Yin, H., & Nghiem, L. D. (2021). Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. *Science of The Total Environment*, 783, 146964. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146964>
- Nüesch-Inderbilen, M. T., Hächler, H., & Kayser, F. H. (1996). Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 15(5), 398-402. <https://doi.org/10.1007/bf01690097>
- Nüesch-Inderbilen, M. T., Kayser, F. H., & Hächler, H. (1997). Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(5), 943-949. <https://doi.org/10.1128/aac.41.5.943>

- Odjadjare, E. E., Igbinosa, E. O., Mordi, R., Igere, B., Igeleke, C. L., & Okoh, A. I. (2012). Prevalence of Multiple Antibiotics Resistant (MAR) *Pseudomonas* Species in the Final Effluents of Three Municipal Wastewater Treatment Facilities in South Africa. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(6), 2092-2107. <https://www.mdpi.com/1660-4601/9/6/2092>
- [https://mdpi-res.com/d\\_attachment/ijerph/ijerph-09-02092/article\\_deploy/ijerph-09-02092.pdf?version=1403139726](https://mdpi-res.com/d_attachment/ijerph/ijerph-09-02092/article_deploy/ijerph-09-02092.pdf?version=1403139726)
- Ojer-Usoz, E., González, D., García-Jalón, I., & Vitas, A. I. (2014). High dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in effluents from wastewater treatment plants. *Water Research*, 56, 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.02.041>
- Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, James J., Dempsey, Donald M., Dickerman, A., Dietrich, Emily M., Kenyon, Ronald W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, Elliot J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, Gary J., . . . Stevens, Rick 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>
- 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. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Res*, 51(D1), D678-d689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>
- Opazo-Capurro, A., Morales-León, F., Jerez, C., Olivares-Pacheco, J., Alcalde-Rico, M., González-Muñoz, P., Bello-Toledo, H., Cardenas-Arias, A., Esposito, F., Lincopán, N., Illesca, V., & González-Rocha, G. (2022). Isolation of an Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* exoS(+)/O4 Strain Belonging to the "High-Risk" Clone ST654 and Coproducer of NDM-1 and the Novel VIM-80. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e0143922. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01439-22>
- Osińska, A., Korzeniewska, E., Harnisz, M., Felis, E., Bajkacz, S., Jachimowicz, P., Niestępski, S., & Konopka, I. (2020). Small-scale wastewater treatment plants as a source of the dissemination of antibiotic resistance genes in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 381, 121221. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121221>
- Oyarzo, M. (2007). *Precipitación química del fósforo mediante la adición de sulfato de aluminio en plantas de tratamiento de aguas* [Universidad de Magallanes].
- 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). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mgen.0.000056>
- Parwana, D., Gu, J., Chen, S., Bethel, C. R., Marshall, E., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., & Haider, S. (2024). The Structural Role of N170 in Substrate-Assisted Deacylation in KPC-2  $\beta$ -Lactamase. *Angewandte Chemie International Edition*, 63(12), e202317315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.202317315>
- Pazda, M., Kumirska, J., Stepnowski, P., & Mulkiewicz, E. (2019). Antibiotic resistance genes identified in wastewater treatment plant systems – A review. *Science of The Total Environment*, 697, 134023. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>
- Perera, V., de Silva, N., Jayatilleke, K., de Silva, S., & Corea, E. (2023). Performance of Phenotypic Tests to Detect  $\beta$ -Lactamases in a Population of  $\beta$ -Lactamase Coproducing *Enterobacteriaceae* Isolates. *Journal of Laboratory Physicians*, 15. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1760399>
- Pérez I, A., García C, P., Poggi M, H., Braun J, S., Castillo V, C., Román, J. C., Lagos, M., Romeo O, E., Porte T, L., Labarca L, J., & González R, G. (2008). Presencia de metalo- $\beta$ -lactamasas en *Pseudomonas aeruginosa* resistente a imipenem. *Revista Médica de Chile*, 136, 423-432. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872008000400002&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872008000400002&nrm=iso)
- PNUMA. (2017). Fronteras 2017. Nuevos temas de interés ambiental. [https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/22255/Frontiers\\_2017\\_S\\_P.pdf?sequence=12&isAllowed=y](https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/22255/Frontiers_2017_S_P.pdf?sequence=12&isAllowed=y)
- Poirel, L., Bonnin, R. A., & Nordmann, P. (2012). Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(1), 559-562. <https://doi.org/10.1128/AAC.05289-11>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 70(1), 119-123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
- Poulou, A., Grivakou, E., Vriani, G., Koumaki, V., Pittaras, T., Pournaras, S., & Tsakris, A. (2014). Modified CLSI Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Confirmatory Test for Phenotypic Detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* Producing Various  $\beta$ -Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1483-1489. <https://doi.org/doi:10.1128/jcm.03361-13>
- Pratap, B., Kumar, S., Nand, S., Azad, I., Bharagava, R. N., Romanholo Ferreira, L. F., & Dutta, V. (2023). Wastewater generation and treatment by various eco-friendly technologies: Possible health hazards and further reuse for environmental safety. *Chemosphere*, 313, 137547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137547>
- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., & Woods, G. L. (2018). *Koneman Diagnostico Microbiologico* (Septima ed.). Wolters Kluwer.

- Puljko, A., Barišić, I., Dekić Rozman, S., Križanović, S., Babić, I., Jelić, M., Maravić, A., & Udiković-Kolić, N. (2024). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem and colistin resistance in *Klebsiella* and other *Enterobacterales* from treated wastewater in Croatia. *Environment International*, 185, 108554. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2024.108554>
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590-D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quezada-Aguiluz, M., Lincopan, N., Cerdeira, L., Fuga, B., Silva, F., Barrera, B., Cifuentes, M., Bello-Toledo, H., Opazo-Capurro, A., & González-Rocha, G. (2020). Draft genome sequence of a multidrug-resistant KPC-2 and SRT-2 co-producing *Serratia marcescens* strain isolated from a hospitalised patient in Chile. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 1-2. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.02.004>
- Rabbani, M. A. G., Howlader, M. Z. H., & Kabir, Y. (2017). Detection of multidrug resistant (MDR) bacteria in untreated waste water disposals of hospitals in Dhaka City, Bangladesh. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 10, 120-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.04.009>
- Rabbia, V., Bello-Toledo, H., Jiménez, S., Quezada, M., Domínguez, M., Vergara, L., Gómez-Fuentes, C., Calisto-Ulloa, N., González-Acuña, D., López, J., & González-Rocha, G. (2016). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Antarctic bird feces, water from inside a wastewater treatment plant, and seawater samples collected in the Antarctic Treaty area. *Polar Science*, 10(2), 123-131. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.polar.2016.04.002>
- Rada, A. M., Cadena, E. D. L., Agudelo, C., Capataz, C., Orozco, N., Pallares, C., Dinh, A. Q., Panesso, D., Ríos, R., Diaz, L., Correa, A., Hanson, B. M., Villegas, M. V., Arias, C. A., & Restrepo, E. (2020). Dynamics of *bla*<sub>KPC-2</sub> Dissemination from Non-CG258 *Klebsiella pneumoniae* to Other Enterobacterales via IncN Plasmids in an Area of High Endemicity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(12), 10.1128/aac.01743-01720. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.01743-20>
- Raju, N. P., Ansari, A., Patil, G., Sheeraz, M. S., Kukade, S., Kumar, S., Kapley, A., & Qureshi, A. (2024). Antibiotic Resistance Dissemination and Mapping in the Environment Through Surveillance of Wastewater. *Journal of Basic Microbiology*, n/a(n/a), e2400330. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.202400330>
- Reyes, J., Cárdenas, P., Tamayo, R., Villavicencio, F., Aguilar, A., Melano, R. G., & Trueba, G. (2021). Characterization of *bla*<sub>KPC-2</sub>-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Mobile Genetic Elements from Outbreaks in a Hospital in Ecuador. *Microb Drug Resist*, 27(6), 752-759. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0433>
- Richter, M., Rosselló-Móra, R., Oliver Glöckner, F., & Peplies, J. (2015). 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>

- Roman, V. L., Merlin, C., Virta, M. P. J., & Bellanger, X. (2021). EpicPCR 2.0: Technical and Methodological Improvement of a Cutting-Edge Single-Cell Genomic Approach. *Microorganisms*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081649>
- Russo, I., Fischer, J., Uelze, L., Napoleoni, M., Schiavano, G. F., Andreoni, F., Brandi, G., & Amagliani, G. (2024). From farm to fork: Spread of a multidrug resistant *Salmonella Infantis* clone encoding *bla*<sub>CTX-M-1</sub> on pESI-like plasmids in Central Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 410, 110490. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110490>
- Sánchez U, M., Bello T, H., Domínguez Y, M., Mella M, S., Zemelman Z, R., & González R, G. (2006). Transferecia de de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido desde cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* a otras especies de Enterobacterias. *Revista Médica de Chile*, 134, 415-420. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872006000400002&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872006000400002&nrm=iso)
- Sanz, M. B., Pasteran, F., Mendieta, J. M. d., Brunetti, F., Albornoz, E., Rapoport, M., Lucero, C., Errecalde, L., Nuñez, M. R., Monge, R., Pennini, M., Power, P., Corso, A., & Gomez, S. A. (2024). KPC-2 allelic variants in *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to ceftazidime-avibactam from Argentina: *bla*<sub>KPC-80</sub>, *bla*<sub>KPC-81</sub>, *bla*<sub>KPC-96</sub> and *bla*<sub>KPC-97</sub>. *Microbiology Spectrum*, 12(3), e04111-04123. <https://doi.org/doi:10.1128/spectrum.04111-23>
- Sattler, J., Tsvetkov, T., Stelzer, Y., Schäfer, S., Sommer, J., Noster, J., Göttig, S., & Hamprecht, A. (2022). Emergence of *Tn*1999.7, a New Transposon in *bla*<sub>OXA-48</sub>-Harboring Plasmids Associated with Increased Plasmid Stability. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(11), e00787-00722. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.00787-22>
- Schages, L., Wichern, F., Kalscheuer, R., & Bockmühl, D. (2020). Winter is coming – Impact of temperature on the variation of beta-lactamase and *mcr* genes in a wastewater treatment plant. *Science of The Total Environment*, 712, 136499. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136499>
- 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>
- Schmidt, J., Zdarska, V., Kolar, M., & Mlynarcik, P. (2023). Analysis of *bla*<sub>EC</sub> family class C beta-lactamase. *FEMS Microbiology Letters*, 370. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnad097>
- 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). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mgen.0.000685>
- Seemann, T. (2016). ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes. *GitHub: San Francisco, CA, USA*.



- Sekizuka, T., Tanaka, R., Hashino, M., Yatsu, K., & Kuroda, M. (2022). Comprehensive Genome and Plasmidome Analysis of Antimicrobial Resistant Bacteria in Wastewater Treatment Plant Effluent of Tokyo. *Antibiotics*, 11(10), 1283. <https://www.mdpi.com/2079-6382/11/10/1283>
- Serna, C., & Gonzalez-Zorn, B. (2022). Antimicrobial resistance and One Health. *Rev Esp Quimioter*, 35 Suppl 3(Suppl 3), 37-40. <https://doi.org/10.37201/req/s03.09.2022>
- Shekhawat, S. S., Kulshreshtha, N. M., & Gupta, A. B. (2020). Investigation of chlorine tolerance profile of dominant gram negative bacteria recovered from secondary treated wastewater in Jaipur, India. *Journal of Environmental Management*, 255, 109827. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109827>
- Shin, H., Kim, Y., Han, D., & Hur, H.-G. (2021). Emergence of High Level Carbapenem and Extensively Drug Resistant *Escherichia coli* ST746 Producing NDM-5 in Influent of Wastewater Treatment Plant, Seoul, South Korea [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645411>
- Shin, S. Y., Kwon, K. C., Park, J. W., Song, J. H., Ko, Y. H., Sung, J. Y., Shin, H. W., & Koo, S. H. (2009). Characteristics of *aac(6')-Ib-cr* gene in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Chungnam area. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(6), 541-550. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.6.541>
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Silva, J., Castillo, G., Callejas, L., López, H., & Olmos, J. (2006). Frequency of transferable multiple antibiotic resistance amongst coliform bacteria isolated from a treated sewage effluent in Antofagasta, Chile. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 0-0. [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-34582006000500008&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582006000500008&nrm=iso)
- Silva, J., Loyola, P., Galleguillos, J., Rodríguez, Y., Colque-Navarro, P., Möllby, R., & Kühn, I. (2005). Prevalence of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. in waste waters in the north of Chile. *Rev Med Chil*, 133(10), 1201-1210. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872005001000009>
- Sloan, A., Wang, G., & Cheng, K. (2017). Traditional approaches versus mass spectrometry in bacterial identification and typing. *Clinica Chimica Acta*, 473, 180-185. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.08.035>
- SMA. (2019). Informe Técnico de Fiscalización Ambiental: PTAS del Gran Concepción. <https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&opi=89978449&url=https://snifa.sma.gob.cl/General/Descargar/1104209120&ved=2ahUKEwidsOG-sLOFAxWZLLkGHUpvA1g4ChAWegQIDxAB&usq=AOvVaw1rBulVZcuucNSiljrohKif>

- Smyth, C., O'Flaherty, A., Walsh, F., & Do, T. T. (2020). Antibiotic resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing faecal coliforms in wastewater treatment plant effluent. *Environmental Pollution*, 262, 114244. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114244>
- Soni, K., Jyoti, K., Kumar, A., & Chandra, R. (2024). Coexistence of multidrug resistance and ESBL encoding genes - *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, and *bla*<sub>CTX-M</sub>; its amplification and dispersion in the environment via municipal wastewater treatment plant. *Chemosphere*, 362, 142829. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2024.142829>
- Souvorov, A., Agarwala, R., & Lipman, D. J. (2018). SKESA: strategic k-mer extension for scrupulous assemblies. *Genome Biology*, 19(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1540-z>
- Srathongneam, T., Sresung, M., Paisantham, P., Ruksakul, P., Singer, A. C., Sukchawalit, R., Satayavivad, J., Mongkolsuk, S., & Sirikanchana, K. (2024). High throughput qPCR unveils shared antibiotic resistance genes in tropical wastewater and river water. *Science of The Total Environment*, 908, 167867. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167867>
- SSS. (2019). Superintendencia N°1655: Establece nuevo Programa de Monitoreo de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas Gran Concepción de la Empresa ESSBIO S.A., por Tratamiento de Aguas Servidas de las Localidades de Concepción, Chiguayante y Talcahuano, Región del Bío-Bío. [http://www.siss.gob.cl/586/articles-5139 RPM 1655 2019.pdf](http://www.siss.gob.cl/586/articles-5139_RPM_1655_2019.pdf)
- Su, S., Li, C., Zhao, Y., Yu, L., Wang, Y., Wang, Y., Bao, M., Fu, Y., Zhang, J., & Zhang, X. (2020). Outbreak of KPC-2–Producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 Isolates in an Intensive Care Unit and Neurosurgery Unit. *Microbial Drug Resistance*, 26(9), 1009-1018. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0363>
- Suárez, C., & Gudiol, F. (2009). Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(2), 116-129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.eimc.2008.12.001>
- Sultana, S., Foti, A., & Dahl, J.-U. (2020). Bacterial Defense Systems against the Neutrophilic Oxidant Hypochlorous Acid. *Infection and Immunity*, 88(7), 10.1128/iai.00964-00919. <https://doi.org/doi:10.1128/iai.00964-19>
- Tajbakhsh, M., Avini, M. Y., Alikhajeh, J., Tajeddin, E., Rahbar, M., Eslami, P., Alebouyeh, M., & Zali, M. R. (2016). Emergence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-169</sub> and *bla*<sub>PER-1</sub> extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes among different *Salmonella enterica* serovars from human faecal samples. *Infectious Diseases*, 48(7), 550-556. <https://doi.org/10.3109/23744235.2016.1166260>
- Takei, S., Lu, Y. J., Tohya, M., Watanabe, S., Misawa, S., Tabe, Y., Miida, T., Mya, S., Tin, H. H., Tada, T., & Kirikae, T. (2022). Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing NDM-Type Metallo- $\beta$ -Lactamase in Myanmar. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e00673-00622. <https://doi.org/doi:10.1128/spectrum.00673-22>

- Tenover, F. C., Huang, M. B., Rasheed, J. K., & Persing, D. H. (1994). Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2729-2737. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2729-2737.1994>
- Thermo-Fisher-Scientific. (2014). Real-Time PCR Handbook. <https://www.thermofisher.com/cl/en/home/global/forms/real-time-pcr-handbook-lt.html>
- Thomson, P., García, P., Río, C. D., Castro, R., Núñez, A., & Miranda, C. (2023). Antimicrobial Resistance and Extended-Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Enterobacterales*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* Isolates from the Uterus of Healthy Mares. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 12(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens12091145>
- Tille, P. M. (2017). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* (Fourteenth ed.). Elsevier.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 249-266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Tiwari, A., Lehto, K.-M., Paspaliari, D. K., Al-Mustapha, A. I., Sarekoski, A., Hokajärvi, A.-M., Länsivaara, A., Hyder, R., Luomala, O., Lipponen, A., Oikarinen, S., Heikinheimo, A., & Pitkänen, T. (2024). Developing wastewater-based surveillance schemes for multiple pathogens: The WastPan project in Finland. *Science of The Total Environment*, 926, 171401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.171401>
- Tiwari, A., Paakkanen, J., Österblad, M., Kirveskari, J., Hendriksen, R. S., & Heikinheimo, A. (2022). Wastewater Surveillance Detected Carbapenemase Enzymes in Clinically Relevant Gram-Negative Bacteria in Helsinki, Finland; 2011–2012 [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2022.887888>
- Tümmler, B. (2020). Molecular epidemiology in current times. *Environmental Microbiology*, 22(12), 4909-4918. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1462-2920.15238>
- Uluseker, C., Kaster, K. M., Thorsen, K., Basiry, D., Shobana, S., Jain, M., Kumar, G., Kommedal, R., & Pala-Ozkok, I. (2021). A Review on Occurrence and Spread of Antibiotic Resistance in Wastewaters and in Wastewater Treatment Plants: Mechanisms and Perspectives [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2021.717809>
- Vaziri, F., Peerayeh, S. N., Nejad, Q. B., & Farhadian, A. (2011). The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac*(6')-I, *aac*(6')-II, *ant*(2'')-I, *aph*(3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics (Sao Paulo)*, 66(9), 1519-1522. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1807593222019366?via%3Dihub>

- Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., Bello-Toledo, H., & González-Rocha, G. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en Enterobacterias. *Revista Chilena de Infectología*, 34, 476-484.
- Vera, I., Jorquera, C., López, D., & Vidal, G. (2016). Humedales construidos para tratamiento y reúso de aguas servidas en Chile: reflexiones. *TECNOLOGIA Y CIENCIAS DEL AGUA*, 7, 19-35.
- Vidal, G., & Araya, F. (2014). *Las Aguas Servidas y su depuración en zonas rurales: Situación actual y desafíos*. Editorial Universidad de Concepción. <https://www.crhiam.cl/wp-content/uploads/2019/05/las-aguas-servidas-y-su-depuracion-en-zonas-rurales-situacion-actual-y-desafios.pdf>
- Vijayakumar, S., Wattal, C., J.K., O., Bhattacharya, S., Vasudevan, K., Anandan, S., Walia, K., & Veeraraghavan, B. (2020). Insights into the complete genomes of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* harbouring *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-420</sub>* and *bla<sub>NDM-1</sub>* genes using a hybrid-assembly approach. *Access Microbiology*, 2(8). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/acmi.0.000140>
- Viñes, J., Lopera, C., Vergara, A., Roca, I., Vila, J., Casals-Pascual, C., Martínez, J. A., García-Vidal, C., Soriano, A., & Pitart, C. (2024). Emergence of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST179 producing both IMP-16 and KPC-2: a case study of introduction from Peru to Spain. *Microbiology Spectrum*, 12(6), e00614-00624. <https://doi.org/doi:10.1128/spectrum.00614-24>
- Wang, D., Berglund, B., Li, Q., Shangguan, X., Li, J., Liu, F., Yao, F., & Li, X. (2023). Transmission of clones of carbapenem-resistant *Escherichia coli* between a hospital and an urban wastewater treatment plant. *Environmental Pollution*, 336, 122455. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122455>
- Wang, J., Xu, S., Zhao, K., Song, G., Zhao, S., & Liu, R. (2023). Risk control of antibiotics, antibiotic resistance genes (ARGs) and antibiotic resistant bacteria (ARB) during sewage sludge treatment and disposal: A review. *Science of The Total Environment*, 877, 162772. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162772>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. <https://doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- WHO. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- WHO. (2024). *Bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2016). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *bioRxiv*, 096412. <https://doi.org/10.1101/096412>

- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2017). *Prescott's Microbiology* (Tenth ed.). McGraw-Hill Education.
- Wozniak, A., Rodríguez, N., Alcalde-Rico, M., Castillo, C., & García, P. (2021). Primer aislado de *Pseudomonas aeruginosa* productora de Sao Paulo metalo- $\beta$ -lactamasa (SPM-1) en un paciente chileno. *Revista Chilena de Infectología*, 38, 724-726. [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182021000500724&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182021000500724&nrm=iso)
- Wyres, K. L., Wick, R. R., Gorrie, C., Jenney, A., Follador, R., Thomson, N. R., & Holt, K. E. (2016). Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial Genomics*, 2(12). <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mgen.0.000102>
- Xu, J., Xu, Y., Wang, H., Guo, C., Qiu, H., He, Y., Zhang, Y., Li, X., & Meng, W. (2015). Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant and its effluent-receiving river. *Chemosphere*, 119, 1379-1385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.040>
- Yang, C., Guo, M., Yang, H., Wen, Y., Zhu, Z., Wang, T., Zhu, J., Chen, L., & Du, H. (2022). *bla*<sub>KPC-24</sub>-Harboring *Aeromonas veronii* from the Hospital Sewage Samples in China. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e00555-00522. <https://doi.org/doi:10.1128/spectrum.00555-22>
- Yang, F., Mao, D., Zhou, H., & Luo, Y. (2016). Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China. *PLoS One*, 11(5), e0156383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156383>
- Yin, S., Gao, L., Fan, X., Gao, S., Zhou, X., Jin, W., He, Z., & Wang, Q. (2024). Performance of sewage sludge treatment for the removal of antibiotic resistance genes: Status and prospects. *Science of The Total Environment*, 907, 167862. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167862>
- Yin, X., Deng, Y., Ma, L., Wang, Y., Chan, L. Y. L., & Zhang, T. (2019). Exploration of the antibiotic resistome in a wastewater treatment plant by a nine-year longitudinal metagenomic study. *Environment International*, 133, 105270. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105270>
- Yoon, E.-J., Choi, Y. J., Park, S. H., Shin, J. H., Park, S. G., Choi, J. R., & Jeong, S. H. (2020). A Novel KPC Variant KPC-55 in *Klebsiella pneumoniae* ST307 of Reinforced Meropenem-Hydrolyzing Activity [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.561317>
- Zeng, Z., Lei, L., Li, L., Hua, S., Li, W., Zhang, L., Lin, Q., Zheng, Z., Yang, J., Dou, X., Li, L., & Li, X. (2022). In silico characterization of *bla*<sub>NDM</sub>-harboring plasmids in *Klebsiella pneumoniae* [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1008905>
- Zhang, S., Han, B., Gu, J., Wang, C., Wang, P., Ma, Y., Cao, J., & He, Z. (2015). Fate of antibiotic resistant cultivable heterotrophic bacteria and antibiotic resistance genes in wastewater treatment processes. *Chemosphere*, 135, 138-145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.001>



- Zhang, T., & Li, B. (2011). Occurrence, Transformation, and Fate of Antibiotics in Municipal Wastewater Treatment Plants. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 41(11), 951-998.  
<https://doi.org/10.1080/10643380903392692>
- Zhang, X., Liu, S., Cui, H., & Chen, T. (2016). Reading the Underlying Information From Massive Metagenomic Sequencing Data. *Proceedings of the IEEE, PP*, 1-15.  
<https://doi.org/10.1109/JPROC.2016.2604406>
- Zhang, Z., Li, X., Liu, H., Zamyadi, A., Guo, W., Wen, H., Gao, L., Nghiem, L. D., & Wang, Q. (2022). Advancements in detection and removal of antibiotic resistance genes in sludge digestion: A state-of-art review. *Bioresource Technology*, 344, 126197.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126197>
- Zhao, Y., Chen, X., Hu, X., Shi, Y., Zhao, X., Xu, J., Ding, H., Wu, R., Huang, J., & Zhao, Z. (2021). Characterization of a carbapenem-resistant *Citrobacter amalonaticus* coharbouring *bla*<sub>IMP-4</sub> and *qnrS1* genes. *Journal of Medical Microbiology*, 70(6).  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jmm.0.001364>
- Zouaoui, E., Mercuri, P. S., Radaoui, A., Ben Salah, N., Galleni, M., Ben-Mahrez, K., & Réjiba, S. (2023). High Prevalence of *bla*<sub>NDM</sub> Among Carbapenem Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian Hospital First Report of *bla*<sub>NDM-9</sub>, *bla*<sub>KPC-20</sub>, and *bla*<sub>KPC-26</sub> Genes. *Current Microbiology*, 80(5), 152.  
<https://doi.org/10.1007/s00284-023-03268-2>

### ANEXO 1. Características fisicoquímicas de muestras de AS.

| N°M  | 1           |             | 2          |            | 3          |             | 4           |             |
|------|-------------|-------------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| M    | AF          | EF          | AF         | EF         | AF         | EF          | AF          | EF          |
| TI   | 22,3        | 23,3        | 22,3       | 17,9       | 18,8       | 17,9        | 13,3        | 12,4        |
| TF   | 21,6        | 19,3        | 20         | 17         | 18,7       | 17,4        | 11,5        | 10,1        |
| TP   | 17,3        | 16          | 16,9       | 14,4       | 14         | 10,6        | 8,2         | 6,5         |
| pH-I | 7,1         | 6,7         | 7,2        | 6,7        | 7,1        | 6,7         | 7,6         | 6,9         |
| pH-F | 7           | 6,6         | 7,5        | 6,9        | 7,4        | 7           | 7,6         | 7,1         |
| pH-P | 6,9         | 6,6         | 7,3        | 7,3        | 7,5        | 7,1         | 7,6         | 7           |
| CI   | 1496        | 1268,8      | 807,5      | 655,8      | 1574,2     | 740,9       | 1506,9      | 1462,9      |
| CF   | 784,8       | 64,3        | 769,4      | 658,4      | 773,7      | 695,9       | 1527,6      | 1462        |
| CP   | 1223,5      | 1207,4      | 1106,7     | 1079,1     | 1129,4     | 1178,2      | 1259        | 1196,6      |
| VT   | 105.709.608 | 104.319.180 | 95.615.784 | 93.232.908 | 97.234.812 | 101.798.640 | 108.779.868 | 103.383.000 |

**N°M:** número de muestreo, **M:** muestra, **AF:** afluente, **EF:** efluente, **TI:** temperatura inicial en °C, **TF:** temperatura final en Celsius (°C), **TP:** temperatura promedio en °C, **pH-I:** pH inicial, **pH-F:** pH final, **pH-P:** pH promedio, **CI:** caudal inicial en L/s, **CF:** caudal final en L/s, **CP:** caudal promedio en L/S, **VT:** volumen total en L.

Fuente: ESSBIO, comunicación personal.

## **ANEXO 2.** Protocolo de extracción de ADNg desde bacterias.

Cada bacteria se sembró en agar Trypticase de soya (TSA) y se incubó en aerobiosis a 35°C por 18 - 24 horas. Posteriormente se procedió del modo que se detalla a continuación;

- 1) Con puntas de pipetas estériles se obtuvieron algunas colonias de cada bacteria, las que se sumergieron en tubos Eppendorf de 1,5 µl cargados con 200 µl de agua destilada estéril.
- 2) Los tubos se centrifugaron a 12.000 RPM durante 2 minutos, y se desecharon los sobrenadantes.
- 3) A los precipitados remanentes se les incorporó 200 µl de matriz comercial *InstaGene* (Bio-Rad), y se incubaron en baño termorregulado a 56°C durante 30 minutos.
- 4) Los tubos se agitaron en agitador tipo vortex durante 20 segundos, y se incubaron en termobloque a 95°C durante 10 minutos.
- 5) Los tubos se agitaron en agitador tipo vortex durante 20 segundos, y se centrifugaron a 12.000 RPM durante 2 minutos.
- 6) Los sobrenadantes obtenidos correspondientes a los extractos de ADNg, se traspasaron a nuevos tubos Eppendorf y se almacenaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Fuente: Modificación de protocolo *InstaGene Matrix*, Bio-Rad Laboratories.



### ANEXO 3. Partidores utilizados en PCR convencional.

| AB                          | Partidor     | Secuencia (5'-3')        | Tm | Ta   | Referencia                        |
|-----------------------------|--------------|--------------------------|----|------|-----------------------------------|
| ARNr16s                     | P0           | GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG    | 55 | 1500 | (Weisburg et al., 1991)           |
|                             | P6           | CTACGGCTACCTTGTACG       | 54 |      |                                   |
| bla <sub>SHV</sub>          | SHV3-F       | CTGGGAAACGCAACTGAATG     | 54 | 309  | (Sánchez et al., 2006)            |
|                             | SHV3-R       | GGGGTATCCCGCAGATAAAT     | 53 |      |                                   |
|                             | NueschF      | GCCCCGGGTATTCTTATTTGTCGC | 59 | 1077 | (Nüesch-Inderbinnen et al., 1997) |
|                             | NueschR      | TCTTTCCGATGCCGCCGCCAGTCA | 67 |      |                                   |
| bla <sub>TEM</sub>          | TEM-321      | TGGGTGCACGAGTGGGTAC      | 59 | 526  | (Tenover et al., 1994)            |
|                             | TEM-846      | TTATCCGCCTCCATCCAGTC     | 56 |      |                                   |
| bla <sub>CTX-M-1-like</sub> | CTX-M-1-F    | GGTAAAAAATCACTGCGTC      | 50 | 863  | (Álvarez et al., 2018)            |
|                             | CTX-M-1-R    | ACCGTTGGTGACGATTTTAG     | 53 |      |                                   |
| bla <sub>CTX-M-2-like</sub> | CTX-M-2-F    | TTAATGATGACTCAGAGCATTC   | 50 | 901  | (Amini & Konkori, 2020)           |
|                             | CTX-M-2-R    | GATACCTCGCTCCATTTATTG    | 51 |      |                                   |
| bla <sub>CTX-M-8-like</sub> | CTX-M-8-F    | TGAATACTTCAGCCACACG      | 52 | 923  | (Marcano et al., 2011)            |
|                             | CTX-M-8-R    | TAGAATTAATAACCGTCGGT     | 48 |      |                                   |
| bla <sub>CTX-M-9-like</sub> | CTX-M-9-F    | CGCTTTATGCGCAGACGA       | 56 | 803  | Esta tesis                        |
|                             | CTX-M-9-R    | TTACAGCCCTTCGGCGAT       | 56 |      |                                   |
| bla <sub>VIM</sub>          | VIM-S        | CCGATGGTGTGTTGGTCGCAT    | 58 | 391  | (Pérez I et al., 2008)            |
|                             | VIM-AS       | GAATGCGCAGCACCAGGAT      | 58 |      |                                   |
| bla <sub>NDM</sub>          | NDM-Full-F   | ATGGAATTGCCCAATATTATGCAC | 54 | 813  | (Ejaz et al., 2021)               |
|                             | NDM-Full-R   | TCAGCGCAGCTTGTCGGC       | 61 |      |                                   |
| bla <sub>OXA-48-like</sub>  | CREmOXA-48-F | GCGTGGTTAAGGATGAACAC     | 54 | 438  | (Poirel et al., 2011)             |
|                             | CREmOXA-48-R | CATCAAGTTCAACCCAACCG     | 54 |      |                                   |
| bla <sub>KPC</sub>          | KPC-F        | ATGTCACTGTATCGCCGTCT     | 56 | 893  | (Schechner et al., 2009)          |
|                             | KPC-R        | TTTTCAGAGCCTTACTGCCC     | 54 |      |                                   |

**AB:** ADN blanco, **Tm:** temperatura de *melting*, **Ta:** tamaño del amplicón en pares de bases, **Nota:** todos los partidores se diluyeron en proporción 1:4 con agua libre de nucleasas y de dichas diluciones se practicaron las reacciones de PCR correspondientes.

Fuente: Elaboración propia.

#### ANEXO 4. Condiciones de amplificación utilizadas en PCR convencional.

| Partidor           | Desnaturalización | Etapas de amplificación |                   |               |              | Extensión      |
|--------------------|-------------------|-------------------------|-------------------|---------------|--------------|----------------|
|                    | inicial           | Desnaturalización       | Alineamiento      | Extensión     | N° de ciclos | final          |
| ARNr16S            | 95°C x 10 min.    | 95°C x 1 min.           | 52°C x 30 s.      | 72°C x 1 min. | 30           | 72°C x 3 min.  |
| SHV <sup>(1)</sup> | 95°C x 5 min.     | 95°C x 1 min 30 s       | 60°C x 1 min 30 s | 72°C x 2 min. | 25           | 72°C x 10 min. |
| SHV <sup>(2)</sup> | 94°C x 5 min      | 95°C x 1 min            | 63°C x 1 min 30 s | 72°C x 2 min  | 30           | 72 x 7 min     |
| TEM                | 95°C x 5 min.     | 95°C x 1 min 30 s       | 64°C x 1 min 30 s | 72°C x 2 min. | 25           | 72°C x 10 min. |
| CTX-M-1-like       | 94°C x 5 min.     | 94°C x 25 s.            | 52°C x 40 s.      | 72°C x 50 s.  | 30           | 72°C x 6 min.  |
| CTX-M-2-like       | 94°C x 5 min.     | 94°C x 25 s.            | 52°C x 40 s.      | 72°C x 50 s.  | 30           | 72°C x 6 min.  |
| CTX-M-8-like       | 94°C x 5 min.     | 94°C x 1 min.           | 50°C x 1 min      | 72°C x 1 min  | 30           | 72°C x 5 min   |
| CTX-M-9-like       | 94°C x 10 min     | 94°C x 1 min            | 55°C x 1 min      | 72°C x 3 min  | 35           | 72°C x 10 min. |
| KPC                | 95°C x 15 min     | 94°C x 1 min            | 62°C x 1 min      | 72°C x 1 min  | 38           | 72°C x 10 min  |
| NDM                | 94°C x 10 min     | 94°C x 1 min            | 55°C x 30 s       | 72°C x 45 s.  | 35           | 72°C x 2 min   |
| VIM                | 95°C x 5 min.     | 95°C x 1 min.           | 58°C x 1 min      | 72°C x 1 min  | 30           | 72°C x 7 min   |
| OXA-48-like        | 94°C x 10 min     | 94°C x 30 s.            | 52°C x 40 s       | 72°C x 50 s.  | 36           | 72°C x 5 min   |

(1): Programa para amplificar *bla<sub>SHV</sub>* con partidores SHV3, (2): Programa para amplificar *bla<sub>SHV</sub>* con partidores Nuesch.

Fuente: Elaboración propia.

## **ANEXO 5.** Protocolo de extracción de ADNg desde muestras de AS.

- 1) Se cortaron los filtros *Millipore* en placas de Petri estériles individualizadas por cada muestra con ayuda de una pinza y bisturí estériles.
- 2) Se agregaron los filtros cortados en tubos de lisis con perlas de vidrio (empleando tubos distintos por cada muestra).
- 3) A todos los tubos se les incorporó 978µl de *sodium phosphate buffer* seguido de 122µl de *MT buffer*, y posteriormente se agitaron en vortex.
- 4) Los tubos se homogenizaron en equipo *FastPrep™* (MP Biomedicals) a una velocidad de 6,0 m/s durante 3 minutos.
- 5) Los tubos se centrifugaron a 13.400 RPM por 15 minutos.
- 6) Los sobrenadantes generados se transfirieron a tubos de 2,0 ml (utilizando tubos distintos por cada muestra), y a continuación se les añadió 250µl de *PPs (protein precipitation solution)*.
- 7) Los tubos se agitaron 10 veces manualmente por inversión, y se centrifugaron a 13.400 RPM por 5 minutos.
- 8) Los nuevos sobrenadantes producidos se volvieron a traspasar a tubos de 2,0 ml individualizados por cada muestra.
- 9) Se re-suspendió el reactivo *binding matrix* hasta que quedará visiblemente homogéneo, y se agregó 1 ml a cada tubo con su sobrenadante respectivo.
- 10) Los tubos se agitaron manualmente por inversión durante 2 minutos, para permitir la unión al ADNg.
- 11) Los tubos se dejaron reposar por 3 minutos en un rack, para permitir el asentamiento de la matriz de sílica en el fondo de estos.

- 12) Se descartaron cuidadosamente 500 µl de cada sobrenadante de cada tubo, para no remover la sílica desde el fondo de estos.
- 13) Suavemente se re-suspendieron las mezclas de cada tubo, para permitir que el reactivo *binding matrix* se uniera al sobrenadante remanente, y se transfirieron 600 µl de cada mezcla a *spin filters* (columnas) (insertos en tubos nuevos) individualizados por cada muestra.
- 14) Los tubos se centrifugaron a 13.400 RPM por 1 minuto, y se eliminaron los filtrados generados en cada tubo colector. Esta etapa se repitió hasta traspasar completamente las mezclas de cada tubo con la matriz de unión (*binding matrix*), reutilizando los tubos colectores.
- 15) A cada columna en su tubo respectivo se le incorporó 500µl del reactivo *SEWS-M* y gentilmente se re-suspendió usando pipeta. Luego se centrifugaron a 13.400 RPM por 1 minuto, y se vaciaron los tubos colectores, reutilizándolos.
- 16) Se centrifugaron las columnas junto con sus tubos colectores respectivos a 13.400 RPM por 2 minutos (sin agregar nada). Posteriormente, se descartaron los tubos colectores y se cambiaron por otros nuevos (tubos de 2 ml).
- 17) Las columnas (*spin filters*) se dejaron secar por 5 minutos a temperatura ambiente, y luego se les añadió 70µl de *DES buffer*. (la productividad y resultado final aumentan al incubar a 55°C en baño termostático durante 5 minutos).
- 18) Se centrifugaron las columnas con sus tubos colectores a 13.400 RPM por 1 minuto, para eluir el ADNg en los tubos colectores respectivos.
- 19) Los extractos de ADNg obtenidos se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Fuente: Inserto comercial *FastDNA™ SPIN Kit for Soil* (MP Biomedicals) con modificaciones de Claudia Torres, 2022.

**ANEXO 6.** Concentraciones de ADNg en muestras de AS.

| <b>N° de muestreo</b> | <b>Fecha de muestreo</b> | <b>Tipo de muestra</b> | <b>Código</b> | <b>Concentración</b> |
|-----------------------|--------------------------|------------------------|---------------|----------------------|
| 1                     | 11/01/2022               | Afluente               | 1A            | 236,1 ng/μl          |
|                       |                          | Efluente               | 1E            | 66,6 ng/ μl          |
| 2                     | 18/01/2022               | Afluente               | 2A            | 308,3 ng/μl          |
|                       |                          | Efluente               | 2E            | 46,2 ng/μl           |
| 3                     | 21/04/2022               | Afluente               | 3A            | 178,5 ng/μl          |
|                       |                          | Efluente               | 3E            | 42,7 ng/μl           |
| 4                     | 19/07/2022               | Afluente               | 4A            | 315,9 ng/μl          |
|                       |                          | Efluente               | 4E            | 41,3 ng/μl           |

Fuente: Claudia Torres, comunicación personal 2022.

## ANEXO 7. Cepas control utilizadas en esta tesis.

| Nombre                         | Características                                                                                                             | Función                                                                                                                                                                                                        |
|--------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> UCO168    | <i>bla</i> <sub>TEM</sub> <sup>+</sup> <i>bla</i> <sub>SHV</sub> <sup>+</sup><br><i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> <sup>+</sup> | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> y <i>bla</i> <sub>SHV</sub><br>Control positivo para detección fenotípica de BLEE<br>Control negativo para ensayo de digestión con NheI |
| <i>K. pneumoniae</i> UCO182    | <i>bla</i> <sub>SHV-3</sub> <sup>+</sup>                                                                                    | Control positivo para ensayo de digestión con NheI                                                                                                                                                             |
| <i>E. coli</i> UCO327          | <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> <sup>+</sup> <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> <sup>+</sup>                                        | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> y <i>bla</i> <sub>CTX-M-1-like</sub><br>Control positivo para detección de KPC por <i>NG-Test® CARBA-5</i> .                            |
| <i>K. pneumoniae</i> UCO217    | <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> <sup>+</sup>                                                                                  | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-2-like</sub>                                                                                                                                |
| <i>E. coli</i> UCO298          | <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> <sup>+</sup>                                                                                  | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-8-like</sub>                                                                                                                                |
| <i>E. coli</i> UCO250          | <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> <sup>+</sup>                                                                                 | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>CTX-M-9-like</sub>                                                                                                                                |
| <i>A. baumannii</i> UCO323     | <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> <sup>+</sup>                                                                                    | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>NDM</sub>                                                                                                                                         |
| <i>P. aeruginosa</i> UCO236    | <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> <sup>+</sup>                                                                                    | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>VIM</sub>                                                                                                                                         |
| <i>K. pneumoniae</i> UCO322    | <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> <sup>+</sup>                                                                                   | Control positivo para detección molecular de <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub><br>Control positivo para detección de carbapenemasas clase D por <i>Blue Carba</i>                                              |
| <i>E. cloacae</i> UCO186       | <i>bla</i> <sub>Amp-C</sub> <sup>+</sup><br><i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> <sup>+</sup>                                        | Control de coproducción de BLEE y AmpC                                                                                                                                                                         |
| <i>K. pneumoniae</i> UCO361    | <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> <sup>+</sup>                                                                                    | Control positivo para detección de carbapenemasas clase B por <i>Blue Carba</i>                                                                                                                                |
| <i>K. pneumoniae</i> UCO338    | <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> <sup>+</sup>                                                                                    | Control positivo para detección de carbapenemasas clase A por <i>Blue Carba</i>                                                                                                                                |
| <i>E. coli</i> ATCC25922       | Cepas de referencia de la colección “ <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC)” no productoras de β-lactamasas        | Control para antibiograma.                                                                                                                                                                                     |
|                                |                                                                                                                             | Control negativo para prueba de oxidasa                                                                                                                                                                        |
|                                |                                                                                                                             | Control negativo para detección fenotípica de BLEE                                                                                                                                                             |
|                                |                                                                                                                             | Control negativo para detección de carbapenemasas por <i>Blue Carba</i>                                                                                                                                        |
|                                |                                                                                                                             | Control negativo para detección de carbapenemasas por <i>NG-Test® CARBA-5</i> .                                                                                                                                |
|                                |                                                                                                                             | Control positivo para detección de fermentación de azúcares en agar TSI                                                                                                                                        |
|                                |                                                                                                                             | Control para pruebas bioquímicas convencionales                                                                                                                                                                |
|                                |                                                                                                                             | Control positivo para detección molecular de <i>ARNr16S</i>                                                                                                                                                    |
| <i>S. aureus</i> ATCC25923     |                                                                                                                             | Control negativo en ensayos de PCR convencional                                                                                                                                                                |
| <i>P. aeruginosa</i> ATCC27853 |                                                                                                                             | Control positivo para prueba de oxidasa                                                                                                                                                                        |
|                                |                                                                                                                             | Control negativo para para detección de fermentación de azúcares en agar TSI                                                                                                                                   |

**BLEE:** β-lactamasas de espectro extendido.

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 8.** Matriz de recuentos bacterianos generada en GraphPad Prism para cálculo de ANOVA de dos vías y de comparaciones múltiples de Turkey.

| N° + PM         | Recuentos bacterianos |          |          |           |          |          |             |          |          |             |          |          |          |          |          |           |          |          |             |          |          |             |          |          |
|-----------------|-----------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|-------------|----------|----------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|-------------|----------|----------|-------------|----------|----------|
|                 | RBT (AF)              |          |          | RBGN (AF) |          |          | RBGN-C (AF) |          |          | RBGN-M (AF) |          |          | RBT (EF) |          |          | RBGN (EF) |          |          | RBGN-C (EF) |          |          | RBGN-M (EF) |          |          |
|                 | R1                    | R2       | R3       | R1        | R2       | R3       | R1          | R2       | R3       | R1          | R2       | R3       | R1       | R2       | R3       | R1        | R2       | R3       | R1          | R2       | R3       | R1          | R2       | R3       |
| N°1 (10 - 11 E) | 8,0,E+05              | 1,2,E+06 | 0,0,E+00 | 7,0,E+04  | 5,0,E+04 | 1,4,E+05 | 0,0,E+00    | 3,4,E+04 | 0,0,E+00 | 2,2,E+03    | 2,6,E+03 | 3,0,E+03 | 6,4,E+00 | 7,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00  | 0,0,E+00 | 6,2,E+00 | 1,9,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 |
| N°2 (17 - 18 E) | 2,0,E+06              | 2,6,E+06 | 2,7,E+06 | 5,8,E+04  | 1,2,E+05 | 1,4,E+05 | 6,4,E+03    | 6,8,E+03 | 1,1,E+04 | 3,8,E+02    | 8,3,E+02 | 9,3,E+02 | 3,5,E+00 | 5,8,E+00 | 5,5,E+00 | 0,0,E+00  | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 |
| N°3 (19 - 20 A) | 1,2,E+06              | 1,3,E+06 | 1,7,E+06 | 0,0,E+00  | 3,8,E+04 | 5,6,E+04 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 3,3,E+04 | 4,6,E+02    | 1,5,E+03 | 2,1,E+03 | 1,1,E+00 | 1,2,E+00 | 1,2,E+00 | 0,0,E+00  | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 |
| N°4 (18 - 19 J) | 1,9,E+06              | 8,7,E+05 | 1,2,E+06 | 6,0,E+05  | 4,5,E+05 | 4,5,E+05 | 2,0,E+04    | 2,5,E+04 | 2,5,E+04 | 0,0,E+00    | 5,0,E+01 | 4,0,E+01 | 1,3,E+00 | 1,4,E+00 | 1,5,E+00 | 0,0,E+00  | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 | 0,0,E+00    | 0,0,E+00 | 0,0,E+00 |

**N°+PM:** Numero y periodo de muestreo, **RBT (AF):** Recuento bacteriano total en afluente, **RBGN (AF):** Recuento bacteriano de Bacilos Gram negativos en afluente, **RBGN-C (AF):** Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (4 µg/ml) en afluente, **RBGN-M (AF):** Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con meropenem (2 µg/ml) en afluente, **RBT (EF):** Recuento bacteriano total en efluente, **RBGN (EF):** Recuento bacteriano de Bacilos Gram negativos en efluente, **RBGN-C (EF):** Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con ceftriaxona (4 µg/ml) en efluente, **RBGN-M (EF):** Recuento de bacilos Gram negativos en agar MacConkey suplementado con meropenem (2 µg/ml) en efluente, **R1:** replica 1, **R2:** replica 2, **R3:** replica 3, **E:** enero de 2022, **A:** abril de 2022, **J:** julio de 2022.

Fuente: Elaboración propia.

**ANEXO 9.** Resultados de comparaciones múltiples de Tukey realizadas en *GraphPad Prism*.

| Comparaciones                                             | Valor de P | SE   |
|-----------------------------------------------------------|------------|------|
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN (AF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBT (EF)     | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN (EF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBT (AF)     | 0,5594     | ns   |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBGN (AF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBT (EF)     | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBGN (EF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBT (AF)     | >0,9999    | ns   |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBGN (AF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBT (EF)     | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBGN (EF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBT (AF)     | 0,9972     | ns   |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBGN (AF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBT (EF)     | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBGN (EF)    | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBT (AF) vs. Nº4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)  | <0,0001    | **** |
| Nº1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) | 0,9998     | ns   |
| Nº1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) | 0,9993     | ns   |
| Nº1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBT (EF)    | 0,9992     | ns   |
| Nº1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. Nº1 (10 - 11 E):RBGN (EF)   | 0,9992     | ns   |



|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)     | 0,5594  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)     | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)     | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)     | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)     | 0,9972  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)     | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)   | 0,5502  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF) | 0,5594  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF) | 0,9996  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)    | 0,9996  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)   | 0,9996  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) | 0,9996  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) | 0,9996  | ns   |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)   | 0,9932  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,9326  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | 0,9972  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)   | 0,483   | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF) | 0,9973  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF) | 0,5594  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)    | 0,999   | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)   | 0,999   | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) | 0,999   | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) | 0,999   | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)   | 0,9869  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,9004  | ns   |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | 0,9972  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (AF)       | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)      | 0,4767  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF)    | 0,9971  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF)    | 0,9988  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)       | 0,5594  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)      | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)    | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)    | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)       | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)      | 0,9861  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)       | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)       | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)      | 0,8969  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)       | 0,9972  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)     | 0,4767  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF)   | 0,9971  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF)   | 0,9988  | ns   |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)      | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)     | 0,5594  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)   | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)   | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)     | 0,9861  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)     | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)     | 0,8969  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)     | 0,9972  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)   | 0,4767  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF) | 0,9971  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF) | 0,9988  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)    | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)   | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) | 0,5594  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)   | 0,9861  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,8969  | ns   |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | 0,9972  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)   | 0,4767  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF) | 0,9971  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF) | 0,9988  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)    | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)   | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) | 0,9989  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) | 0,5594  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)   | 0,9861  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,8969  | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°1 (10 - 11 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | 0,9972  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)       | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)       | 0,9966  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)      | <0,0001 | **** |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)       | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)       | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)       | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF)   | 0,9998  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF)   | 0,9993  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)      | 0,9992  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)     | 0,9992  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)     | 0,9966  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)   | 0,9287  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)   | 0,8954  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)      | 0,8918  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)     | 0,8918  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)   | 0,8918  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)   | 0,8918  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)     | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)   | 0,9926  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)   | 0,9858  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)      | 0,9849  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)     | 0,9849  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | 0,9849  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)   | 0,9849  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (AF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |



|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)       | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)      | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)       | 0,9966  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)       | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)      | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)       | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)     | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)     | 0,9966  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)     | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)     | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)   | >0,9999 | ns   |



|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | 0,9966  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | 0,9966  | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°2 (17 - 18 E):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)       | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)      | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)       | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)      | <0,0001 | **** |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)       | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)      | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF)   | 0,9998  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF)   | 0,9993  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)      | 0,9992  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)     | 0,9992  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)     | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)     | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,9994  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,9984  | ns   |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)       | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)      | 0,9982  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)       | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)     | 0,9982  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)     | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,9982  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-C (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)   | 0,9982  | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) | >0,9999 | ns   |

|                                                             |         |      |
|-------------------------------------------------------------|---------|------|
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°3 (19 - 20 A):RBGN-M (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF)      | <0,0001 | **** |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)    | <0,0001 | **** |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)       | <0,0001 | **** |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)      | <0,0001 | **** |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)    | <0,0001 | **** |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF)   | 0,9998  | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF)   | 0,9993  | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)      | 0,9992  | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)     | 0,9992  | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)   | 0,9992  | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBT (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)   | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (AF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF) | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF)      | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBT (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-M (EF)    | >0,9999 | ns   |
| N°4 (18 - 19 J):RBGN (EF) vs. N°4 (18 - 19 J):RBGN-C (EF)   | >0,9999 | ns   |

**SE:** significancia estadística; **ns:** valor de P no significativo > 0,05; **\*\*\*\*:** valor de P altamente significativo < 0,0001.

Fuente: Elaboración propia.