



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Máster Titulado:

Filogenia y epidemiología molecular de genes de resistencia blaKPC, blaNDM-1, blaOXA-48

Realizado por:

MATEO SHAI MALDONADO BARROS

Director del proyecto:

Dr. Juan Carlos Navarro C., Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:
MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito,

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **Mateo Maldonado**, con cédula de identidad 1720487980 declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.



MATEO SHAI MALDONADO BARROS

1720487980

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los

Trabajos de Titulación.



Dr Juan Carlos Navarro C, Ph.D

FIRMA

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

MANUEL ANDRÉS HERRERA YELA

JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ-IGLESIAS

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral

ante el tribunal examinador

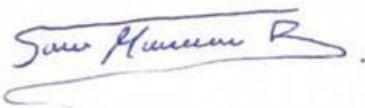
FIRMA

FIRMA

Quito,

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.



MATEO SHAI MALDONADO BARROS

1720487980

DEDICATORIA

A mi madre Rocio Barros, mis hermanos (Doménica y Pablo García), mi abuelita (Rosita Morillo) y mis seres queridos, quienes me han apoyado en este proceso riguroso del cual agradezco su colaboración en todo momento.

AGRADECIMIENTO

A mi familia (Rocio Barros, Doménica Maldonado, Pablo García) por su ayuda y apoyo en todo momento, a mis seres queridos por alentarme y apoyarme para no rendirme en el camino.

A mis compañeros de maestría, quienes no solo compartimos un excelente año sino también fueron experiencias increíbles junto a ellos en este proceso académico. A mis profesores de la UISEK, quienes siempre estuvieron prestos para enseñar con paciencia y dedicación.

A mis compañeros de trabajo y mi jefe, Dr. Ramiro Salazar Irigoyen, quien me ha apoyado en todo momento para dedicarme al campo de la microbiología y estudio de resistencia bacteriana, les tengo un profundo agradecimiento por contribuir con mi crecimiento en el campo de la investigación.

A mis personajes de apoyo, específicamente a Spider-Man, quien me enseño a que no importa cuantas veces te golpee la vida, yo siempre me vuelvo a levantar, y es una filosofía de vida que conservo hasta ahora.

Artículo de tesis

Filogenia y epidemiología molecular de genes de resistencia blaKPC, blaNDM-1, blaOXA-48

Mateo Shai Maldonado Barros¹, Juan Carlos Navarro Castro^{1,2}

¹ Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK; mateo.maldonado@uisek.edu.ec

² Grupo de Enfermedades Emergentes y Desatendidas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Internacional SEK;
juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

* Autor de Correspondencia: juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

Resumen: El uso indiscriminado de antibióticos ha provocado el aparecimiento de las bacterias multirresistentes. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, son bacterias del grupo ESKAPE debido a que produce enzimas que destruyen a los antimicrobianos e inactivan su efecto terapéutico, por lo que se denominan como carbapenemasas, blaKPC, blaNDM y blaOXA-48, de los cuales son considerados como genes productores de carbapenemasas (PDC). La falta de estudios en el Ecuador y los sitios en donde se ha evidenciado la presencia de estos genes pone en riesgo a la población ecuatoriana. La hipótesis planteada es si la diversidad filogenética de los genes PDC muestran una diferenciación entre el Ecuador y los países vecinos, y si existe un patrón filogeográfico de los genes PDC mostrando clados regionales en Latinoamérica y otras regiones del mundo. El método se realizó mediante un muestreo *in silico* de secuencias disponibles en NCBI que contengan genes PDC de *Klebsiella pneumoniae*, de muestras de Ecuador, países vecinos de la región y secuencias de otras regiones geográficas. Se construyeron cuatro matrices de secuencias, y se alinearon mediante el software MUSCLE con penalidades altas para lograr una homología posicional.

Posteriormente se construyeron hipótesis filogenéticas bajo los criterios de máxima parsimonia (MP) en PAUP v.4.0 y por máxima verosimilitud, con apoyo estadístico de ramas por bootstrap con 500 pseudoréplicas, en MEGAX. El análisis filogenético de los genes PDC mostró altos valores de bootstrap, pero con baja estructuración filogeográfica y frecuentes politomías. Las secuencias de Ecuador se agruparon con secuencias de Turquía, Irán y Túnez, lo que evidencia transmisión horizontal mediada por plásmidos y evolución convergente. El estudio enfatiza la necesidad de fortalecer las investigaciones de metagenómica y filogenia comparativa, además de estrategias de control para limitar infecciones nosocomiales.

Palabras clave: bacterias multirresistentes; carbapenemasas; análisis filogenético; *Klebsiella pneumoniae*; divergencia; secuencias.

Abstract: A single paragraph of about 300 words maximum. For research articles, abstracts should give a pertinent overview of the work. We strongly encourage authors to use the following style of structured abstracts, but without headings: (1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; (2) Methods: briefly describe the main methods or treatments applied; (3) Results: summarize the article's main findings; (4) Conclusions: indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article and it must not contain results that are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.

Keywords: multiresistant bacteria; carbapenemase; evolutionary analysis; *Klebsiella pneumoniae*; divergence; sequences.

1. Introducción

El uso de antibióticos ha permitido combatir infecciones bacterianas, no obstante, su abuso ha causado la pérdida de eficacia de dichos medicamentos debido a la selección de poblaciones resistentes. Las bacterias multirresistentes constan entre las principales causas de hospitalización y, a largo plazo, ocasionarán 10 millones de muertes por año en 2050, una cifra mayor que las muertes causadas por cáncer (OMS, 2021).

La resistencia bacteriana se clasifica en resistencia natural y adquirida; la resistencia natural es una cualidad intrínseca de cada especie bacteriana mientras que, la resistencia adquirida se genera a partir de la exposición del microorganismo a un determinado antibiótico, que permite la activación de mecanismos de defensa permitiendo la subsistencia y dispersión de la resistencia microbiana (Fernández y García, 2022). Por otra parte, la transmisión de genes de resistencia se realiza por dos mecanismos: la transferencia horizontal ocurre cuando los organismos adquieren material genético de otras especies por medio de la generación de plásmidos, lo que promueve la rápida expansión de genes de resistencia (López, 2022). Mientras que, la transferencia vertical de genes se da cuando las

bacterias transmiten sus genes a las generaciones descendientes a través de la reproducción (Celis, Rubio, & Camacho, 2017).

Las *Enterobacterias* son el grupo más destacado en generar mecanismos de multirresistencia, siendo una de las principales problemáticas en salud pública. Especies como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, entre otras, pertenecen al grupo de bacterias *ESKAPE* que representan una amenaza de salud pública (Guevara et al., 2021). La bacteria *Klebsiella pneumoniae* es causante de gran parte de las infecciones a nivel de vías urinarias, aparato respiratorio e infección de heridas. (Pachay, 2018). Las bacterias producen distintos mecanismos de resistencia, uno de ellos es la producción de enzimas que destruyen los antimicrobianos e inactivan su efecto terapéutico. Las enzimas más relevantes son las betalactamasas, que degradan el anillo betalactámico de gran parte de antibióticos, de los cuales se clasifican en penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos, entre otras (Rada, Hernández y Villegas, 2019). Los carbapenémicos son una de las últimas opciones en el tratamiento contra infecciones bacterianas en casos de uso de múltiples antibióticos sin efectividad (Queenan y Bush, 2017). Las betalactamasas más comunes son las penicilinas, betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y carbapenemasas (Campos y González, 2021). Las carbapenemasas se distinguen de acuerdo a la clasificación Ambler: Grupo A en la que destaca KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), grupo B siendo la más relevante NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase), y por último del grupo D la más representativa es la OXA-48 (oxacilinasa) (Vera et al, 2017). La detección de los genes de resistencia se realiza de dos formas: por dilución con EDTA, inmunocromatografía y mediante la amplificación y secuenciación de porciones del genoma bacteriano, lo que contribuye al almacenamiento y análisis genético de cada cepa estudiada (Alioto et al., 2023).

Los genes blaKPC, blaNDM y blaOXA-48 son considerados como productores de carbapenemasas (PDC) asociados a *Klebsiella pneumoniae* en la mayoría de las infecciones (Gurung, 2020). Existen dos normativas más utilizadas en el mundo para el estudio de susceptibilidad antimicrobiana y manejo de infecciones con distintos microorganismos multirresistentes, en primer lugar, en muchos países de Norteamérica, América Latina y países asiáticos se usan frecuentemente las normas establecidas por Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Pearson et al, 2019). Por otro lado, en países europeos y otros países se utiliza European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), no obstante, en países donde existe una alta densidad poblacional como en India no se suele seguir a cabalidad el uso de antibióticos, por lo que en varios países no se analizan los esquemas de antibióticos establecidos por las metodologías establecidas (Cusack et al, 2022).

El origen de blaKPC se localiza en la mayor parte de Estados Unidos y tiene una amplia distribución mundial. El origen de blaOXA-48 se sitúa en Turquía en 2004 (Tacão et al., 2018), y se dispersó progresivamente en Medio Oriente, Norte de África y Europa (Sommer et al., 2021). Por otro lado, en 2008, en un paciente de origen sueco se desarrolló una infección de vías urinarias posterior a su viaje en India, de una cepa resistente conocida como NDM-1, y se ha evidenciado la presencia de estos genes en Norteamérica, Oriente Medio, países asiáticos y países nórdicos (Moellering, 2010). En Latinoamérica, Colombia es considerado como sitio endémico de *Klebsiella pneumoniae* con carbapenemasas de tipo KPC, asimismo en Perú y Venezuela las carbapenemasas más prevalentes son de NDM y KPC (Logan y Weinstein, 2017). En Ecuador, se han encontrado casos con bacterias multirresistentes, lo que ha impulsado al MSP a la implementación del Plan de Acción Mundial contra la resistencia a los antibióticos (MSP, 2019). El enfoque evolutivo y filogenético en este tipo de genes de resistencia no se ha abordado en Ecuador, siendo este trabajo un primer avance en este conocimiento.

Análisis filogenéticos o evolutivos de estos genes de resistencia ayudarían al entendimiento de la evolución y epidemiología molecular y el comportamiento de bacterias multirresistentes en la población ecuatoriana y su grado de expansión a futuro. Adicionalmente, el abordaje terapéutico en los países difiere dependiendo de la normativa a la que se rigen, y por ende apliquen antibióticos diferentes y otros casos que sean tratamientos empíricos, lo cual puede ocasionar una dirección evolutiva diferente dependiendo del esquema de aplicación como un factor selectivo.

Por esta razón, este estudio se enfoca en la siguiente *pregunta de investigación*: *¿Cuál es la identidad, homología y diversidad filogenética en cepas productoras de carbapenemasas tipo KPC, NDM y OXA-48 en casos analizados en el Ecuador con respecto a países vecinos? La investigación plantea como hipótesis que la diversidad filogenética de los genes PDC muestra una diferenciación entre Ecuador y los países vecinos, y posiblemente una estructura o patrón filogeográfico de los genes PDC que se muestra por clados regionales.*

Por tanto, el objetivo general de este trabajo fue inferir los posibles patrones filogeográficos en los genes **blaKPC**, **blaNDM** y **blaOXA-48** en *Klebsiella pneumoniae*, productores de carbapenemasas, mediante el uso de herramientas bioinformáticas, para determinar divergencias filogenéticas entre cepas reportadas en el Ecuador con respecto a otros sitios geográficos.

2. Materiales y Métodos

Se realizó un muestreo *in silico* de secuencias disponibles en National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los genes PDC de *Klebsiella pneumoniae*, tomando como variable independiente los genes PDC, como variable dependiente el porcentaje de divergencia entre secuencias seleccionadas y la variable de confusión será el tipo de muestra secuenciada (sangre, expectoraciones, líquidos corporales, muestras ambientales entre otros) intentando lograr una amplia representación geográfica, incluyendo secuencias del Ecuador, países del continente Americano y otras zonas geográficas.

Selección de genes de interés

Como primer paso, se seleccionaron los genes PDC debido a la importancia clínica que presentan en Ecuador y países cercanos. La importancia de conocer este tipo de genes radica en la mayoría de infecciones con bacterias con este tipo de genes incrementa una mayor tasa de brotes hospitalarios y son uno de los principales agentes causales de

infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS) (Espinosa et al., 2022). Por consiguiente, se eligieron secuencias específicas de gran importancia clínica, en el caso de blaKPC se eligió la secuencia denominada NZ_JARWUE010000241.1 procedente de una muestra de hemocultivo perteneciente a la ciudad de Guayaquil, Ecuador (Mejía et al., 2024). Asimismo, la secuencia asignada como: KY609322.1, proveniente de una muestra de líquido ascítico perteneciente a Quito, Ecuador, para el gen blaOXA-48 (Reyes et al., 2020). Para el caso del gen blaNDM, la secuencia de interés para este estudio fue: MF038875.1, proveniente de un hemocultivo secuenciado en Quito, Ecuador (Romero et al., 2017).

Muestreo, construcción de datos y matrices de secuencias

Se usaron datos abiertos de secuencias de genes parciales o completos de plásmidos recopilados en NCBI, se seleccionaron secuencias entre 300 a 900 pb de *Klebsiella pneumoniae* tanto de blaKPC, blaOXA-48 y blaNDM-1. Geográficamente se incluyeron secuencias de Brasil, México, Estados Unidos, entre otros países del continente, igualmente secuencias de Europa, Medio Oriente y Asia. Se tomó especial énfasis en la selección de secuencias de países cercanos a Estados Unidos para el gen blaKPC (Canadá y México), a India para el caso de blaNDM (Pakistán, Bangladesh, China, entre otros), y países cercanos a Turquía para el gen blaOXA-48 (Irán, Irak, Egipto, Grecia, entre otros) de acuerdo con el origen geográfico de cada gen. Para el análisis conjunto de los tres genes, se utilizaron secuencias de diferentes microorganismos como secuencias hermanas: *Raoultella ornithinolytica*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii complex* y se empleó como grupo externo una secuencia de *K. pneumoniae* con el gen de resistencia tipo VIM para el árbol de consenso, y secuencias de *Enterobacter cloacae* para los árboles independientes.

Alineamiento de secuencias

Se construyó una matriz base con todas las secuencias en MEGA versión 11 incluido secuencias hermanas y grupo externo, además se realizaron 3 matrices independientes de acuerdo a los genes blaKPC, blaNDM y blaOXA-48 con sus respectivas secuencias hermanas y se alinearon las secuencias de genes PDC mediante los algoritmos ClustalW y Muscle (MacVector 18.7.6 (60) Serial #90001008 to JCN).

), con altas penalizaciones de creación y extensión de gaps de 30,0 y 15,0, para una búsqueda de la mayor homología posicional (Tamura, Stecher, y Kumar, 2021). Además, en secuencias inconsistentes, se transformó la secuencia en *reverse* y *complement*, permitiendo una corrección en el alineamiento de las mismas.

Se recuperaron un total de 60 secuencias de genes de blaKPC, blaNDM y blaOXA-48 pertenecientes a *Klebsiella pneumoniae*, tres secuencias hermanas en el árbol de consenso, cuatro secuencias hermanas por cada gen y una secuencia como grupo externo en cada árbol respectivamente.

Análisis Filogenéticos

Para la construcción de los cuatro árboles filogenéticos, se realizaron bajo el criterio de máxima parsimonia con un total de 1000 réplicas de adición al azar, con barridos de ramas tipo TBR (Tree Bissection and Reconnection) para la búsqueda de islas de árboles óptimos utilizando los programas MEGA11 y PAUP 4.0 a build169 (Swofford, 2002). Un aspecto a considerar, son las secuencias que no se alinearon a ningún clado, estas fueron las secuencias OM933714.1 y PP391277.1, en la que ambas, posterior al realizar la secuencia *reverse* y *complement*, encajó únicamente la secuencia de Turquía, por lo que, se excluyó la secuencia de Estados Unidos.

Se calcularon los índices de retención y consistencia para la verificación de % de caracteres homólogos. Los valores de apoyo de ramas y robustez estadística se realizaron con 500 pseudoréplicas de Bootstrap por cada 100 réplicas de adición al azar. Los valores de bootstrap muestran porcentajes mostrados sobre los clados generados. Se generó un árbol de máxima verosimilitud (MV) con la matriz base calculando el modelo de sustitución nucleotídica con ModelTest (MEGA) y se comparó con la hipótesis por parsimonia, los cuales resultaron de igual topología.

3. Resultados

El modelo de sustitución nucleotídica resultante por ModelTest fue el de K2P Kimura dos parámetros y las topologías de los árboles resultantes con los algoritmos de optimización por parsimonia y por máxima verosimilitud (con árbol guía de parsimonia y K2P) fueron similares en la estructuración de clados y en la interpretación filogenética, por tanto, se muestran los árboles de parsimonia máxima.

3.1. Análisis del árbol de consenso de genes PDC

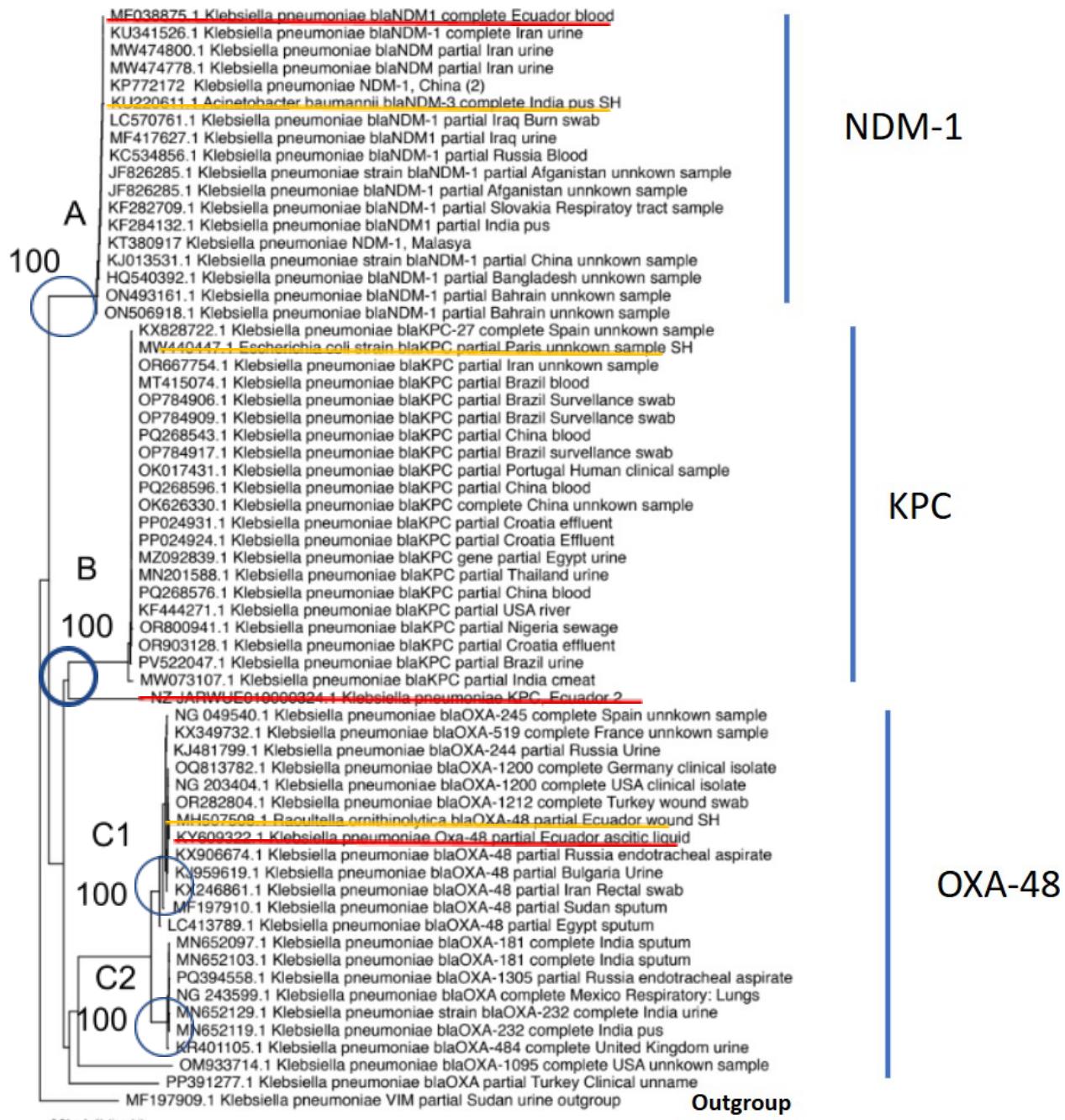


Fig 1. Árbol filogeográfico obtenido a partir de 60 secuencias de los genes blaNDM.1, blaKPC y blaOXA-48 por medio del análisis de Máxima Parsimonia (MP) para la identificación de divergencias entre genes de resistencia y grupo externo. Los valores de apoyo de acuerdo a cada clado fueron generados con un análisis estadístico de bootstrap con 500 pseudoréplicas. La secuencia del grupo externo se encuentra enraizada en la base del árbol filogenético. Las secuencias de estudio provenientes de Ecuador se encuentran enmarcadas con rojo. Las secuencias hermanas se encuentran enmarcadas con naranja. El árbol filogeográfico fue generado utilizando el software PAUP v. 4.0.

En la figura 1, se enraizó en la parte inferior del árbol el grupo externo de *Klebsiella pneumoniae* con gen de resistencia VIM (Metalobetalactamasa de Verona). Los genes de resistencia de *K. pneumoniae* forman grupos monofiléticos con respecto al grupo externo y se agrupan en 3 clados de acuerdo con su grupo de Ambler y Bush. El clado A generó la agrupación de las secuencias del gen NDM-1 (incluyendo *A. baumannii*) provenientes de Ecuador, Irán, China, Irak, Rusia, Afganistán, Eslovaquia, Malasia, Bangladesh y Bahrain, en donde la secuencia de Ecuador MF038875.1 tiene una cercanía con las secuencias de Irán y China. El clado B pertenece al gen de resistencia KPC, en el cual se encuentran agrupadas secuencias de España, Francia, Irán, Brasil, China, Portugal, Croacia, Egipto, Tailandia,

Estados Unidos, Nigeria e India, adicionalmente, la secuencia del Ecuador se encuentra entre el clado B y C con mayor cercanía al clado B, y es próxima a la secuencia de Brasil e India por lo que se infiere que ambos comparten características similares. En los subclados C1 y C2, se encuentra el gen de la familia de OXA-48 de los cuales el subclado C1 agrupa las secuencias de España, Francia, Rusia, Alemania, Estados Unidos, Turquía, Ecuador, Bulgaria, Sudán, Egipto y la secuencia de Ecuador se encuentra adyacente a la secuencia de Turquía, por lo que, su similitud concuerda con la secuencia reportada por primera vez en el país de Oriente Medio. Por otro lado, en el subclado C2, se concentraron las secuencias provenientes de India, Rusia, México, Reino Unido, Estados Unidos y Turquía. Cabe mencionar que, en el origen de las muestras desconocidas (unknow sample) no pudieron ser identificadas, en este contexto, las secuencias OM933714.1 y PP391277.1 se encuentran externas o basales al subclado C2.

3.2 Análisis del árbol blaKPC

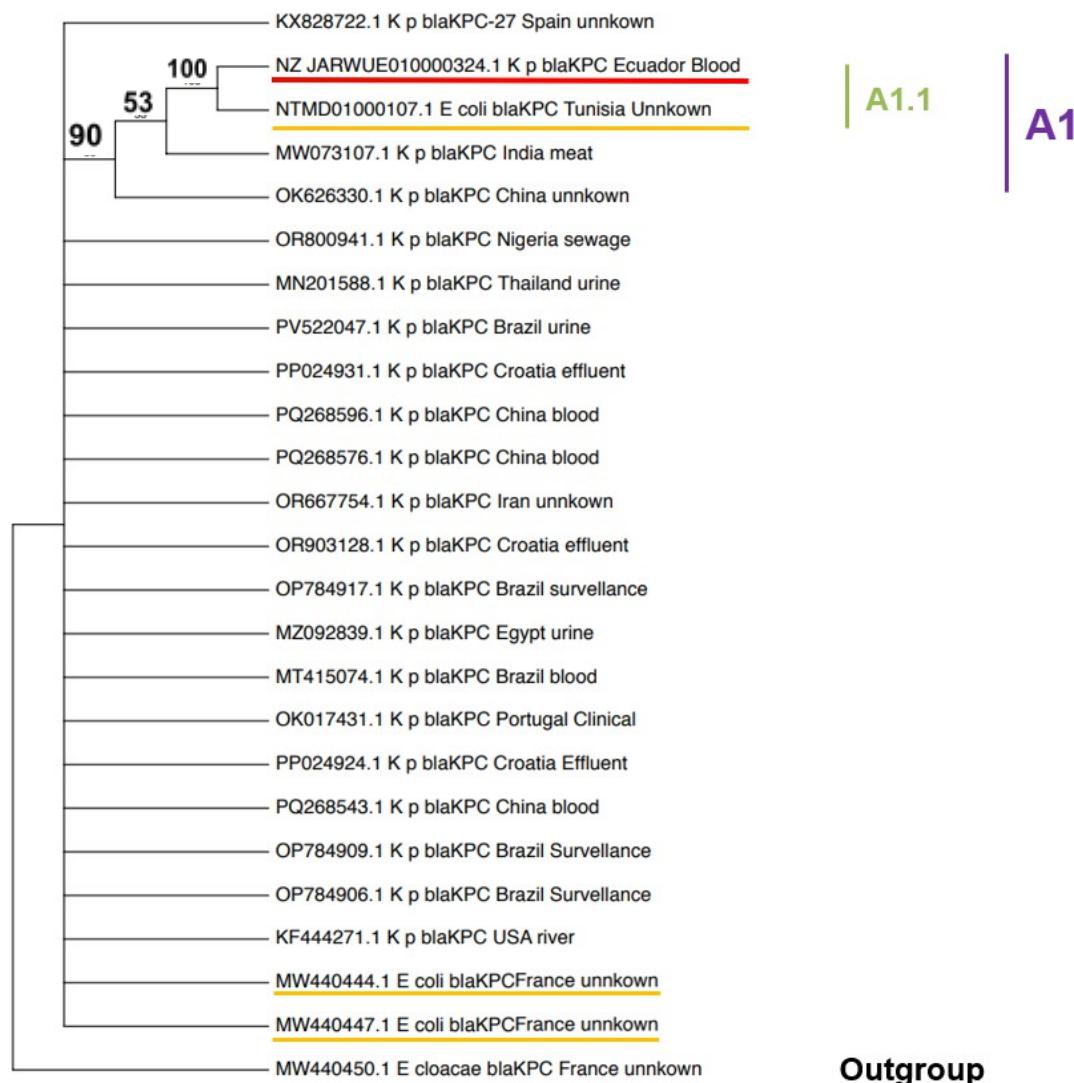


Fig 2. Árbol de MP de gen KPC Árbol filogeográfico obtenido a partir de 20 secuencias de los genes blaKPC por medio del análisis de Máxima Parsimonia (MP) para la identificación de divergencias de entre genes de resistencia y grupo externo. Los valores de apoyo de acuerdo con cada clado fueron generados con un análisis estadístico de bootstrap con 500 pseudoréplicas. La secuencia del grupo externo MW440450.1 enraiza la base del árbol filogenético, mostrando la monofilia del grupo interno. La secuencia de estudio NZ JARWUE10000324.1 proveniente de Ecuador se encuentra marcada con rojo. Las secuencias hermanas se encuentran marcadas con naranja. El árbol filogenético fue generado utilizando el software PAUP 4.0a.

En la figura 2, el árbol blaKPC muestra la monofilia del grupo interno con respecto a *Enterobacter cloacae* MW440450.1 con la que se enraiza en la base del árbol. La mayor parte de las secuencias se ubican en una politomía. En el subclado A1 se encuentran secuencias de Ecuador, Túnez, India y China, lo que muestra una leve diferenciación con un apoyo de bootstrap de 90%. En el clado A1.1

secuencia de Ecuador y Túnez muestran un apoyo de 100% como secuencias relacionadas, en el cual la secuencia de Túnez NTMD01000107.1 está rotulada en NCBI como una secuencia de *E. coli*. El resultado parece sugerir un error de identificación o una relación idéntica entre el gen de ambas especies, lo cual sería necesario verificar con análisis posteriores.

3.3. Análisis del árbol blaNDM

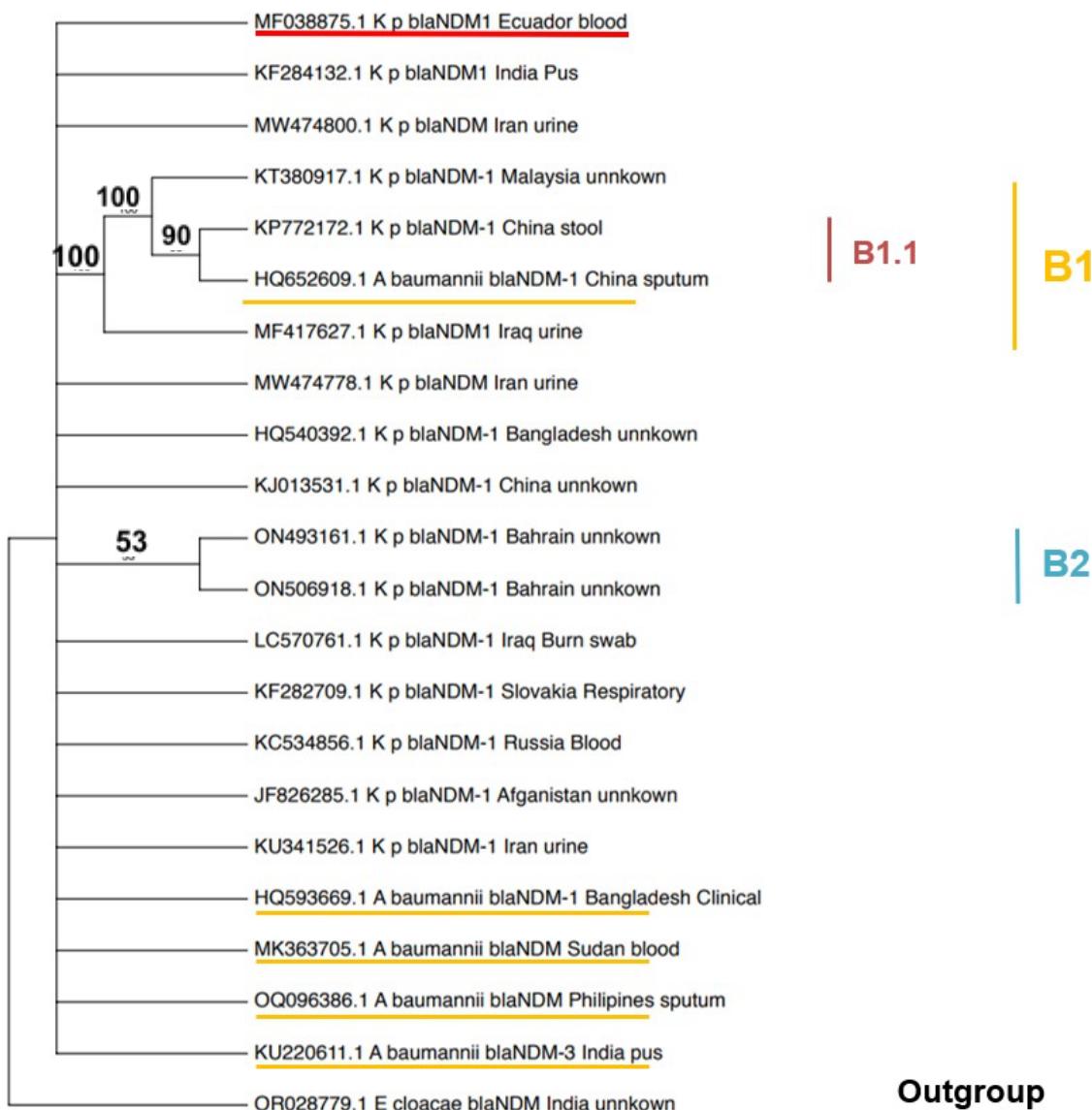


Fig. 3. Hipótesis filogenética de blaNDM obtenido a partir de 20 secuencias del gen blaNDM mediante análisis por Máxima Parsimonia (MP) para la identificación de divergencias de entre genes de resistencia y grupo externo. Los valores de apoyo de acuerdo a cada clado fueron generados con un análisis estadístico de bootstrap con 500 pseudoréplicas. La secuencia del grupo externo OR028779.1 enraiza la base del árbol filogenético. La secuencia MF038875.1 de Ecuador se encuentra marcada con rojo. Las secuencias hermanas se encuentran enmarcadas con naranja. El árbol filogenético fue generado utilizando el software PAUP 4,0a.

En la figura 3, blaNDM-1 muestra monofilia del grupo interno con respecto a *Escherichia coli* OR028779.1. El grupo interno no muestra diferenciación entre el grupo de estudio *Klebsiella pneumoniae* y *A baumannii*, lo que sugiere una evolución convergente de este gen en ambas especies. En el subclado B1 se concentran las secuencias de Malasia, China e Irak, de forma externa la secuencia de Irak MF.417627.1 con un apoyo del 100%. En el clado B1.1, se posicionan las secuencias de KP772172.1 y HQ652609.1, siendo obtenidas en China con 90% de apoyo, sugiriendo una hipótesis de posible una transmisión horizontal entre

K. pneumoniae y *E. coli*, ambas de diferente origen de muestra. En el clado B2 muestra un apoyo de 53% entre ON493161.1 y ON506918.1, con secuencias procedentes del mismo país.

3.4 Análisis de árbol blaOXA-48

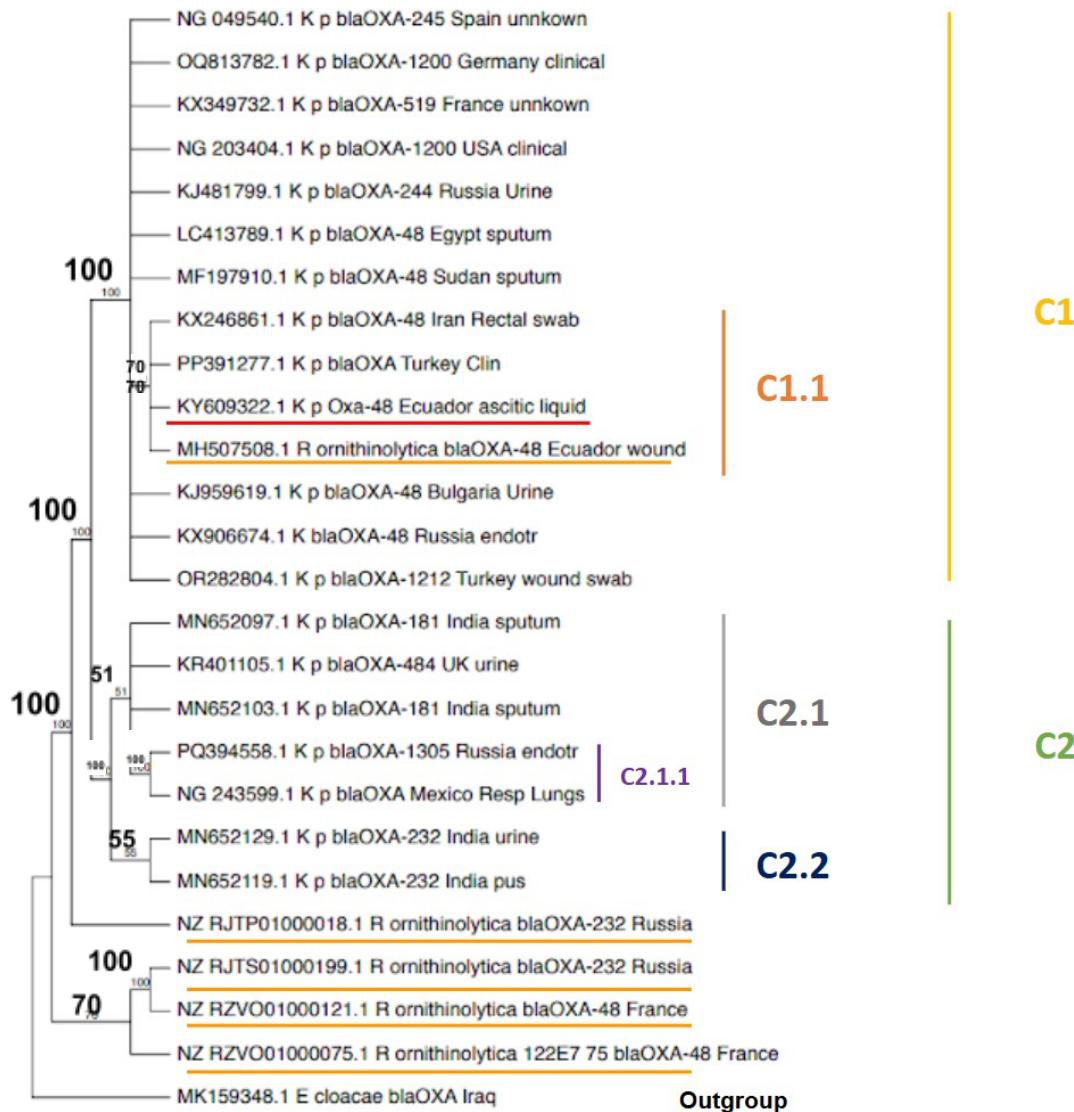


Fig 4. Árbol filogeográfico del gen blaOXA-48 obtenido a partir de 20 secuencias de la familia de blaOXA-48 like (48, 181, 232, 244, 245, 484, 519, 1200, 1212, 1305) y 7 grupos de referencia (seis secuencias hermanas blaOXA-48, blaOXA-232 y una secuencia como grupo externo MK159348.1) por medio del análisis de Máxima Parsimonia (MP). Los valores de apoyo estadístico fueron obtenidos con bootstrap con 500 pseudoréplicas. *E cloacae* representa el grupo externo que enraiza la base del árbol filogenético. El árbol filogeográfico fue generado utilizando el software PAUP 4.0.

En la figura 4, el árbol de máxima parsimonia muestra monofilia del grupo interno *Enterobacter cloacae* MF159348 con un 100% de apoyo. Sin embargo, como en los dos genes anteriores, la hipótesis sugiere una relación evolutiva muy cercana entre el gen blaOXA-48 de *K pneumoniae* y de otra especie, *Ratoultella ornithinolytica*. Se muestra un clado basal de *Ratoultella ornitholytica* bien apoyado con 70% de bootstrap que muestra diferenciación con blaOXA-48 de *K pneumoniae*. No obstante, en el clado C.1.1 se muestra una relación directa entre secuencias de *K pneumoniae* y *Ratoultella ornithinolytica* de Ecuador de diferente fuente de muestra, de forma similar a lo mostrado en el gen blaNDM sugiriendo también una hipótesis de posible una transmisión horizontal.

En el clado C1.1 también se encuentran secuencias de Irán, Turquía, junto a Ecuador, en conjunto con la secuencia de grupo de referencia MH507508.1 proveniente de *R ornithinolytica*.

Con respecto al clado C2 se ha agrupado en el subclado C2.1 el cual contiene politomías de las secuencias de India, Reino Unido y existe una dicotomía en el clado C2.1.1 conformado por secuencias de México y Rusia, ya sea por su origen del tracto respiratorio (muestra de aislado pulmonar y aspirado endotraqueal). Por otro lado, el clado C2.2 presenta un subclado con un 55% de bootstrap entre secuencias extraídas de India, siendo de diferentes tipos de muestras, al igual que el subclado B2 se infiere que ambos pertenecen a un mismo estudio y a un mismo sector geográfico.

4. Discusión y conclusiones

El estudio epidemiológico de los 3 genes analizados a partir de análisis filogeográficos, presenta altos valores de apoyo pero con una baja estructuración filogenética y frecuentes politomías. Esta observación coincide con lo reportado por Becker y cols., que han demostrado una alta conservación de estos genes y su diseminación a través de plásmidos. En este contexto, las secuencias de Ecuador sugieren una relación cercana con variantes de Turquía, Irán y Túnez que puede reflejar la alta transmisión de bacterias multirresistentes y la importancia del estudio de interconexión epidemiológica causante de la diseminación acelerada de carbapenemas entre distintas regiones.

Con respecto a la figura 1, se generaron 3 clados marcados con 100% de bootstrap, no obstante, en el interior de cada gen no existe una agrupación filogenética ajustada a las proximidades de cada país seleccionado, y este patrón sugiere que la persistencia de estos genes está vinculada a su fuerte conservación funcional y una transmisión horizontal conferida por los plásmidos de amplio rango, en lugar de responder a una distribución filogenética definida (Fernández & García, 2022). Por su parte, el gen blaOXA-48 presentó dos clados diferenciados (C1 y C2), lo cual puede atribuirse a la amplia diversidad de la familia OXA-48-like, que incluye múltiples variantes (OXA-181, OXA-232, OXA-244, entre otras), lo que favorece su agrupamiento en subclados distintos dentro del mismo árbol (Tacão et al., 2018; Zhou et al., 2023). Específicamente, la secuencia de Ecuador se incluye en el mismo clado de una secuencia proveniente de Turquía, y presenta una alta asociación con la secuencia hermana de *R. ornithinolytica*, de igual forma reportada en el Ecuador. Otro aspecto a destacar, es la secuencia NZ JARWUE10000324.1 de blaKPC se encuentra por fuera del clado, con base en ello, la secuencia presenta gaps o ausencias lo que impide al modelo considerar como una composición homogénea y genera este error sistemático en el cálculo (Kapli, Flouri & Telford, 2021).

En la matriz independiente del gen blaKPC, el análisis filogenético del gen blaKPC obtenido en este estudio evidencia que el subclado (A1.1) conformado por las secuencias de Ecuador y Túnez con un soporte de bootstrap del 100%, siendo de diferentes especies bacterianas, presentan una transmisión horizontal de genes, lo sugiere la circulación por medio de plásmidos y la capacidad de conferir estos genes de resistencia a bacterias con una mayor recurrencia de infecciones como lo es la *E. coli* (Logan & Weinstein, 2017). Este hallazgo concuerda con reportes previos que señalan que los plásmidos portadores de elementos móviles como Tn4401, son los principales vehículos para la transferencia de blaKPC en diferentes miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, facilitando su diseminación además de *K pneumoniae* (Cuzon et al., 2010; Yigit et al., 2001).

Con respecto a la matriz independiente del gen blaNDM-1, en el clado B1.1 con 90% de apoyo refiere una transmisión horizontal entre plásmidos de distintas especies, cabe mencionar que ambas secuencias provienen de China y su muestra de origen es distinta (Heces y esputo), por lo que la tasa de diferenciación es un factor clave en la localización de bacterias productoras de carbapenemas y en estudios de microbioma, menciona que la tasa de mutación es más lenta en la microbiota intestinal (heces) a comparación de la tasa de mutación más rápida en el microbioma del tracto respiratorio (esputo) (Zhou et al., 2024).

El análisis del gen blaOXA-48 evidenció una cercanía filogenética de las secuencias de Ecuador con aislamientos de Turquía, lo que concuerda con el origen descrito para este gen (Tacão et al., 2018). Investigaciones recientes han mostrado que las variantes OXA-48-like mantienen una gran diversidad, con más de 10 subtipos descritos y asociados a plásmidos IncL/M y ColKP3 (Boyd et al., 2022). El hallazgo de una relación directa entre OXA-48 de *K. pneumoniae* y de *Raoultella ornithinolytica* en Ecuador respalda la hipótesis de transferencia horizontal entre especies bacterianas. No obstante, la presencia de secuencias de ambas especies en el clado C1.1 sugiere que la adaptación de los plásmidos portadores de blaOXA-48 puede circular entre distintas especies bacterianas, en especial las bacterias del grupo ESKAPE (Bezabih et al., 2022). El hallazgo de *R. ornithinolytica* como portadora de blaOXA-48 en diferentes regiones geográficas refuerza la hipótesis de que actúa como reservorio y vehículo para la expansión de este gen hacia otros miembros de los Enterobacterales (Koskinen et al., 2016). Este hallazgo coincide con estudios que han identificado plásmidos tipo IncL/ColKP3 como los principales responsables de la diseminación global de blaOXA-48 y sus variantes.

En el subclado C2.1 la presencia de politomías en las secuencias de India, Reino Unido, México y Rusia indica que las secuencias son altamente conservadas y se necesitan más estudios a futuro para observar este comportamiento en otras bacterias portadoras de estos genes de resistencia. De acuerdo con el subclado 2.1.1.1, en donde las secuencias de México y Rusia indican que las variantes de blaOXA-48 son altamente conservadas y que su diversificación se ha dado en paralelo en sectores geográficos completamente distintos, fenómeno característico de evolución convergente. Con respecto al clado C2.2 en donde se encuentran las secuencias, MN652129.1 y MN652119.1 provenientes de India incluso de la misma casa de salud, lo que explica su cercanía en el árbol filogenético (Singh et al., 2023). Este resultado indica que la transmisión del mismo germe se deba a una infección adquirida en el hospital, lo que refleja la importancia de la higiene y la esterilización del material usado en diferentes áreas críticas, tal como han señalado

estudios internacionales, *K. pneumoniae* con genes de resistencia de la familia blaOXA-48 se asocia frecuentemente a neumonías asociadas a ventilador y bacteriemias en hospitales, representando un riesgo considerable para la salud pública (Poirel et al., 2012).

Al ser comparada la hipótesis por parsimonia, la topología del árbol consenso muestra la estratificación de tres clados con un alto apoyo estadístico, respaldando la hipótesis inicial. Sin embargo, la ausencia de clados definidos por distancias filogeográficas indica la expansión de datos hacia otros factores que expliquen la agrupación de secuencias. Los resultados reflejan que la conformación de los clados es producto de la transmisión horizontal, la presión selectiva intrahospitalaria y la evolución convergente de genes de resistencia. Es por ello que, investigaciones posteriores deberían incluir el estudio de los tipos de plásmidos presentes en las muestras secuenciadas mediante estudios de metagenómica que permitan esclarecer la transferencia horizontal a partir del estudio de árboles filogenéticos. Estos enfoques brindarán una mayor solidez a la hipótesis de que la diseminación de blaKPC, blaNDM y blaOXA-48-responde a patrones de convergencia adaptativa más que a la cercanía geográfica de las muestras.

La topología del árbol consenso resultante muestra una hipótesis filogenética estructurada en tres clados correspondientes con los tres genes estudiados con altos valores de Bootstrap corroborando la hipótesis inicial. Sin embargo, la estructuración de las secuencias no muestra un patrón filogeográfico, sugiriendo una evolución concertada y de muy baja diferenciación que no se corresponde con las distancias geográficas sino con procesos de transmisión horizontal mediada por plásmidos y a fenómenos de evolución convergente.

La cercanía de las secuencias ecuatorianas con aislamientos de Turquía, Irán y Túnez refuerza la hipótesis de que estos genes circulan ampliamente a nivel internacional, impulsados por presiones selectivas hospitalarias y no por barreras geográficas. Las matrices independientes de cada gen se ajustan en politomía y el bajo apoyo por la alta conservación génica.

Desde el punto de vista epidemiológico, se recomienda expandir la vigilancia y monitoreo a través de la secuenciación de muestras clínicas de centros médicos con alto flujo de trabajo, incrementar el número de genes analizados y reforzar la integración de datos genómicos para la detección temprana.

Desde un enfoque de aplicación, los hallazgos de este estudio indican que la diseminación de genes blaKPC, blaNDM y blaOXA-48 no está determinada por la cercanía geográfica, sino por la transmisión horizontal mediada por plásmidos y la evolución convergente, lo que tiene un impacto directo en la salud pública.

La integración de estudios de metagenómica y filogenética comparativa permitirá identificar los plásmidos circulantes en distintos sitios hospitalarios, aportando evidencia clave para el diseño de estrategias de vigilancia y control de infecciones nosocomiales, y reducir la propagación global de carbapenemas.

Contribución de los Autores: “Conceptualización MM, JCN, metodología, software,.; validación,.; análisis formal, MM, JCN; , recursos, JCN.; curaduría de data, MM.; escritura—preparación del borrador o draft original, MM, JCN.; escritura—revisión y edición, JCN.; visualización final, MM, JCN.; supervisión, JCN.; administración y gestión de proyecto, JCN.; adquisición de fondos, JCN. “Los autores han leído y están de acuerdo con la versión final del manuscrito”.

Financiamiento/Fondos: Proyecto UISEK-DII-P011617_2 (JCN)

Agradecimientos: Dr. Ramiro Salazar, por contribuir a la conceptualización de conceptos microbiológicos, y el análisis de la distribución de bacterias multirresistentes en ambientes hospitalarios.

Conflictos de Interés: Los autores declaran no tener conflicto de interés.

Referencias Citadas

1. Adams, M. D., Chan, E. R., Molyneaux, N. D., & Bonomo, R. A. (2010). Genomewide analysis of divergence of antibiotic resistance determinants in closely related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(9), 3569-3577.
2. Alioto, T., Rodiño, B., Cruz, F., Álvarez, M., Bou, G., & Gut, I. (2023). Development of a novel streamlined workflow (AACRE) and database (inCREDible) for genomic analysis of carbapenem-resistant Enterobacterales. *Microbial genomics*. doi:<https://doi.org/10.1099/mgen.0.001132>
3. Becker, L., Kaase, M., Pfeifer, Y., Fuchs, S., Reuss, A., von Laer, A., Abu Sin, M., Korte-Berwanger, M., Gatermann, S., & Werner, G. (2018). Genome-based analysis of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008–2014. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7, Article 62. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0352-y>
4. Bezabih, Y. M., Addisu, A., Gessesse, A., & Liyew, A. (2022). *Klebsiella* spp. and *Enterobacter cloacae* isolates harboring blaOXA-181 and blaOXA-48: resistome, fitness cost, and plasmid stability. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e03320-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03320-22>
5. Boyd S, Holmes A, Peck R, Livermore M, Hope W. 2022. OXA-48-Like β-Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother* 66:e00216-22. <https://doi.org/10.1128/aac.00216-22>
6. Campos, L., & González, A. (2021). Lectura interpretada del antibiograma. *Asoc Esp Pediatría Aten Primaria*, 1-18.
7. Celis, R., Rubio, V., & Camacho, M. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 105-117.
8. Cusack, T., Ashley, E., Ling, C., Roberts, T., Turner, P., & Wangrangsimakul, T. (2022). Time to switch from CLSI to EUCAST? A Southeast Asian perspective. Clinical microbiology and infection. *The official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 782-785.
9. Cuzon, G., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(11), 5370–5373. <https://doi.org/10.1128/AAC.05202-11>
10. Espinosa, A., Trujillo, V., Ramírez, A., Ullauri, S., Cruz, E., & Pozo, V. (2022). Genes involucrados con resistencia antimicrobiana en hospitales del Ecuador. *Revista Médica-Científica CAMbios HECAM*, 21-23.
11. Fernández, & García. (2022). Antimicrobial resistance: A multifaceted challenge. *The Journal of Antibiotics*, 155-165.
12. Galán, J. C., González-Candelas, F., Rolain, J. M., & Cantón, R. (2013). Antibiotics as selectors and accelerators of diversity in the mechanisms of resistance: from the resistome to genetic plasticity in the β-lactamases world. *Frontiers in microbiology*, 4, 9.
13. Guevara, J., Maldonado, M., Valadez, D., Muro, R., Palomares, M., & Rikimatsu, I. (2021). Resistencia bacteriana: organismos del grupo ESKAPE. *Mesa Directiva 2021-2022*, 111.
14. Gurung, S., Kafle, S., Dhungel, B., Adhikari, N., Thapa Shrestha, U., Adhikari, B., Banjara, M. R., Rijal, K. R., & Ghimire, P. (2020). Detection of OXA-48 Gene in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from Urine Samples. *Infection and drug resistance*, 13, 2311–2321. <https://doi.org/10.2147/IDR.S259967>
15. Kapli, P., Flouri, T., & Telford, M. J. (2021). Systematic errors in phylogenetic trees. *Current Biology*, 31(2), R59-R64.
16. Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>.
17. Logan, L., & Weinstein, R. (2017). The Brazilian Journal of Infectious Diseases. *The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace*., 28-36.
18. Lopez, M. (2022). El reto de comprender la transferencia horizontal de la información genética. . *Encuentros en la Biología*, 108–110.
19. Moellering, R. (2010). NDM-1 — A Cause for Worldwide Concern. . *New England Journal of Medicine*, 2377–2379.
20. MSP. (2019). MSP. Obtenido de Plan nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/10/Plan-Nacional-para-la-prevenci%C3%B3n-y-control-de-la-resistencia-antimicrobiana_2019_compressed.pdf
21. OMS. (2021). Obtenido de Resistencia a los antimicrobianos: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
22. Pachay, J. W. (2018). Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. . *Revista Universidad y Sociedad*, 219-223.
23. Pearson, J., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J., Valderrama, D., & Marcano, S. (2019). Latin American consensus to define, categorize, and report multidrug-resistant, extensively drug-resistant, or pandrug-resistant pathogens. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 65-67.
24. 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>
25. Queenan, A., & Bush, K. (2017). Carbapenemases: The Versatile β-Lactamases. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1703-1710.

26. Rada, A., Hernández, C., & Villegas, M. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia. *Biomédica*, 199-200.
27. Reyes, J., Villavicencio, F., Villacís, J., Pavón, E., Campoverde, N., & Espinel, M. (s.f.). First report of a clinical isolate of blaOXA-48-carbapenemase producing *Raoultella ornithinolytica* in South America. *Revista Argentina de microbiología*, 82,83.
28. Romero-Alvarez, Reyes, J., Quezada, V., Satán, C., Cevallos, N., Barrera, S., & Trueba, G. (2017). First case of New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Ecuador: An update for South America. . *Official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 119-121.
29. Rojas M. Whole-genome sequencing of *Klebsiella pneumoniae* MDR circulating in a pediatric hospital setting: a comprehensive genome analysis of isolates from Guayaquil, Ecuador. *BMC Genomics*. 2024 Oct 4;25(1):928. doi: 10.1186/s12864-024-10835-9. PMID: 39367302; PMCID: PMC1451243.
30. Sommer, J., Gerbracht, K. M., Krause, F. F., Wild, F., Tietgen, M., Riedel-Christ, S., Sattler, J., Hamprecht, A., Kempf, V. A. J., & Göttig, S. (2021). OXA-484, an OXA-48-Type Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase From *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.660094>
31. Swofford, D. (2002). PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4.0a build169. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
32. Singh, S., Pathak, A., Fatima, N., Sahu, C., & Prasad, K. N. (2023). Characterisation of OXA-48-like carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from North India. *3 Biotech*, 13(5), 134. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03537-8>
33. Tacão, M., Araújo, S., Vendras, M., Alves, A., Henriques, I., & Dumar, E. (2018). *Shewanella* species as the origin of blaOXA-48 genes: insights into gene diversity, associated phenotypes and possible transfer mechanisms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 340-348.
34. Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11 Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol. Biol. Evol.*, 3022–3027.
35. Vera-Leiva, Alejandra, Barría-Loaiza, Carla, Carrasco-Anabalón, Sergio, Lima, Celia, Aguayo-Reyes, Alejandro, Domínguez, Mariana, Bello-Toledo, Helia, & González-Rocha, Gerardo. (2017). KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
36. Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sánchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>
37. Zhou, X., Shen, X., Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Agnello, M., Zhou, W., ... & Snyder, M. P. (2024). Longitudinal profiling of the microbiome at four body sites reveals core stability and individualized dynamics during health and disease. *Cell Host & Microbe*, 32(4), 506-526.

Anexo 1: Lista de secuencias empleadas en los análisis filogenéticos (4 árboles)

Nro.	CÓDIGO	ESPECIE	GEN	TAMAÑO (PB)	ORIGEN DE MUESTRA	PAÍS
1	MF038875.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	847	Sangre	Ecuador
2	KX828722.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC-27	882	MD	España
3	NG049540.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-245	798	MD	España
4	OQ813782.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-1200	786	Aislado clínico	Alemania
5	KX349732.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-519	798	MD	Francia
6	MN652097.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-181	798	Esputo	India
7	KR401105.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-481	798	Orina	Reino Unido
8	NG203404.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-1200	786	Aislado clínico	USA
9	OM933714.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-1095	825	MD	USA
10	MN652103.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-181	798	Esputo	India
11	KJ481799.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-244	729	Orina	Rusia
12	LC413789.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	317	Esputo	Egipto
13	MF197910.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	317	Esputo	Sudan
14	MN652129.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-232	798	Orina	India
15	KX246861.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	410	Hisopado rectal	Irán
16	KJ959619.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	700	Orina	Bulgaria
17	KX906674.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	727	Aspirado endotraqueal	Rusia
18	PQ394558.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-1305	798	Aspirado endotraqueal	Rusia
19	NG243599.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	798	Tejido pulmonar	México
20	PP391277.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	447	MD	Turquía

21	OR282804.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-1212	798	Hisopado de herida	Turquía
22	KF284132.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	410	Secreción purulenta	India
23	MW474800.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	807	Orina	India
24	KY609322.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaOXA-48	410	Líquido ascítico	Ecuador
25	KT380917.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	528	MD	Malasia
26	MW474778.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	810	Orina	Iran
27	HQ540392.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	810	MD	Bangladesh
28	MF417627.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	420	Orina	Iran
29	KJ013531.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	607	MD	China
30	ON493161.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	590	MD	Bahrain
31	LC570761.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	894	Herida por quemadura	Iraq
32	KF282709.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	709	Muestra tracto respiratorio	Eslovaquia
33	KC534856.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	651	Sangre	Rusia
34	NZ JAB-90.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	703	MD	Polonia
35	JF826285.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	724	MD	Afganistan
36	KU341526.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	813	Orina	Iran
37	KP772172.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	813	Coprocultivo	China
38	ON506918.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaNDM-1	489	MD	Bahrain
39	NZ JA-324.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	311	Sangre	Ecuador
40	OR800941.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	475	Aguas residuales	Nigeria
41	MN201588.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	676	Orina	Tailandia
42	PV522047.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	511	Orina	Brasil
43	PP024931.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	608	Efluente	Croacia
44	PQ268596.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	821	Sangre	China
45	PQ268576.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	821	Sangre	China
46	OR667754.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	798	MD	Iraq
47	OR903128.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	664	Efluente	Croacia
48	OP784917.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	741	Hisopado de control	Brasil
49	MZ092839.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	735	Orina	Egipto
50	MW073107.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	479	Muestra alimentaria	India
51	MN652119.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	798	Hisopado de herida	India
52	MT415074.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	882	Sangre	Brasil
53	PP024924.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	607	Efluente	Croacia
54	OK017431.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	875	MD	Portugal

55	PQ268543.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	899	Sangre	China
56	OP784909.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	831	Hisopado de control	Brasil
57	KF444271.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	738	Hisopado de control	Brasil
58	KF444271.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	539	Muestra ambiental	USA
59	OK626330.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	833	MD	China
60	MK040566.1	<i>K.pneumoniae</i>	blaKPC	417	MD	Egipto
61	MW440447.1	<i>E. coli</i>	blaKPC	882	MD	Francia
62	MH507508.1	<i>R. ornithinolytica</i>	blaOXA-48	403	Herida	Ecuador
63	KU220611.1	<i>A.baumanii</i>	blaNDM-3	813	Hisopado de herida	India
64	MF197909.1	<i>K.pneumoniae</i>	VIM	504	Orina	Sudan
65	NZ_RJT-99.1	<i>R. ornithinolytica</i>	blaOXA-232	507	Absceso abdominal	Rusia
66	NZ_RJT-18.1	<i>R. ornithinolytica</i>	blaOXA-232	607	Lavado bronquioalveolar	Rusia
67	NZ_R-121.1	<i>R. ornithinolytica</i>	blaOXA-232	421	MD	Francia
68	NZ_RZV75.1	<i>R. ornithinolytica</i>	blaOXA-48	571	MD	Francia
69	MW440444.1	<i>E. coli</i>	blaKPC	894	MD	Francia
70	MW440447.1	<i>E. coli</i>	blaKPC	894	MD	Francia
71	NTMD-107.1	<i>E. coli</i>	blaKPC	569	MD	Túnez
72	HQ652609.1	<i>A.baumanii</i>	blaNDM-1	543	Esputo	China
73	OQ096386.1	<i>A.baumanii</i>	blaNDM-1	517	Esputo	Filipinas
74	MK363705.1	<i>A. baumanii</i>	blaNDM-1	444	Sangre	Sudan
75	HQ593669.1	<i>A.baumanii</i>	blaNDM-1	471	Aislado clínico	Bangladesh
76	MK159348.1	<i>E. cloacae</i>	blaOXA-48	410	Orina	Iraq
77	OR028779.1	<i>E. cloacae</i>	blaNDM-1	472	MD	India
78	MW440450.1	<i>E. cloacae</i>	blaKPC	844	MD	Francia

MD: **Muestra Desconocida**