



| POSGRADOS |

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

RPC-SO-26-NO.430-2023

OPCIÓN DE TITULACIÓN:
ARTÍCULOS PROFESIONALES DE ALTO NIVEL

TEMA:

*COMPARACIÓN GENÓMICA DE
ESPECIES DE KLEBSIELLA
SECUENCIADAS EN ECUADOR:
RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y
DIVERSIDAD GENÉTICA*

AUTOR(ES)

DANIEL ALEJANDRO CÓRDOVA BASTIDAS

DIRECTOR:

ANDREA DENISSE BENÍTEZ QUINTANA

QUITO – ECUADOR
2025



Autor:



Daniel Alejandro Córdova Bastidas
Ingeniero en Biotecnología de los Recursos Naturales Candidato a
Magíster en Biotecnología Molecular por la Universidad Politécnica
Salesiana – Sede Quito.
dcordovab@est.ups.edu.ec

Dirigido por:



Andrea Denisse Benítez Quintana
Licenciada en Biología
Máster en Bioinformática
abenitez@ups.edu.ec / dbenitezq@usfq.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

DERECHOS RESERVADOS

2025 © Universidad Politécnica Salesiana.

Elija un elemento.– ECUADOR – SUDAMÉRICA

Daniel Alejandro Córdova Bastidas

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

DEDICATORIA

La vida es como un domingo de subir montañas y cerros, o un sábado de ajuste en la ortodoncia y videojuegos, un viernes de farra, un jueves de amigos, un miércoles de equilibrio, un martes de responsabilidad o un lunes de pereza. Uno siempre se cuestiona cómo llegó hasta ahí, y también los motivos anteriores a esas preguntas. Sin embargo, la satisfacción de un trabajo bien hecho es la misma que alcanzar la cumbre, porque la vista lo vale y rendirse no es una opción. DC.

Esta tesis va dedica a todo aquel que confió en mí. La determinación es lo que permite que la humanidad alcance grandes cosas.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mi madre Cecilia, hermanos Gustavo, David y familia por su apoyo incondicional. Su apoyo constante, sus palabras oportunas y su compañía, silenciosa pero firme, fueron fundamentales para sostenerme en cada etapa. Gracias a ellos, cada avance fue más llevadero y cada dificultad más soportable. Adicionalmente, gracias a quien en vida fue mi mejor amiga, tu espíritu perdurará por siempre.

A mi tutora Dennise, gracias por no soltarme la mano en este proceso. Su guía no solo afinó el enfoque del proyecto, sino también mi manera de pensar. Más que una asesora, fue una brújula amable en medio de los genes, árboles y fechas mal calibradas.

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por brindarme la oportunidad de cursar este posgrado, por el acompañamiento académico constante y por facilitar un entorno de formación exigente pero humano. Esta institución no solo me permitió adquirir nuevos conocimientos, sino también crecer personal y profesionalmente, lo cual ha sido fundamental para la realización de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE

Resumen	12
Abstract	13
1. Introducción	14
2. Determinación del Problema.....	17
3. Marco teórico referencial.....	19
3.1 Importancia clínica de <i>Klebsiella</i>	19
3.1.1 Generalidades de las enterobacterias.....	19
3.1.2 Patogenicidad y enfermedades relacionadas	21
3.2 Resistencia a los antibióticos.....	22
3.2.1 Aminoglicósidos y AMEs.....	22
3.2.2 Betalactámicos y betalactamasas.....	25
3.2.3 Sulfonamidas y su inhibición	29
3.3 Diversidad genética	31
3.4 Herramientas bioinformáticas.....	32
3.4.1 Entornos de trabajo y ejecución de herramientas	33
3.4.2 WSL (Windows Subsystem for Linux)	33
3.4.3 Plataforma Galaxy	33
3.4.4 Herramientas de alineamiento y comparación de secuencias	34
3.4.5 BLAST	34
3.4.6 MAFFT.....	34
3.4.7 Análisis de genomas y construcción de Pangenomas	35
3.4.8 MAUVE y progressiveMauve	35
3.4.9 Anotación de genomas con Prokka	36
3.4.10 Panaroo.....	37
3.4.11 Herramientas de inferencias filogenética	38
3.4.12 IQ-TREE: Inferencia filogenética por máxima verosimilitud.....	38
3.4.13 Herramientas para validación de reloj molecular	39
3.4.14 TempEst	39
3.4.15 Flujo de análisis bayesiano en filogenias.....	42
3.4.16 BEAUTi	42

3.4.17	BEAST	42
3.4.18	Tracer	44
3.4.19	TreeAnnotator	45
3.4.20	FigTree	45
4.	Materiales y metodología.....	47
4.1	Selección de datos genómicos.....	47
4.2	Obtención de datos genómicos desde NCBI	47
4.3	Aplicación de herramientas bioinformáticas, scripts y software	48
4.3.1	Alineación con MAUVE	48
4.3.2	Galaxy y anotación con Prokka.....	49
4.3.3	Construcción del pangenoma con Panaroo y alineación con MAFFT	49
4.3.4	Análisis de reloj molecular con TempEst, BEAUTi y BEAST	50
4.4	Flujo de trabajo (workflow)	53
5.	Resultados y discusión.....	54
5.1	Obtención de datos genómicos	54
5.2	Mapeo geográfico.....	54
5.3	Alineamiento en Mauve	57
5.4	Inferencia filogenética utilizando el método de máxima verosimilitud (ML)	62
5.5	Genes de importancia	63
5.5.1	Aminoglucósidos.....	63
5.5.2	Betalactámicos	64
5.5.3	Quinolonas.....	65
5.5.4	MLS (Macrólidos, lincosamidas y estreptomicinas)	65
5.5.5	Genes de multiresistencia	66
5.5.6	Fenicoles	67
5.5.7	Rifampicinas.....	68
5.5.8	Sulfonamidas	68
5.5.9	Tetraciclinas.....	69
5.5.10	Trimetoprima.....	69
5.6	TempEst	75
5.7	BEAUTi	78
5.8	BEAST	78
5.9	Tracer.....	78
5.10	FigTree	80
5.10.1	Primera rama	82

5.10.2	Segunda rama	83
5.10.3	Tercera rama.....	87
6.	Conclusiones	89
7.	Referencias	90
8.	Anexos	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Flujo de trabajo seguido en el presente trabajo de investigación.....	53
Figura 2.- Mapa geográfico del Ecuador, delimitado por provincias con los principales puntos de muestreo de los genomas	54
Figura 3.- Alineamiento múltiple de genomas correspondientes al año 2020 realizado con progressiveMauve..	58
Figura 4.- Fragmento del alineamiento múltiple de genomas visualizado en Mauve. El recuadro negro señala una región aislada.	59
Figura 5.- Observación desde la herramienta Mauve de un fragmento del alineamiento múltiple provenientes de la región sur del Ecuador. Sin trazado de reordenamientos para una mejor visualización.	60
Figura 6.- Árbol filogenético de cepas del género <i>Klebsiella</i> aisladas en Ecuador entre 2020 y 2023, construido mediante análisis de máxima verosimilitud utilizando IQ-TREE a partir del genoma central definido por Panaroo. Se aplicó el modelo evolutivo HKY+F+I, los valores numéricos indican el soporte estadístico de cada nodo.....	62
Figura 7.- Captura de pantalla del programa TempEst, se muestra el árbol filogenético construido en IQ-Tree con los cuarenta y cinco genomas.	75
Figura 8.- Pestañas Root-to-tip (arriba) y Residuals (abajo) de la herramienta TempEst, se evidencia siete genomas más alejados del resto de muestras, así como una pendiente débil.	76
Figura 9.- Árbol filogenético obtenido a partir de IQ-Tree, modelo HFK+F+I, treinta y ocho genomas analizados, visualizados en TempEst.	77
Figura 10.- Resultado del análisis del archivo LOG en la herramienta Tracer, se observa una buena estimación ESS.....	79
Figura 11.- Resultado de la segunda corrida de BEAST, el parámetro cambiado fue el número de iteraciones..	79
Figura 12.- Se muestra el árbol filogenético calibrado en el tiempo generado a partir del alineamiento de genes del genoma central (core genome) de aislamientos del género <i>Klebsiella</i> , empleando el enfoque Bayesiano implementado en BEAST..	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Genes de resistencia a aminoglucósidos importantes.....	24
Tabla 2.- Genes de importancia que confieren resistencia a los B-lactámicos.....	28
Tabla 3.- Genes asociados a la resistencia a sulfas..	30
Tabla 4.- Parámetros de R2 y Slope de TempEst.	41
Tabla 5.- Localización geográfica de los aislamientos de <i>Klebsiella spp.</i> en Ecuador y sus respectivos años de muestreo, parte 1..	55
Tabla 6.- Localización geográfica de los aislamientos de <i>Klebsiella spp.</i> en Ecuador y sus respectivos años de muestreo, parte 2..	56
Tabla 7.- Lista de genes (y variantes) asociados a resistencia a los aminoglicósidos identificados en los genomas analizados..	71
Tabla 8.- Genes asociados a mecanismos de resistencia frente a Betalactámicos identificados en los genomas analizados.	72
Tabla 9.- Genes asociados a la resistencia de quinolonas identificados mediante BLAST	72
Tabla 10.- Genes y sus variantes relacionados a mecanismos de resistencia de macrólidos, lincosamidas y estreptomicinas (MLS).	73
Tabla 11.- Genes asociados la multiresistencia de diferentes antibióticos detectados en el pangenoma de	73
Tabla 12.- Identificación de genes de resistencia a antibióticos del grupo de los fenicoles en el pangenoma de <i>Klebsiella spp.</i>	73
Tabla 13.- Detección de genes de resistencia a rifampicina en aislados de <i>Klebsiella spp.</i>	74
Tabla 14.- Genes asociados a mecanismos de resistencia a sulfonamidas detectadas en los genomas bacterianos analizados..	74
Tabla 15.- Genes implicados en los mecanismos de resistencia a tetraciclinas obtenidos y detectados en los genomas analizados.	74
Tabla 16.- Genes de resistencia a trimetoprima identificados en aislados de <i>Klebsiella spp.</i>	74
Tabla 17.- Descripción de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> , primera rama.	83
Tabla 18.- Cruce entre las cepas pertenecientes a la primera rama y los genes de resistencia.....	83
Tabla 19.- Descripción de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> , segunda rama.....	85
Tabla 20.- Obtención de genes más relevantes para la segunda rama por cruce de información.	86
Tabla 21.- Descripción de los aislados de <i>K. pneumoniae</i> , tercera rama.....	87
Tabla 22.- Genes de resistencia con mayor coincidencia en las cepas de la tercera rama filogenética.	88

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Alineamiento de los genomas correspondientes al año 2022 solo de <i>K. pneumoniae</i> . Se observan más fragmentaciones y cambios en el orden de las secuencias, lo que indica una mayor variabilidad entre las cepas analizadas ese año.....	99
Anexo 2.- Alineamiento de genomas correspondientes al año 2023. Aunque se analizaron menos cepas, se observaron varios cambios en la posición y orientación de los fragmentos, lo que sugiere diferencias estructurales relevantes entre los genomas.	100
Anexo 3.- Captura de pantalla de la herramienta BEAUti, en la pestaña de configuración de fechas (Tip Dates).....	101
Anexo 4.- Fechas de muestreo de las distintas cepas. Estas fechas fueron obtenidas a partir de los metadatos de cada muestra y empleadas en la construcción del archivo DAT para su uso en BEAUti.....	102
Anexo 5.- Captura de pantalla de la herramienta BEAUti, en la pestaña Sites, donde se configuró el modelo de sustitución HKY. Esta sección permite definir las características del modelo evolutivo utilizado en el análisis filogenético..	103
Anexo 6.- Vista de la pestaña Priors en BEAUti, donde se definen las distribuciones a priori para los parámetros del modelo. En este análisis se mantuvieron las configuraciones por defecto asignadas automáticamente por la herramienta.	104
Anexo 7.- Vista de la pestaña Operators en BEAUti, donde se definen los movimientos aplicados a cada parámetro durante la simulación MCMC. En este análisis se mantuvo la configuración sugerida por el programa, utilizando el esquema de operadores por defecto con la opción Auto Optimize habilitada para ajustar automáticamente los valores durante la ejecución.	105
Anexo 8.- Pestaña MCMC de BEAUti, utilizada para definir la longitud de la cadena, la frecuencia de muestreo y los archivos de salida del análisis. En este caso, se estableció una cadena de 10 millones de iteraciones y se generaron los archivos de log, árboles y puntos de control.	106
Anexo 9.- Visualización del alineamiento múltiple de seis genomas mediante Mauve. Los recuadros señalan regiones con evidencia de reordenamientos e inversiones. Estas se manifiestan como bloques alineados en diferentes posiciones entre cepas o invertidos en orientación.....	107

*COMPARACIÓN
GENÓMICA DE
ESPECIES DE
KLEBSIELLA
SECUENCIADAS EN
ECUADOR:
RESISTENCIA Y
DIVERSIDAD*

AUTOR(ES):

DANIEL ALEJANDRO CÓRDOVA BASTIDAS

RESUMEN

En este estudio se analizaron genomas de diversas especies del género , obtenidos de aislados reportados en Ecuador entre 2020 y 2023, con el objetivo de explorar su diversidad genética y los mecanismos de resistencia antimicrobiana. Se utilizaron herramientas bioinformáticas locales y en línea para la anotación funcional con Prokka, alineamientos genómicos con Mauve y MAFFT, y la construcción de un pangenoma comparativo mediante Panaroo. A partir de los metadatos asociados a cada aislado, se llevó a cabo un análisis de reloj molecular que permitió observar patrones de mutación a lo largo del tiempo. Mediante el cruce con bases de datos especializadas, se identificaron genes de resistencia a betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas, entre otros, presentes en múltiples especies. Los resultados mostraron agrupamientos filogenéticos en los que predominaron las diferencias taxonómicas entre las cepas, aunque en algunos casos también se evidenciaron agrupaciones coincidentes con su procedencia geográfica o temporal, lo que sugiere posibles eventos de transmisión clonal. Se identificaron tanto regiones conservadas como fragmentadas en los genomas, atribuibles a diferencias biológicas o a la calidad de los ensamblajes. La combinación de anotación automática, análisis filogenético, pangenómico y temporal permitió una evaluación integral de la evolución y diseminación de *Klebsiella* en el país. En conjunto, estos hallazgos representan una contribución valiosa para la vigilancia epidemiológica y el control de infecciones bacterianas multirresistentes en Ecuador.

Palabras clave:

Genómica comparativa; resistencia a antibióticos; epidemiología molecular; evolución bacteriana; salud pública; bioinformática aplicada; vigilancia genómica.

ABSTRACT

This study analyzed genomes from various species of the genus, obtained from isolates reported in Ecuador between 2020 and 2023, with the aim of exploring their genetic diversity and antimicrobial resistance mechanisms. Both local and online bioinformatics tools were used for functional annotation with Prokka, genomic alignments using Mauve and MAFFT, and the construction of a comparative pangenome via Panaroo. Based on metadata associated with each isolate, a molecular clock analysis was performed to observe mutation patterns over time. By cross-referencing with specialized databases, resistance genes against beta-lactams, aminoglycosides, quinolones, tetracyclines, and others, were identified across multiple species. The results revealed phylogenetic groupings primarily driven by taxonomic differences among the strains, although in some cases, clusters corresponding to geographic or temporal origin were also observed, suggesting potential clonal transmission events. Both conserved and fragmented regions were detected in the genomes, attributable to biological differences or variability in assembly quality. The integration of automatic annotation, phylogenetic and pangenomic analysis, and temporal approaches enabled a comprehensive evaluation of the evolution and dissemination of *Klebsiella* in the country. Collectively, these findings represent a valuable contribution to genomic surveillance and the control of multidrug-resistant bacterial infections in Ecuador.

Keywords:

Comparative genomics; antibiotic resistance; molecular epidemiology; bacterial evolution; public health; applied bioinformatics; genomic surveillance.

1. INTRODUCCIÓN

Antes de la llegada de los antibióticos, el entendimiento de los microorganismos y las enfermedades transmisibles era algo muy deficiente, es por esto por lo que el tratamiento de estos padecimientos, así como la prevención en el contagio era algo muy poco valorado. Por este y otros múltiples factores, se han originado las diversas pandemias que han impactado a la humanidad a lo largo de su historia. Entre las pandemias históricas provocadas específicamente por bacterias se encuentran: la Peste de Justiniano y peste Negra (*Yersinia pestis*), la cólera (*Vibrio cholerae*), la tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*), la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*), entre otros (Castañeda et al., 2021).

Con el descubrimiento de los primeros antibióticos, se pudo inhibir el crecimiento de microorganismos importantes como *Bacillus anthracis* o *Treponema pallidum* causantes del carbunco (también llamado ántrax) y la sífilis primaria, respectivamente. Sin embargo, estos tenían graves efectos secundarios al tener arsénico, por lo que no era de amplio uso. El panorama de esta guerra contra las infecciones cambia cuando en el año 1928, el bacteriólogo Alexander Fleming descubrió desprevenidamente la inhibición del crecimiento bacteriano por parte de *Penicillium notatum*.

Un año después logra aislar la penicilina, conocida como el primer “verdadero” antibiótico. Posteriormente, otros investigadores logran elucidar la estructura de la penicilina G, el primer antibiótico usado en una infección bacteriana (Uddin et al., 2021). Tras estos eventos históricos, Selman Waksman introdujo el término “antibiótico” para describir una molécula pequeña producida por un microorganismo con el fin de inhibir el crecimiento de otro. Hoy en día, se reconocen que muchos antibióticos clínicamente utilizados son metabolitos secundarios producidos por plantas, hongos e incluso otras bacterias. Estos compuestos no son esenciales para la supervivencia del organismo que los genera,

pero presentan una notable actividad antimicrobiana, lo que confiere un elevado valor terapéutico (Kuzhuppillymyal et al., 2023).

A lo largo del tiempo, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia contra estos compuestos. Sin embargo, a diferencia de lo que se puede suponer, tales mecanismos existían mucho antes de que los seres humanos comenzaran a utilizar estos metabolitos en tratamientos clínicos. Estudios recopilados por Perry et al. (2016), detallan como genes de resistencia a antimicrobianos han sido encontrados en bacterias ambientales, en el permafrost antiguo, lugares aislados como cuevas, y en restos humanos conservados.

Es lógico encontrar genes de resistencia a antibióticos en especies productoras de los mismos, como el caso de *Actinomycetes* con la estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y vancomicina. Esto revela un proceso evolutivo continuo, en el que las bacterias han desarrollado varias estrategias para evadir la acción de los antibióticos (Yushchuk et al., 2020). Entre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos están: la inactivación del antibiótico, la alteración en el transporte o permeabilidad, la alteración del blanco de acción del antibiótico, uso de bombas de eflujo y la formación de biopelículas (Varela et al., 2021).

La resistencia a los antibióticos representa una problemática de creciente importancia, con un incremento anual en el tamaño del “resistoma”, entendiéndose como el conjunto de genes bacterianos que codifican proteínas relacionadas con la resistencia antimicrobiana. Este resistoma plantea una preocupación cada vez mayor en el ámbito de la salud pública, especialmente debido a la inclusión de bacterias responsables de infecciones graves en entornos hospitalarios (nosocomiales).

Un ejemplo de esta preocupación se refleja en el artículo de Chávez-Jacobo (2020), que hace referencia a un grupo de bacterias conocidas como “ESKAPE” (*Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) debido a su relevancia

en infecciones nosocomiales y su alta capacidad para desarrollar resistencia acumulada. La gestión de estos microorganismos constituye uno de los mayores retos para la medicina moderna. Estas bacterias han demostrado una notable habilidad para evadir los tratamientos antimicrobianos convencionales, complicando su erradicación y dificultando el control de infecciones nosocomiales. Es dentro de este grupo de bacterias mencionadas donde se encuentra el microorganismo central de la presente investigación.

Esta investigación se propone realizar un análisis exhaustivo de las secuencias genómicas de distintas cepas de provenientes de Ecuador, con énfasis en la identificación de genes específicos de resistencia antimicrobiana. A través de este enfoque, se busca identificar patrones de variabilidad genética y los mecanismos de resistencia presentes en estas cepas, proporcionando así una mayor comprensión de su diversidad y su potencial impacto en la resistencia antimicrobiana en el contexto hospitalario nacional.

2. DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

El continuo aumento de casos de infecciones de difícil tratamiento debido a bacterias multirresistentes alrededor del mundo representa un desafío prioritario para la salud pública global. En 2021, se estimaron aproximadamente 1.14 millones de muertes directamente atribuidas a la resistencia antimicrobiana, además de que 4.71 millones estuvieron asociadas a infecciones por patógenos resistentes. De mantenerse esta tendencia, se proyecta que para el año 2050 las muertes alcancen los 1.91 millones anuales atribuidas directamente a la resistencia frente a los antimicrobianos y 8.22 millones serán asociadas a infecciones de difícil tratamiento (Naghavi et al., 2024).

es un género bacteriano de elevada importancia clínica, conocido por su capacidad de causar infecciones oportunistas graves, especialmente en entornos hospitalarios. Esta relevancia se debe en gran parte a su habilidad para formar biopelículas, estructuras que le permiten adherirse a superficies inertes y resistir tratamientos de limpieza y desinfección convencionales. Las biopelículas crean una barrera física que protege a las bacterias de la acción de los antimicrobianos, favoreciendo la persistencia de las infecciones y dificultando su erradicación (Khalefa et al., 2025).

Además, también es reconocido por actuar como un reservorio de genes de resistencia, los cuales pueden transferirse horizontalmente a otras bacterias mediante plásmidos y otros elementos genéticos móviles (Wei et al., 2021). Esta capacidad incrementa su potencial epidémico, facilitando la diseminación de mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos en diversos entornos clínicos. Investigaciones como las de Li et al. (2023), González-Rocha et al. (2017), Yang et al. (2023), han encontrado diferentes genes asociados a resistencia a antibióticos en *Klebsiella* ejemplos de estos genes son *aac6'*, *CTX*, *tetD* y *sul1*.

En el Ecuador la investigación genómica enfocada a bacterias, en particular *Klebsiella*, sigue siendo limitada en comparación con otros países latinoamericanos. Aunque se puede encontrar estudios como Calero-Cáceres et al. (2023) y Soria-Segarra et al. (2024), que se enfocan en la resistencia antimicrobiana en conjuntos amplios de bacterias, en la que está incluida. Esta falta de análisis limita la investigación a nivel específico para poder llegar a conclusiones que aporten información concreta de una especie o género en particular.

Es por ello por lo que esta investigación plantea la comparación genómica de especies del género aisladas en Ecuador, con el propósito de caracterizar el estado actual de su diversidad genética y de los determinantes moleculares asociados a su resistencia antimicrobiana. Esto mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas avanzadas, este análisis permitirá identificar patrones evolutivos, distribuciones clonales y la presencia de genes de resistencia que influyen en la capacidad de persistencia de estas cepas en distintos entornos. Este enfoque resulta esencial desde una perspectiva epidemiológica, ya que permite establecer posibles vínculos entre cepas aisladas en diferentes regiones, así como una trazabilidad a lo largo del tiempo y reconocer como es el estado actual de la reserva genética de este género de bacteria en el país (Bastidas-Caldes et al., 2023).

Esta investigación también pretende destacar la relevancia de los estudios genómicos, bioinformáticos y epidemiológicos sobre bacterias en Ecuador. En un mundo en el que las ciencias ómicas juega un papel crucial en el avance de la ciencia y la medicina, es importante comprender y aprovechar el potencial de las herramientas computacionales para analizar y contextualizar los datos genómicos locales. Siendo esto último de importancia creciente en el contexto actual no solo aplicado a sino con brotes como los de tosferina con más de 1300 casos en lo que va de 2025 (El País, 2025; Swissinfo, 2025) o tuberculosis con 1100 casos registrados (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2025), evidencian la necesidad de fortalecer la vigilancia molecular.

3. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 IMPORTANCIA CLÍNICA DE *KLEBSIELLA*

3.1.1 GENERALIDADES DE LAS ENTEROBACTERIAS

La familia *Enterobacteriaceae* comprende un grupo de bacterias que viven en diferentes ambientes, sin embargo, predilectamente habitan en la flora intestinal de animales en los que se incluye el ser humano, y de donde deriva el nombre de esta familia. Este grupo tiene un impacto significativo en la salud pública, la medicina y la veterinaria a nivel mundial, ya que se asocia con numerosos síndromes clínicos, especialmente enteritis transmitidas por alimentos e infecciones zoonóticas. Entre los géneros más destacados dentro de esta familia se encuentran *Escherichia*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* (Janda & Abbott, 2021).

Las enterobacterias han llamado la atención mundial por su capacidad de desarrollar resistencia a múltiples antibióticos, lo que incrementa significativamente el riesgo de infecciones difíciles de tratar. Entre estos antimicrobianos se encuentran los carbapenémicos, considerados antibióticos de última línea, cuando ningún otro ha sido efectivo. Las Enterobacterias resistentes a carbapenémicos (CRE) representan una de las amenazas más críticas en el contexto de la resistencia a nivel mundial, según el Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (Tilahun et al., 2021).

Dentro de esta amplia familia se encuentra el género *Klebsiella*, un grupo de bacterias patógenas gramnegativas. En medios de cultivo con agar, estas bacterias exhiben un fenotipo mucoso, resultado de los polisacáridos adheridos a su membrana externa. Se clasifica comúnmente como un patógeno oportunista, ya que suele infectar a pacientes inmunocomprometidos o que se encuentran hospitalizados (Martin & Bachman, 2018). El término ESBL-E, que se refiere a "Enterobacterias productoras de Betalactamasas de amplio espectro" y precisamente describe a aquellas bacterias de esta familia que generan dichas enzimas y en donde se

encuentra. Actualmente la prevalencia de infecciones ha aumentado para diversos tipos de infecciones en entornos hospitalarios esto como consecuencia de su resistencia (Devi et al., 2020).

El género se caracteriza por su capacidad de adaptarse a una amplia variedad de entornos, encontrándose tanto en ecosistemas naturales como en contextos clínicos. Dentro del ámbito sanitario, puede formar parte de la microbiota normal del ser humano, localizándose en regiones como las fosas nasales, la garganta, la piel y, con mayor frecuencia, el intestino grueso. Aunque en individuos sanos suele comportarse como un comensal inofensivo, en determinadas circunstancias como en personas inmunosuprimidas o pacientes hospitalizados puede actuar como un patógeno oportunista, colonizando vías respiratorias y urinarias. Entre las especies más relevantes desde el punto de vista clínico destacan *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, responsables de diversas infecciones, entre ellas neumonías, infecciones de los tractos y cuadros sépticos (Carvalho et al., 2021).

Asimismo, este género bacteriano tiene la capacidad de permanecer en superficies hospitalarias inertes por tiempos prolongados, desde unas pocas horas hasta varias semanas, particularmente en condiciones secas. Además, su habilidad para formar biopelículas en zonas húmedas le permite resistir procesos de limpieza y desinfección, actuando como reservorio de agentes infecciosos (Calero-Cáceres et al., 2023). Esta combinación de factores, junto con la presencia de genes que confieren resistencia antimicrobiana, convierte a en un microorganismo prioritario para la vigilancia epidemiológica. Por otra parte, también se puede encontrar hábitats no hospitalarios, como pueden ser ambientes naturales. Se ha aislado a partir de fuentes de agua y ambientes acuáticos como ríos, lagos, piscinas de cultivo, etc. Es lógico asociar que al ser una bacteria tradicional de la microbiota humana, se pueda hallar en fuentes de aguas residuales, *K. pneumoniae* se halla en aguas contaminadas que poseen elevadas cantidades de nutrientes. Por otra parte, especies como *K. variicola* es de importancia agronómica por su capacidad de captar y fijar nitrógeno atmosférico al suelo en la rizosfera en la que habita (Araújo et al., 2025).

3.1.2 PATOGENICIDAD Y ENFERMEDADES RELACIONADAS

En los últimos años, se ha observado un incremento en las infecciones causadas por bacterias del género *Klebsiella*, en paralelo con el aumento de infecciones nosocomiales. Esta bacteria es reconocida como una de las principales causas de neumonía hospitalaria y sepsis neonatal, y representa una amenaza crítica para la salud pública, especialmente por su elevada capacidad de resistencia antimicrobiana (Wyres et al., 2020). Otras enfermedades de importancia que pueden presentarse tras una infección por este género son la neumonía severa, la infección multiorgánica, infección de vías urinarias, meningitis, sepsis e infecciones en el tracto biliar por *K. pneumoniae*; infecciones relacionadas al sistema nervioso central, ventriculitis cerebral posoperatorias y abscesos de bazo como complicaciones por *K. oxytoca*; por último se reporta infecciones en el torrente sanguíneo, esto en relación de complejo de *K. aerogenes* y *Enterobacter cloacae* (Chang et al., 2021; Jeon et al., 2021; Neog et al., 2021).

En 1986 se describe por primera vez, en el sudeste asiático, un patotipo emergente de *K. pneumoniae*, la cual se clasifica como hipervirulenta (hvKp), debido a su capacidad de causar infecciones graves y potencialmente fatales en individuos anteriormente sanos. La manifestación común de infección por hvKp es un absceso hepático, sin importar los antecedentes de enfermedades relacionadas al tracto biliar. Sin embargo, también se encuentran casos en los que desarrollan fuertes neumonías, infecciones multiorgánicas o metastásicas como la fascitis necrosante y endoftalmitis; estos cuadros se asocian a tasas de mortalidad variables, y pueden traer graves secuelas a los sobrevivientes como pérdida de visión, daños de forma neurológica (por meningitis), o pérdida de extremidades. Con ayuda de la movilidad mundial, las infecciones por hvKp se han expandido fuera de su primera descripción, presentándose más casos con síntomas clínicos en otras zonas de Asia, Europa, Oceanía, África, Norteamérica y Sudamérica, siendo en esta última específicamente en Brasil y Argentina. Es posible que la gravedad de estas infecciones por hvKp se deba a un plásmido que contiene genes que codifican a la aerobactina, junto con su

receptor. La aerobactina es un agente quelante bacteriano (sideróforo), esto permite a las bacterias productoras la capacidad de secuestrar hierro en ambientes en los que no hay mucha cantidad de este elemento vital para funciones metabólicas de la bacteria (Russo & Marr, 2019; Zhu et al., 2021).

3.2 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

En conjunto con el aumento de casos de infecciones nosocomiales causadas por cepas de , como neumonías, infecciones de tracto urinario e infecciones quirúrgicas, surge otra preocupación creciente: la multiresistencia, que no solo puede ser adquirida por , sino también transmitida. Este género es intrínsecamente resistente a la penicilina debido a la presencia del gen SHV-1, que codifica una penicilinasas; sin embargo, la resistencia a otros antibióticos puede originarse por mutaciones en este gen cromosómico o mediante la transferencia horizontal de genes. A nivel global, la multiresistencia hospitalaria está impulsada por los patógenos del grupo *ESKAPE*. Estas bacterias son responsables de numerosas infecciones nosocomiales y representan un desafío significativo debido a su resistencia (Wyres & Holt, 2018).

3.2.1 AMINOGLICÓSIDOS Y AMES

Los aminoglicósidos son otra familia de antibióticos que se unen en la lucha contra estos microorganismos, en este grupo se subclasifica en naturales como la neomicina, gentamicina, kanamicina, estreptomycin, tobramicina y sisomicina; y los semisintéticos como la amikacina, dibekacina, isepamicina, netilmicina y arbekacina (Glinka et al., 2020). Los aminoglucósidos actúan uniéndose a la subunidad ribosomal 30S bacteriana, con una afinidad específica por el sitio A del aminoacil en el ARN ribosomal 16S. Esta interacción conduce a una lectura defectuosa del código genético, interrumpiendo la traducción y, en consecuencia, inhibiendo la síntesis proteica de las bacterias (Block & Blanchard, 2023).

Sin embargo, de manera similar a las betalactamasas, esta familia de antibióticos también está asociada con enzimas que inhiben sus mecanismos de acción. En términos generales, este grupo de proteínas inhibidoras se conoce como

aminoglycoside modifying enzymes (AME) o enzimas de modificación de los aminoglicósidos. Estas AMEs catalizan modificaciones en los grupos hidroxilo (-OH) y amino (-NH₂) presentes en el núcleo de 2-desoxiestreptamina o en los azúcares asociados, mediante vías catalíticas que incluyen acetiltransferasas, nucleotidiltransferasas y fosfotransferasas. Estas modificaciones resultan en una disminución de la afinidad del antibiótico por su diana molecular, comprometiendo su eficacia terapéutica (Lalitha Aishwarya et al., 2020).

Tabla 1.- Genes de resistencia a aminoglucósidos importantes. **Fuente:** El autor con base en bibliografía (Guzmán et al., 2016; Liang et al., 2021).

GEN	CLASE	CONFIERE RESISTENCIA	ANTIBIÓTICOS AFECTADOS	MECANISMO	FORMA DE ADQUISICIÓN
<i>aac(6')-Ib</i>	Aminoglucósido N-acetiltransferasa	Aminoglucósidos de segunda generación	Amikacina, tobramicina, kanamicina, netilmicina	Modificación por acetilación (posición 6')	Plásmidos conjugativos
<i>aph(3')-IIIa</i>	Aminoglucósido O-fosfotransferasa	Aminoglucósidos de primera generación	Kanamicina, neomicina	Fosforilación en posición 3'	Plásmidos conjugativos
<i>armA</i>	Metiltransferasa ribosomal 16S	Todos los aminoglucósidos (alta resistencia generalizada)	Amikacina, tobramicina, gentamicina, netilmicina, etc.	Metilación del 16S ARNr	Plásmidos de amplio rango
<i>rmtB</i>	Metiltransferasa ribosomal 16S	Todos los aminoglucósidos (alta resistencia generalizada)	Amikacina, tobramicina, gentamicina, netilmicina, etc.	Metilación del 16S ARNr	Plásmidos

3.2.2 BETALACTÁMICOS Y BETALACTAMASAS

Los betalactámicos constituyen una familia de antibióticos cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición del paso final en la síntesis de peptidoglicano. Esto se logra mediante la acilación de la transpeptidasa, enzima responsable de la reticulación de los péptidos necesarios para la formación de la mureína. En esta familia se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y los inhibidores de penicilinasas; estos antimicrobianos tienen en común en su composición un anillo betalactámico, mismo que da nombre a su grupo y representan la mitad de todos los antibióticos que se prescriben a nivel mundial (Astocondor-Salazar, 2018).

Todas las bacterias poseen una pared celular formada por peptidoglicano, también conocido como mureína. Este es un copolímero compuesto por cadenas de glicanos, integradas por subunidades disacáridas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, lo que lo convierte en un polisacárido que incorpora aminoácidos. La mureína es un componente esencial de la estructura bacteriana, ya que proporciona estabilidad mecánica. En las bacterias Gram positivas, la pared celular contiene diez o más capas de mureína, mientras que en las Gram negativas está compuesta por una o dos capas (Neelanjana & Cascella, 2023). Haga clic o pulse aquí para escribir texto. Las penicilinas son uno de los subgrupos de betalactámicos más extendidos en el mundo. Su amplio espectro de acción funciona contra diferentes tipos de bacteria, como los bacilos, los cocos Gram positivos y negativos y anaerobios (Pant, 2024). Muchos de estos antibióticos representan el primer fármaco contra infecciones de diferente gravedad, por ejemplo, la penicilina o amoxicilina, ya que su amplio espectro lo permite, no solo en medicina humana sino también en el ámbito veterinario. Sin embargo, por su historial de acompañar a la especie humana ha logrado generar alergia en algunos individuos.

Según Zhao (2024), hasta un 20% de los pacientes puede experimentar una reacción alérgica de cualquier medicamento administrado, de estos, cerca del 10% reportan

alergia a la penicilina, lo que se soluciona recetando una alternativa que, sin embargo, puede implicar alguna complicación por infección a posteriori. Las cefalosporinas fueron descubiertas en 1945, derivadas del hongo *Acremonium* (anteriormente denominado *Cephalosporium*). Desde su descubrimiento, estas han evolucionado mediante modificaciones químicas, lo que las clasifica como antibióticos semisintéticos. Su desarrollo se ha dividido en generaciones, cada una mejorada para abordar la resistencia bacteriana emergente. En la primera generación, caracterizada por su espectro reducido, se encuentran antibióticos como la cefazolina, cefalotina, cefaloridina y cefalexina, que son particularmente eficaces contra bacterias Grampositivas. Las generaciones posteriores muestran una mayor actividad frente a bacterias Gramnegativas. La segunda generación, de espectro intermedio, incluye antibióticos como la cefuroxima, cefamandol, cefoxitina y cefotetán, entre otros. Por otro lado, las tercera y cuarta generaciones están clasificadas como antibióticos de amplio espectro, destacando fármacos como la cefotaxima y la cefepima (Balsalobre et al., 2020).

Finalmente, la quinta generación corresponde a antibióticos de espectro extendido, incluyendo la ceftarolina y el ceftobiprol, diseñados específicamente para combatir infecciones resistentes como las causadas por *S. aureus* resistente a meticilina MRSA (Mehta & Sharma A. Kumar, 2016). El surgimiento de la resistencia microbiana a los betalactámicos, particularmente por la acción de las betalactamasas, impulsó la búsqueda de inhibidores para estas enzimas. Inicialmente, algunos compuestos naturales como el ácido olivánico, producido por *Streptomyces argenteolus*, demostraron carecer de estabilidad frente a las betalactamasas. Posteriormente, la tienamicina se consolidó como el primer carbapenémico producido, marcando un avance significativo en este campo. Los carbapenémicos, en comparación con las penicilinas y cefalosporinas de su época, mostraron un espectro antimicrobiano más amplio. De manera general, su actividad varía entre los diferentes compuestos: mientras que el imipenem, panipenem y doripenem presentan mayor afinidad hacia bacterias Grampositivas, el meropenem, biapenem y ertapenem son más efectivos contra bacterias Gramnegativas. Estos antibióticos poseen una mejor estabilidad contra las

betalactamasas comparadas con otros betalactámicos, sobre todo por aquellas enzimas producidas por las enterobacterias. Sin embargo, muchas de estas especies han sido capaces de producir otros tipos de mecanismos para resistir estos antibióticos como la síntesis de enzimas hidrolíticas específicas para carbapenémicos (El-Gamal et al., 2017).

La inactivación de antibióticos y la resistencia a estos, es solo uno de los métodos de estrategia que han adquirido las bacterias a lo largo de la evolución, esta inactivación ocurre por degradación enzimática. En este grupo se encuentran los mencionados ESBL-E, con capacidad de producir enzimas capaces de hidrolizar a los betalactámicos. Comúnmente, estas Betalactamasas se pueden clasificar según sus residuos de serina su sitio activo como las clases A, C y D. Por otro lado, se encuentra la clase B, llamada propiamente metalo-beta-lactamasa puesto que requiere iones metálicos como cationes divalentes (+2) de Zn para su actividad (Bush, 2023).

Tabla 2.- Genes de importancia que confieren resistencia a los B-lactámicos. **Fuente:** El autor con base en (Faridah et al., 2023; Fortaleza Neves Bomfim et al., 2023; González-Rocha et al., 2017; Hussain et al., 2021, 2021).

GEN	CLASE	CONFIERE RESISTENCIA	ANTIBIÓTICOS AFECTADOS	MECANISMO	FORMA DE ADQUISICIÓN
<i>CTX-M</i>	β -lactamasa clase A	Resistencia a cefalosporinas de tercera generación	Cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona	Hidrólisis del anillo β -lactámico mediante una serina activa en el sitio catalítico	Transferencia horizontal por plásmidos, elementos móviles como: <i>ISEcp1</i> , <i>ISCR1</i> , <i>IS10</i> e <i>IS26</i>
<i>TEM</i>	β -lactamasa Clase A (de espectro reducido o ESBL, según variante)	Resistencia a penicilinas y algunas cefalosporinas de primera generación	Ampicilina, amoxicilina, cefalotina, cefazolina (TEM-1); cefotaxima, ceftazidima (en variantes ESBL)	Hidrólisis del anillo β -lactámico mediante una serina activa en el sitio catalítico; expansión del espectro por mutaciones residuos (E104K, R164S, G238S, M182T)	Transferencia horizontal por plásmidos y elementos móviles
<i>KPC</i>	β -lactamasa Clase A (carbapenemasa)	Resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas, penicilinas y monobactámicos	Imipenem, meropenem, ertapenem, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam	Hidrólisis del anillo β -lactámico mediada por serina catalítica; inserto en transposón Tn4401 favoreciendo alta diseminación	Transferencia horizontal mediante plásmidos conjugativos/movilizables

3.2.3 SULFONAMIDAS Y SU INHIBICIÓN

Las sulfonamidas o sulfas, fueron de los primeros antibióticos sintéticos de amplio espectro efectivos contra bacterias Gram positivas y negativas. Son análogos estructurales al PABA (ácido p-aminobenzoico) lo que provoca que compita con este ácido por la enzima dihidropteroato (precursor del ácido fólico) y que bloquean la formación del tetrahidrofolato, el cual es esencial para la síntesis de ADN y ARN bacteriano, generando inhibición bacteriostática. Esta inhibición es selectiva e interrumpe solamente el crecimiento bacteriano, dado que las células humanas el folato es obtenido mediante la dieta (Venkatesan et al., 2023; Werth, 2024).

Las bacterias han ido obteniendo características que les permite adaptarse y resistir la presencia de las sulfas, distinguiéndose dos mecanismos principales, mutaciones cromosómicas en el gen *folP* y la adquisición de genes móviles *Sul*. Se suman a mecanismos secundarios como la sobreproducción de PABA o rutas alternas del folato. Las mutaciones en el gen *folP* (blanco de las sulfas), consisten en sustituciones puntuales en la DHPS que reducen la afinidad por las sulfonamidas mientras que conservan a la par su anidad por PABA. Por parte de los genes plasmídicos *Sul*, se han identificado cuatro de estos genes móviles (*sul1*, *sul2*, *sul3* y *sul4*) los cuales codifican para versiones alternativas de la DHPS que son insensibles a las sulfas. Estos genes están asociados con elementos móviles como plásmido o integrones, lo que permite que estas enzimas sustituyan la función de la DHPS nativa de modo que no se inhiben con las sulfas al no bloquear la ruta del ácido fólico (Venkatesan et al., 2023; Wang et al., 2023).

Tabla 3.- Genes asociados a la resistencia a sulfas. **Fuente:** El autor basado en bibliografía (Venkatesan et al., 2023; Wang et al., 2023; Werth, 2024).

GEN	CLASE	ANTIBIÓTICOS AFECTADOS	MECANISMO	FORMA DE ADQUISICIÓN
<i>folP</i> (mutado)	Sulfonamidas	Sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametizol, etc.	Mutación puntual en DHPS que disminuye afinidad por sulfonamidas	Mutaciones espontáneas cromosómicas
<i>sul1</i>	Sulfonamidas	Sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametizol, etc.	DHPS alternativo codificado por plásmido	Integrone de clase 1 en plásmidos conjugativos
<i>sul2</i>	Sulfonamidas	Sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametizol, etc.	DHPS alternativo codificado por plásmido	Plásmidos, a veces independientes de integrone
<i>sul3</i>	Sulfonamidas	Sulfametoxazol, sulfadiazina, sulfametizol, etc.	DHPS alternativo variante	Integrone atípicos, plásmidos

3.3 DIVERSIDAD GENÉTICA

Como en toda especie viva, la importancia de la diversidad genética radica en la perpetuación de esta, ya que permite la selección natural. Este proceso es más evidente en bacterias y otros microorganismos que en organismos complejos, debido a que la rapidez con la que transcurren sus generaciones permite observar adaptaciones fenotípicas en plazos mucho más cortos, siempre ligadas a cambios genotípicos. Existe una alta diversidad genética a nivel genómico incluso dentro de una misma especie bacteriana, lo cual se explica por su rápida cinética de crecimiento (Ramírez-Sánchez et al., 2022).

La diversidad genética en bacterias puede considerarse dinámica, ya que su herencia no ocurre únicamente de forma vertical, sino también a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes. Esto implica la incorporación de material genético proveniente de otras especies o linajes distantes, lo que da lugar a genomas mosaico. Es importante destacar que la diversidad genética no debe analizarse únicamente a nivel de especie, sino también desde una perspectiva comunitaria, como ocurre en consorcios bacterianos presentes en suelos, fuentes hídricas o en la microbiota humana. En estos entornos, la proximidad y la interacción constante entre especies facilitan la transferencia de genes. Esta dinámica impulsa la evolución adaptativa, al permitir que las bacterias se adapten con mayor facilidad a nuevos nichos ecológicos, accedan a nuevas fuentes de nutrientes, toleren la presencia de agentes tóxicos (como metales pesados) y desarrollen resistencia a antibióticos y otros compuestos antimicrobianos. Esta variabilidad genética puede observarse y analizarse mediante herramientas como el pangenoma, que se abordará más adelante (Arnold et al., 2022).

La rápida tasa de crecimiento de las bacterias provoca que, incluso bajo condiciones estrictamente controladas en laboratorio, estas continúen evolucionando. Según Askenasy et al. (2024), la acumulación de inversiones, inserciones, deleciones (indels), polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y otras mutaciones da lugar a

procesos de microevolución que generan cepas genéticamente distintas, con impactos observables y medibles en su fisiología, virulencia y resistencia. Si bien la evolución de cepas puede considerarse un proceso inevitable y multifactorial que ocurre tanto en ambientes naturales como artificiales, la adquisición horizontal de genes constituye un motor adicional que impulsa y diversifica estos cambios evolutivos.

El concepto de Pangenoma fue introducido por (Tettelin et al., 2005), dada la necesidad de representar la variabilidad genética total en un grupo de organismos relacionados, se conoce como pangenoma al conjunto completo de genes presentes en todos los miembros de un mismo grupo taxonómico, como una especie o un género. Este se divide en tres componentes: el genoma central (*core genome*), que incluye los genes compartidos por todos los miembros del grupo; el genoma accesorio (*dispensable genome*), compuesto por genes presentes solo en algunas cepas y que reflejan adaptaciones específicas como la resistencia a antibióticos o la capacidad de colonizar ciertos nichos; y los genes únicos o específicos de cepa, que son exclusivos de un solo genoma y pueden conferirle características funcionales particulares. El concepto de pangenoma permite entender la diversidad genética intraespecífica y es clave para estudios de evolución, adaptación, patogenicidad y desarrollo de estrategias terapéuticas o biotecnológicas (Vernikos, 2020).

3.4 HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

La comparación de genes, inicialmente centrada en estudios individuales, ha evolucionado hacia análisis a nivel genómico gracias al avance de la biología computacional. El estudio de genomas bacterianos presenta desafíos específicos, como reorganizaciones estructurales, transferencia horizontal de genes y deleciones, que generan variabilidad entre linajes. Para abordar estas complejidades, se han desarrollado herramientas bioinformáticas que permiten organizar, depurar y analizar grandes volúmenes de datos genéticos. Estas soluciones incluyen plataformas en línea como Galaxy o CIPRES, así como entornos

locales basados en scripts de programación, facilitando un procesamiento reproducible y escalable de la información genómica.

3.4.1 ENTORNOS DE TRABAJO Y EJECUCIÓN DE HERRAMIENTAS

3.4.2 WSL (WINDOWS SUBSYSTEM FOR LINUX)

El subsistema de Windows para Linux o WSL permite ejecutar aplicaciones nativas de Linux en Windows sin recurrir a máquinas virtuales, facilitando el uso local de herramientas bioinformáticas. Su implementación ha favorecido la integración de pipelines desarrollados originalmente en entornos *UNIX*, como *SCRAP* para análisis de ARN quimérico (Mills Iv et al., 2023). *ReportType* para tipificación de patógenos y suites como *INSaFLU-TELEVIR* para vigilancia genómica de virus. Asimismo, herramientas de visualización como *Methylmap* pueden instalarse y ejecutarse en WSL, ampliando su accesibilidad. Para un desempeño óptimo, se requiere familiaridad con los comandos y estructura del sistema operativo Linux (Coopman et al., 2025; Cruz et al., 2024; Santos et al., 2024).

Los diferentes scripts utilizados se subieron en el repositorio virtual GitHub, con el siguiente enlace: https://github.com/lrondaniel34/Scripts_Tesis.

3.4.3 PLATAFORMA GALAXY

Galaxy es una plataforma de código abierto que facilita la ejecución accesible y reproducible de herramientas bioinformáticas. Permite integrar análisis en *workflows*, mantener un historial detallado de versiones y parámetros, y compartir flujos de trabajo estandarizados. Sus principales servidores incluyen Galaxy Main (usegalaxy.org), Galaxy Europe (usegalaxy.eu), Galaxy Australia (usegalaxy.org.au) y Galaxy Asia (usegalaxy.org.cn). Su arquitectura modular la ha consolidado como un recurso clave en disciplinas como genómica, transcriptómica, proteómica y metagenómica, proporcionando compatibilidad con exportación de resultados en múltiples formatos (Abueg et al., 2024).

3.4.4 HERRAMIENTAS DE ALINEAMIENTO Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS

3.4.5 BLAST

BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) es una herramienta clásica utilizada para el alineamiento local de secuencias biológicas, desarrollada para superar las limitaciones computacionales de los métodos de alineamiento global como Needleman-Wunsch y Smith-Waterman, que, aunque precisos, resultaban poco prácticos ante bases de datos en crecimiento constante (Altschup et al., 1990).

Su algoritmo fragmenta la secuencia de consulta en "palabras" cortas y busca coincidencias en la base de datos, extendiendo posteriormente las coincidencias para formar alineamientos más largos. El proceso se apoya en métricas estadísticas como el Bit score, que mide la calidad del alineamiento, y el E-value, que estima la probabilidad de que el alineamiento ocurra por azar, permitiendo así discernir coincidencias biológicamente significativas (Samal et al., 2021).

Para el alineamiento de proteínas, BLAST emplea matrices de sustitución como PAM o BLOSUM62, optimizadas para detectar homología funcional, mientras que para ADN se utilizan matrices simples que asignan valores positivos a matches y negativos a mismatches. Aunque BLAST es ampliamente accesible vía NCBI en línea, su ejecución local en entornos Linux ofrece ventajas sustanciales como la personalización de bases de datos, mayor velocidad de búsqueda, privacidad de los datos, y automatización mediante scripting, haciéndolo ideal para proyectos de bioinformática a gran escala (National Center for Biotechnology Information (US), 2008).

3.4.6 MAFFT

MAFFT (*Multiple Alignment using Fast Fourier Transform*) es una herramienta para la alineación múltiple de secuencias que destaca por su eficiencia y flexibilidad, especialmente en contextos donde el volumen de datos supera las capacidades de métodos tradicionales como ClustalW. Su nombre refleja el uso de la transformada

rápida de Fourier, una técnica matemática que permite detectar patrones repetitivos en las secuencias y acelerar significativamente el proceso de alineamiento (Zhang, 2024).

MAFFT incorpora diferentes estrategias de alineación adaptadas a las necesidades del usuario: L-INS-i, que proporciona alta precisión a costa de tiempo computacional; FFT-NS-1, que equilibra velocidad y calidad mediante refinamientos iterativos; y FFT-NS-2, orientado a máxima velocidad en grandes conjuntos de datos. Esta combinación de modos convierte a MAFFT en una herramienta versátil para estudios de genómica comparativa, análisis evolutivo y construcción de filogenias (Kato et al., 2002).

3.4.7 ANÁLISIS DE GENOMAS Y CONSTRUCCIÓN DE PANGENOMAS

3.4.8 MAUVE Y PROGRESSIVE MAUVE

MAUVE (*Multiple Alignment of Conserved Genomic Sequence With Rearrangements*) es un software diseñado para el alineamiento múltiple de genomas completos, particularmente eficiente en bacterias, donde las reorganizaciones genómicas ocurren con frecuencia (A. C. E. Darling et al., 2004):

Su algoritmo se basa en cinco pasos principales: identificación de alineamientos locales mediante multi-MUMs (*Multiple Maximal Unique Matches*), construcción de un árbol guía, agrupamiento de anclas en bloques colineales (LCBs), refinamiento recursivo de anclajes, y alineamiento progresivo basado en el árbol guía. Progressive Mauve, es un paso más allá del algoritmo, incorpora una puntuación de ruptura de suma de pares que mejora la detección de reordenamientos estructurales complejos, así como un filtrado probabilístico para reducir errores de alineamiento, permitiendo encontrar regiones reordenadas con mayor precisión y considerar no solo genes, sino también regiones reguladoras no codificantes (A. E. Darling et al., 2010).

3.4.9 ANOTACIÓN DE GENOMAS CON PROKKA

Diversos estudios destacan a Prokka como una herramienta clave dentro del flujo de trabajo bioinformático para la anotación genómica. Por ejemplo, Winter et al. (2023), utilizaron Prokka para anotar las características genómicas de 19 cepas del género *Acinetobacter*, las cuales fueron empleadas posteriormente en estudios sobre transformación natural y resistencia antimicrobiana. De forma complementaria, Kim et al. (2021), aplicaron Prokka para anotar un total de 5,414 genomas representativos obtenidos a partir de metagenomas fecales de Corea, India y Japón. En este caso, Prokka fue utilizado para identificar genes codificantes, ARNr y ARNt, lo que pone ejemplifica su capacidad de adaptación tanto a escalas pequeñas como a proyectos de gran magnitud, y evidencia su relevancia en estudios de microorganismos y la caracterización funcional del microbioma intestinal.

Prokka es una herramienta de línea de comandos desarrollada para la anotación rápida y automatizada de genomas procariotas, diseñada específicamente para superar las limitaciones de servicios web como *RAST* o *PGAAP*. Estas plataformas, aunque funcionales, presentan inconvenientes en contextos donde se requiere alta velocidad, manejo de datos sensibles o integración directa en pipelines bioinformáticos, ya que su procesamiento puede tardar desde varias horas hasta días completos. La herramienta toma como entrada archivos en formato FASTA con secuencias genómicas previamente ensambladas (scaffolds o contigs) y genera múltiples archivos de salida compatibles con análisis posteriores, entre ellos: GFF, GBK, FAA, FFN, FNA y TBL, lo que permite su visualización en visores genómicos y su utilización en flujos de análisis estándar. El proceso de anotación de Prokka se basa en la combinación de diversos algoritmos especializados. Para la predicción de genes codificantes (CDS), emplea *Prodigal*; para la identificación de genes de ARN ribosómico, utiliza *RNAmmer*; mientras que *Aragorn* se encarga de detectar ARN de transferencia. Adicionalmente, *SignalP* e *Infernal* son utilizados para la identificación de péptidos señal y ARN no codificantes, respectivamente. Una de las fortalezas de Prokka es su estrategia de "anotación jerárquica", en la cual los genes predichos son comparados progresivamente con bases de datos confiables,

comenzando por conjuntos de proteínas curadas proporcionadas por el usuario (opcional), y continuando con búsquedas contra proteínas bacterianas bien caracterizadas de UniProt, genomas completos del género correspondiente en RefSeq, y perfiles de familias proteicas en bases como Pfam y TIGRFAMs. En caso de no encontrar coincidencias significativas, la herramienta asigna el gen como "proteína hipotética". Esta combinación de algoritmos permite obtener anotaciones rápidas, reproducibles y con un nivel de calidad comparable al de otras plataformas más complejas o lentas (Seemann, 2014).

3.4.10 PANAROO

Panaroo es una herramienta bioinformática para la inferencia de pangenomas de organismos procariotas, que emplea un modelo basado en grafos para identificar y corregir errores de anotación comunes como fragmentaciones, contaminación y pérdida de genes (Tonkin-Hill et al., 2020).

En este modelo, los nodos representan clústeres de genes ortólogos, y las aristas reflejan su adyacencia genómica. Panaroo permite definir la limpieza del pangenoma en modos sensible, normal o estricto según el contexto biológico.

Como salidas principales, Panaroo genera:

- Matrices de presencia/ausencia de genes.
- Grafos del pangenoma en formato GML.
- Alineamientos de genes core y accessory.
- Clasificación de genes en categorías *core*, *soft-core*, *shell* y *cloud*.

Estudios recientes han validado su utilidad en epidemiología bacteriana y análisis de evolución clonal, permitiendo el rastreo de linajes resistentes y la detección de genes asociados a fenotipos clínicos (Li et al., 2023; Mentasti et al., 2023).

3.4.11 HERRAMIENTAS DE INFERENCIAS FILOGENÉTICA

3.4.12 IQ-TREE: INFERENCIA FILOGENÉTICA POR MÁXIMA VEROSIMILITUD

Se ha consolidado como una de las herramientas de referencia para la inferencia filogenética, particularmente en estudios genómicos de alta resolución. A diferencia de otros métodos tradicionales de máxima verosimilitud, IQ-TREE optimiza la búsqueda de árboles filogenéticos mediante algoritmos heurísticos avanzados, logrando una combinación eficiente de precisión y velocidad computacional, incluso en análisis de gran escala. Su funcionamiento permite el empleo de modelos de sustitución molecular complejos, los cuales son fundamentales para representar la evolución de secuencias a lo largo del tiempo. Un modelo de sustitución describe matemáticamente la forma en que las secuencias de ADN, ARN o proteínas se modifican generación tras generación, integrando procesos como mutaciones puntuales, cambios de transiciones (purina $\Leftrightarrow$ purina / pirimidina $\Leftrightarrow$ pirimidina) y transversiones (purina $\Leftrightarrow$ pirimidina), además de sesgos como el contenido GC (Arenas, 2015; Mello & Schrago, 2024).

Desde modelos básicos como Jukes-Cantor (de 1969) hasta el GTR de Tavaré (de 1986), la herramienta automatiza además la selección del modelo óptimo basándose en criterios como AICc y BIC (Minh et al., 2020). El flujo de trabajo inicia con la generación de un árbol guía, seguido de la exploración de topologías alternativas mediante movimientos NNI (*Nearest Neighbor Interchange*) y SPR (*Subtree Pruning and Regrafting*), maximizando la verosimilitud total a lo largo de la búsqueda.

3.4.13 HERRAMIENTAS PARA VALIDACIÓN DE RELOJ MOLECULAR

3.4.14 TEMPEST

Es una de las herramientas empleadas para la filogenética molecular con calibración temporal de organismos, anteriormente conocida como *Path-O-Gen* es un software diseñado para investigar la “señal temporal” en filogenias moleculares. TempEst evalúa si en un conjunto de secuencias genéticas muestreadas a diferentes tiempos existe una correlación entre la divergencia genética acumulada y el tiempo de cada uno de los muestreos, esto se logra realizando un análisis de regresión desde la raíz hasta la punta (root-to-tip), obteniéndose un gráfico de la distancia genética de cada aislamiento respecto al ancestro común vs su fecha de muestreo, esto con el fin de detectar si las variaciones genéticas aumentan de manera aproximadamente lineal con el tiempo y determinar si los datos poseen suficiente señal temporal como para justificar un análisis filogenético Bayesiano con calibración de tiempo, en otras palabras, si es factible la aplicación de un modelo de reloj molecular (Rambaut et al., 2016).

Los análisis filogenéticos suelen aplicarse con más frecuencia en virus, ya que tienden a evolucionar mucho más rápido que las bacterias. Esto se ha visto en casos como SARS-CoV-2, Influenza o Zika, donde las mutaciones se acumulan en poco tiempo. Esta rapidez se debe a que los virus de ARN, al no tener mecanismos de corrección durante la replicación, pueden alcanzar tasas de mutación cercanas a 1 en cada 10 mil nucleótidos copiados (Mattenberger et al., 2021). En cambio, bacterias como *Myxococcus xanthus* presentan tasas muchísimo más bajas, del orden de una mutación cada dos mil millones de nucleótidos (Wielgoss et al., 2024). Esa gran diferencia hace que, en virus, sea más sencillo detectar cambios evolutivos recientes, mientras que con bacterias se necesita más tiempo o condiciones especiales para observar algo similar. A pesar de esto, el uso de TempEst en bacterias patógenas permite la obtención de información importante, ya que incluso con tasas de mutación más bajas, es posible detectar patrones evolutivos si

se cuenta con un buen número de muestras y un rango temporal adecuado. Esto resulta útil para rastrear brotes, comparar cepas de distintos años o regiones, y entender cómo ciertos genes, como los de resistencia antimicrobiana, han ido apareciendo o propagándose con el tiempo.

TempEst, además, permite identificar secuencias atípicas conocidas como “outliers”, cuyos niveles de divergencia genética no concuerdan con sus fechas, estando fuera de la regresión esperada, lo que puede indicar problemas en los datos de fechas, contaminaciones de las muestras, recombinaciones excesivas, divergencia atípica, etc. De esta forma esta herramienta también da un paso de control de calidad y paso preliminar antes de llevar a cabo herramientas más complejas como lo son BEAUTi y BEAST.

Según información obtenida de diferentes autores, así como de datos obtenidos del tutorial de TempEst, se pudo construir el siguiente cuadro en relación con los valores del coeficiente de correlación:

Tabla 4.- Parámetros de R² y Slope de TempEst. **Fuentes:** Adaptado de (Duchêne et al., 2016; Duchene et al., 2020; Menardo et al., 2019; Rambaut et al., 2016; Tay et al., 2024).

Parámetro	Valor o rango	Interpretación
R ² (coeficiente de correlación) de TempEst	>0.30	Fuerte señal temporal adecuada para calibración temporal
	0.10 – 0.30	Correlación moderada, existe una tendencia, pero no muy marcada
	<0.10	Correlación baja o ausente, posible ausencia de señal temporal
	R ² negativo	Señal inversa, potencial error o falta de correlación
Pendiente (Slope)	Positiva >0	Evolución acumulativa en función del tiempo
	Negativa <0	Error sistemático, raíz mal ubicada
Distribución de puntos	Lineal y sin grandes outliers	Buena base para modelado de reloj molecular
	Dispersa con puntos lejanos	Revisar calidad de secuencias, excluir outliers

3.4.15 FLUJO DE ANÁLISIS BAYESIANO EN FILOGENIAS

3.4.16 BEAUTi

Bayesian Evolutionary Analysis Utility o BEAUTi es la interfaz gráfica para configurar modelos de evolución en BEAST de forma intuitiva (Drummond et al., 2012).

Es una herramienta encargada de construir el modelo evolutivo y preparar el archivo de entrada que se utilizará en BEAST. Para ello, se parte de alineamientos de secuencias que deben tener una señal temporal adecuada, verificada previamente mediante TempEst. Una vez cargadas las secuencias, se incorporan las fechas de muestreo, lo que permite calibrar el análisis en el tiempo. Posteriormente, se selecciona el modelo de reloj molecular, se definen los priors del árbol y se configuran los parámetros de la cadena MCMC. Estos pasos permiten adaptar el análisis a las características particulares de cada estudio. Los parámetros configurados en BEAUTi pueden variar considerablemente según el objetivo del estudio, el tipo de datos y el modelo evolutivo elegido, ya que esta herramienta permite ajustar aspectos diferentes aspectos clave. Estos elementos no solo definen cómo se interpreta el cambio genético a lo largo del tiempo, sino que también influyen en la manera en que se reconstruyen los eventos evolutivos. Por ello, la configuración adecuada depende directamente de las características del conjunto de secuencias analizadas y de la hipótesis que se pretende evaluar, lo cual convierte a BEAUTi en una herramienta flexible que se adapta a distintos contextos biológicos y preguntas de investigación (Duchene et al., 2020).

3.4.17 BEAST

BEAST es un programa multiplataforma de código abierto orientado a la inferencia filogenética bayesiana mediante cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), de ahí su nombre, acrónimo del inglés *Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*. A diferencia de otros enfoques filogenéticos tradicionales que generan un único árbol como resultado, BEAST está diseñado para muestrear múltiples árboles junto con parámetros evolutivos, modelos y datos moleculares. Esta estrategia permite no

solo estimar la topología filogenética, sino también inferir los tiempos de divergencia en una escala temporal absoluta, siempre que se incorpore una calibración adecuada. De este enfoque surge el análisis de reloj molecular, ya que el software permite trabajar con datos "heterócronos", es decir, secuencias que han sido muestreadas en diferentes momentos, lo cual permite calibrar el reloj utilizando dichas fechas. Además, BEAST ofrece soporte para una amplia variedad de modelos de reloj molecular, desde el modelo estricto con tasa constante hasta modelos relajados, como el log-normal o el exponencial, donde las tasas pueden variar entre linajes. Como ya se habló en TempEst y BEAUTi, estas herramientas ganan importancia en la ayuda por comprender estudios de evolución molecular de patógenos, como virus y bacterias, diferentes estudios como el de Menardo et al. (2019), señala la importancia de BEAST para dar un enfoque más detallado y flexible sobre la evolución de bacterias (como *M. tuberculosis*), permitió también la estimación de tasas evolutivas en distintos linajes, sublinajes y brotes de manera molecular.

Por otro lado, BEAST ha evolucionado como una herramienta que permite ir más allá de la inferencia filogenética clásica. No solo facilita la reconstrucción del árbol evolutivo y la estimación de tiempos de divergencia, sino que también permite incorporar datos adicionales como características fenotípicas, localización geográfica o información epidemiológica. Esta capacidad de integrar distintos tipos de datos ofrece la posibilidad de construir modelos más completos y ajustados a la realidad biológica del patógeno. A través de su estructura flexible, es posible analizar cómo varía el tamaño poblacional efectivo a lo largo del tiempo, identificar rutas de dispersión y evaluar qué factores podrían estar influyendo en la transmisión. Incluso en escenarios complejos, como brotes epidémicos o linajes bacterianos con evolución lenta, BEAST permite realizar estimaciones detalladas y adaptadas al contexto de estudio, consolidándose como una herramienta versátil tanto para virus de rápida evolución como para bacterias con tasas de mutación más bajas (Suchard et al., 2018). Como archivo de entrada para BEAST se utiliza el archivo XML previamente creado con BEAUTi, y como archivos de salida nos entrega cuatro que son:

- Archivo LOG, es aquel que contiene el registro de los valores muestreados para todos los parámetros del modelo a lo largo de la cadena MCMC, esto incluye las tasas de mutación, parámetros del reloj molecular, tiempos de divergencia, valores de probabilidad, etc. Este archivo es fundamental para evaluar la convergencia y la estabilidad de los parámetros en otras herramientas como Tracer.
- Archivo TREES, guarda todos los árboles filogenéticos que fueron muestreados por BEAST durante la ejecución del MCMC, cada uno incluye información sobre la topología, sus longitudes de rama en unidad temporal, etc. Este archivo es utilizado por herramientas como TreeAnnotator para generar un árbol resumen.
- Archivo OPS, contiene un resumen detallado del desempeño de los operadores de MCMC usados durante el análisis, este informe permite identificar que tan eficiente fue cada uno de los operadores (los mismos que son ajustados en BEAUTi).

3.4.18 TRACER

Es un software gráfico utilizado para analizar los archivos generados por inferencias bayesianas mediante MCMC, como las producidas por BEAST. Su propósito es facilitar la visualización y evaluación de los parámetros estimados, proporcionando información clave sobre la convergencia y estabilidad del análisis. Es compatible con varios programas filogenéticos, incluyendo MrBayes y RevBayes, y está diseñado para integrarse de forma sencilla en el flujo de trabajo posterior a la ejecución de BEAST. Su archivo de entrada principal es el archivo LOG, el cual contiene las estimaciones de los parámetros muestreados durante la cadena. Una vez cargado en Tracer, el programa ofrece herramientas para visualizar distribuciones, relaciones entre parámetros y distintos resúmenes estadísticos. Entre ellos, destaca el ESS (*Effective Sample Size*), una métrica fundamental que indica cuántas muestras independientes se obtuvo tras corregir la autocorrelación. Este valor permite juzgar si el análisis ha tenido un muestreo suficiente para proporcionar estimaciones confiables. Adicionalmente, Tracer permite establecer el “burn-in”, es decir, el porcentaje de muestras iniciales que serán excluidas del análisis final. Esto se hace para evitar que valores inestables o no representativos

influyan en las conclusiones. La correcta elección del burn-in y la revisión detallada de los ESS son pasos cruciales antes de interpretar los resultados del análisis filogenético (Chiner-Oms et al., 2022; Rambaut et al., 2018).

3.4.19 TREEANNOTATOR

Es un programa incluido en el paquete BEAST, diseñado para resumir información de los árboles generados por la inferencia MCMC generando un único árbol representativo, el cual es denominado árbol objetivo. BEAST genera de miles a millones de árboles muestreados y alojados en el archivo de salida TREES, TreeAnnotator toma este conjunto de árboles y extrae un árbol resumen en el que agrega sobre este árbol la información cuantitativa obtenida de inferencia bayesiana completa, permitiendo así la visualización de soporte de nodos y estimaciones de tiempo de manera concreta. La información que se toma en cuenta para esto son los parámetros de los nodos, la altura de estos (el tiempo de divergencia), así como el intervalo de densidad posterior más alto (HPD) al 95%. TreeAnnotator como software, permite la elección de opciones para la construcción del árbol objetivo a partir de un muestreo de árboles, la opción por defecto y más utilizada es la del “árbol de credibilidad máxima de clados” o MCC. El árbol MCC es aquel cuyos clados aparecen con una mayor frecuencia en la muestra posterior, en otras palabras, aquel que tienen mayor soporte. Al ejecutar esta herramienta se recorren todos los árboles del archivo TREES descartando los iniciales si se indica un *burn-in* (sugerentemente el mismo número empleado en Tracer), y calcula las estadísticas necesarias. Posteriormente genera un árbol de salida en formato TREE el mismo que será usado por herramientas como FigTree (BEAST Developers, 2020).

3.4.20 FIGTREE

Es una herramienta de escritorio, desarrollada y destinada para la visualización interactiva, así como la edición sencilla de árboles filogenéticos anotados. Entre sus puntos positivos está la ligereza del software, la capacidad multiplataforma y la

posibilidad de producir figuras de alta calidad aptas para publicaciones. FigTree puede utilizar archivos de árboles en formatos comunes como Newick, Nexus o archivos TREE generados por BEAST, y permite al usuario inspeccionar la topología, reorganizar ramas y graficar las anotaciones presentes en el árbol. La interfaz permite seleccionar distintos estilos de visualización, como cladogramas rectangulares, diagramas radicales o árboles circulares. A diferencia de otras plataformas de visualización como iTOL, FigTree tiene la ventaja de reconocer la información temporal incluida en los archivos de BEAST y representar automáticamente una escala de tiempo en la base del árbol, adaptándose a los rangos utilizados (desde unos pocos años hasta miles de años). Dentro del flujo de trabajo con reloj molecular, FigTree se ubica como el paso final, una vez que se ha generado el árbol MCC a través de TreeAnnotator. Su función principal es permitir la visualización clara y detallada del árbol anotado, incluyendo los valores de probabilidad posterior, los intervalos de credibilidad en las fechas (HPD) y otras anotaciones relevantes. Además, FigTree permite comparar este árbol inferido con otros, como por ejemplo un árbol obtenido por máxima verosimilitud, facilitando así la validación visual del análisis al contrastar la estructura y los nodos clave entre ambos. Esta comparación puede revelar diferencias en la resolución de los clados, en la colocación de ramas o en las fechas estimadas, lo que aporta una capa adicional de interpretación y solidez al estudio filogenético (Developers, 2018; Qin et al., 2023).

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

Esta investigación fue llevada a cabo mediante el análisis computacional de diferentes genomas de especies de . La comparación abarcó el estudio y búsqueda de genes individuales, así como a nivel genómico utilizando diferentes herramientas bioinformáticas, en plataformas como Galaxy Europe, BEASTdoc, ResFinder y MegaRes esto permitió tener un acercamiento de cómo está el pool genético de esta bacteria en el contexto ecuatoriano.

4.1 SELECCIÓN DE DATOS GENÓMICOS

Para este estudio, la selección de los genomas bacterianos se efectuó seleccionando principalmente aquellas que procedían de muestras de *ecuatorianas*, independientemente del lugar donde fueron secuenciadas o de la tecnología de secuenciación empleada. Se escogió según su procedencia geográfica y su fecha de recolección reportado por los depositantes. Estos criterios permiten una comparación robusta entre las muestras, lo que facilita el análisis de patrones en un factor de tiempo. Se encontró que todos los genomas procedían de WGS Shotgun, por lo que la gran mayoría no estaban en un cien por cien ensamblados. Por su parte, los genes de resistencia a antimicrobianos se seleccionaron por bibliografía (como se muestran en las Tablas 1, 2 y 3), teniendo en cuenta su prevalencia, efecto inhibitorio etc.

4.2 OBTENCIÓN DE DATOS GENÓMICOS DESDE NCBI

Los genomas fueron descargados de la base de datos pública NCBI, desde el apartado de Bio-proyectos misma de la que se obtuvo información importante de la muestra como el nombre, el taxón, la cepa, el depositante del repositorio, el lugar y la fecha de recolección de las muestras. En una primera etapa, las muestras fueron clasificadas conforme al bio proyecto del cual fueron derivadas, con el

objetivo de optimizar su trazabilidad y manejo. Posteriormente se reorganizaron en función de su procedencia geográfica y la fecha de recolección, con el fin de establecer una estructura que favorezca análisis comparativos más rigurosos en etapas subsiguientes del estudio. Mediante el uso del subsistema de Windows para Linux, se renombró a todos los archivos para quitar información innecesaria procedentes de sus respectivos proyectos. Adicionalmente mediante scripts, se convirtió los archivos FNA en FASTA.

4.3 APLICACIÓN DE HERRAMIENTAS

BIOINFORMÁTICAS, SCRIPTS Y SOFTWARE

Entre los lenguajes de programación empleados para el desarrollo de scripts y el manejo de datos se utilizaron Python y Bash. Además, se contó con el apoyo de herramientas de inteligencia artificial generativa, específicamente ChatGPT (OpenAI), como recurso auxiliar para la elaboración y depuración de algunos scripts utilizados en el estudio.

4.3.1 ALINEACIÓN CON MAUVE

Para un primer acercamiento filogenético, los genomas previamente renombrados fueron alineados en MAUVE, específicamente su módulo de progressiveMauve, de manera local empleando WSL y scripts automatizados en Python. Previamente, el ejecutable fue descargado desde el repositorio oficial de Mauve y ubicado en el sistema para su ejecución. Se desarrolló un script en Python diseñado para detectar automáticamente todos los archivos FASTA o FNA presentes en el directorio de trabajo, simplificando así la preparación de los insumos necesarios para el análisis comparativo genómico. Una vez identificadas las secuencias, el script generó los comandos necesarios para ejecutar el módulo progressiveMauve, realizando el alineamiento múltiple de genomas y generando como resultado un archivo en formato XMFA. Este archivo contiene las regiones conservadas y los posibles reordenamientos genómicos presentes entre las cepas analizadas. La automatización de este procedimiento permitió agilizar el flujo de trabajo, minimizar errores derivados de la intervención manual y asegurar la reproducibilidad del proceso de alineamiento comparativo. Este análisis fue

aplicado a cada uno de los estratos definidos previamente, considerando tanto el origen geográfico como la fecha de muestreo de cada aislado. Tras los análisis realizados, se visualizó los resultados en Mauve (v2.4.0).

4.3.2 GALAXY Y ANOTACIÓN CON PROKKA

Los genomas fueron subidos a la plataforma Galaxy Europe, en esta, se construyó un conjunto de datos que se emplearía como entrada en la herramienta Prokka para anotación de genomas procariotas (Galaxy Version 1.14.6+galaxy1). Se mantuvieron los parámetros opcionales de forma predeterminada salvo por opción de *Forzar la conformidad con los requisitos de GenBank/ENA/DDBJ* se puso “Si” y en el género se especificó . Estas configuraciones permitieron afinar la precisión de la anotación al restringirla taxonómicamente, optimizando la identificación de genes y funciones específicas del género bacteriano en cuestión.

4.3.3 CONSTRUCCIÓN DEL PANGENOMA CON PANAROO Y ALINEACIÓN CON MAFFT

Los genomas anotados (formato GFF3) fueron analizados mediante Panaroo v1.2.10, instalado en un entorno Conda (v25.3.1) dentro de WSL. Se ejecutó Panaroo en modo estricto, utilizando un script que organizó los archivos en un único directorio de entrada. Entre los productos generados se obtuvo el archivo correspondiente al alineamiento filtrado del genoma central (archivo ALN) y diferentes matrices CSV.

La construcción del árbol filogenético se realizó en la plataforma Galaxy utilizando IQ-TREE (Galaxy Version 2.4.0+galaxy0), configurando un modelo evolutivo personalizado HKY+F+I. El modelo HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) fue elegido ya que permite modelar frecuencias desiguales de bases nitrogenadas (A, C, G, T) y distinguir entre las tasas de transición y transversión, lo cual se ajusta mejor a los patrones reales de evolución en genomas bacterianos (Minh et al., 2020), aplicando 100 réplicas de *bootstrap* no paramétrico para evaluar la robustez de las ramas. El árbol generado en formato NHX fue visualizado en la plataforma iTOL (Interactive Tree of Life).

Adicionalmente, los archivos "gene_presence_absence.csv" y "gene_data.csv" generados por Panaroo, fueron empleados para el análisis de genes de resistencia a antibióticos. Se implementó un flujo de trabajo local combinando BLASTn v2.13.0 y scripts en Python. Las secuencias de resistencia fueron obtenidas de la base de datos MEGARes v3.0 (Bonin et al., 2023), considerando cinco familias de antibióticos: aminoglucósidos, β -lactámicos, MLS (macrólidos, lincosamidas y estreptograminas), sulfonamidas y tetraciclinas. Adicionalmente se investigó también para genes de fluoroquinolonas, fenicoles, rifampicinas, trimetoprimas y de multiresistencia. Los resultados fueron filtrados por umbrales de identidad (95%), cobertura (80% de la longitud del query) y e-value ($\leq 1e-10$), adicionalmente se permitió un número máximo de mismatches y gaps de ≤ 2 ; posteriormente se procesaron para mapear los determinantes genéticos de resistencia por genoma, integrando esta información al análisis filogenético y epidemiológico de las cepas estudiadas.

4.3.4 ANÁLISIS DE RELOJ MOLECULAR CON TEMPEST, BEAUTi Y BEAST

Para el análisis de reloj molecular, se utilizaron los programas TempEst (v1.5.3), BEAUTi (v10.5.0), BEAST (v10.5.0), Tracer (v1.7.2) y TreeAnnotator (v10.5.0.), descargados desde la página oficial del proyecto BEAST (<https://beast.community>), que proporciona acceso a los diferentes directorios en GitHub con versiones actualizadas y documentación para la instalación y uso de las herramientas mencionadas. Para la evaluación de la señal temporal, se utilizó TempEst empleando como entrada el archivo filogenético en formato NHX. Este análisis permitió examinar la correlación entre la divergencia genética y las fechas de muestreo, a fin de valorar la idoneidad del modelo de reloj molecular. Con base en los resultados y siguiendo el protocolo propuesto en el tutorial oficial, se procedió a la exclusión de siete muestras que se comportaban como "outliers" y que introducían ruido temporal en la calibración. El ruido temporal se refiere a la discrepancia entre la divergencia genética observada y la fecha de muestreo; es decir, se detectaron muestras con una acumulación de mutaciones que no

correspondía al tiempo transcurrido, lo que afecta negativamente a la calibración del reloj molecular. Esto se pudo dar por errores en el muestreo, tasas de evolución atípicas, eventos de recombinación o en este caso también es posible que se explique por el hecho de que estas secuencias correspondían a especies distintas, mientras que la mayoría del conjunto pertenecía a una sola especie (Rambaut et al., 2016).

A continuación, se reconstruyó el árbol filogenético con IQ-TREE, manteniendo los parámetros previos, excluyendo las muestras mencionadas. El nuevo árbol fue analizado nuevamente en TempEst, en donde se constató que el coeficiente de correlación llegó a valores adecuados según bibliografía (véase tabla 4) lo cual respaldó su uso en el análisis temporal. Posteriormente se convirtió el archivo ALN, generado a partir de Panaroo utilizando MAFFT, a tipo FASTA para su importación a BEAUTi con el que se generó el archivo XML correspondiente. Se habilitó la opción de uso de fechas (*Use tip dates*) importando los datos previamente confeccionados en un archivo tipo DAT, verificando que los nombres coincidan y que se use el formato de fecha correcto esto se puede observar en el Anexo 6 y 7. Se seleccionó el modelo correcto HKY con características para emular el mismo utilizado con anterioridad en IQ-Tree, Anexo 8. Durante la configuración del análisis en BEAUTi se ajustaron las pestañas Priors, Operators y MCMC según el modelo evolutivo definido. En la pestaña *Priors*, se asignaron distribuciones apropiadas para cada parámetro, utilizando funciones comunes como log-normal, uniforme y exponencial, apreciable en el Anexo 9.

Estas se aplicaron tanto a los parámetros del modelo de sustitución como a los del reloj molecular relajado y al modelo demográfico, combinando un modelo coalescente de población constante con un modelo de sustitución HKY. En la pestaña *Operators*, se mantuvo la combinación de operadores por defecto, la cual permite una adecuada exploración del espacio posterior, incluyendo operadores para parámetros de tasa, topología del árbol y tamaño poblacional, como se muestra en el Anexo 10. En *MCMC*, se estableció una longitud de cadena inicial de 10 millones de iteraciones para una primera evaluación rápida (representado en el Anexo 11) que luego se amplió a 100 millones tras comprobar, mediante Tracer, que los valores de ESS eran adecuados. El archivo XML fue ejecutado en BEAST, y

los resultados se verificaron en Tracer, lo que permitió asegurar una buena mezcla de la cadena y estabilidad de las estimaciones. Posteriormente, se utilizó TreeAnnotator para generar el árbol de credibilidad máxima (MCC), descartando un porcentaje de burn-in y configurando las alturas de los nodos según la mediana posterior. Finalmente, el árbol anotado fue visualizado en FigTree (v1.4.4.), donde se ajustó la escala temporal y el estilo de visualización para facilitar la interpretación de las fechas de divergencia y los valores de soporte en cada nodo.

4.4 FLUJO DE TRABAJO (WORKFLOW)

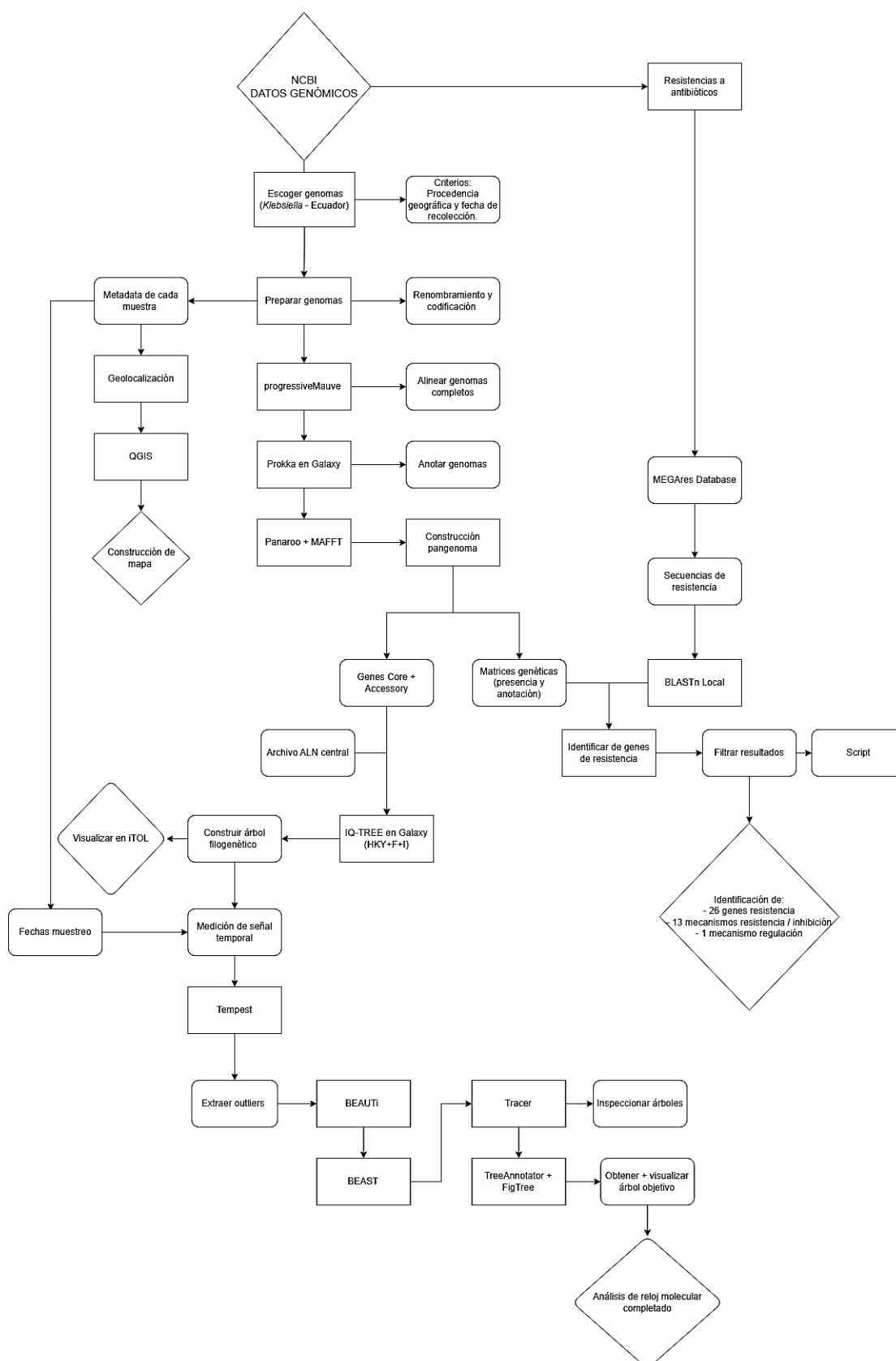


Figura 1.- Flujo de trabajo seguido en el presente trabajo de investigación. **Fuente:** El autor (2025).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 OBTENCIÓN DE DATOS GENÓMICOS

Se recopilaron un total de 45 genomas de *Klebsiella spp.* procedentes de distintas zonas del país mediante búsquedas en la base de datos del NCBI, entre las que se encuentran las provincias del Azuay (1), Esmeraldas (3), Guayas (18) y Pichincha (23). Se encontró a las siguientes especies, *K. pneumoniae* (38) , *K. quasipneumoniae* (2), *K. aerogenes* (3) y *K. michiganensis* (2).

5.2 MAPEO GEOGRÁFICO

Con ayuda del programa QGIS, se pudo elaborar un mapa con las ubicaciones geográficas de las muestras (Figura 2). Los detalles sobre cada lugar, año de muestreo y color asignado se resumen en la Tabla 5 y 6.

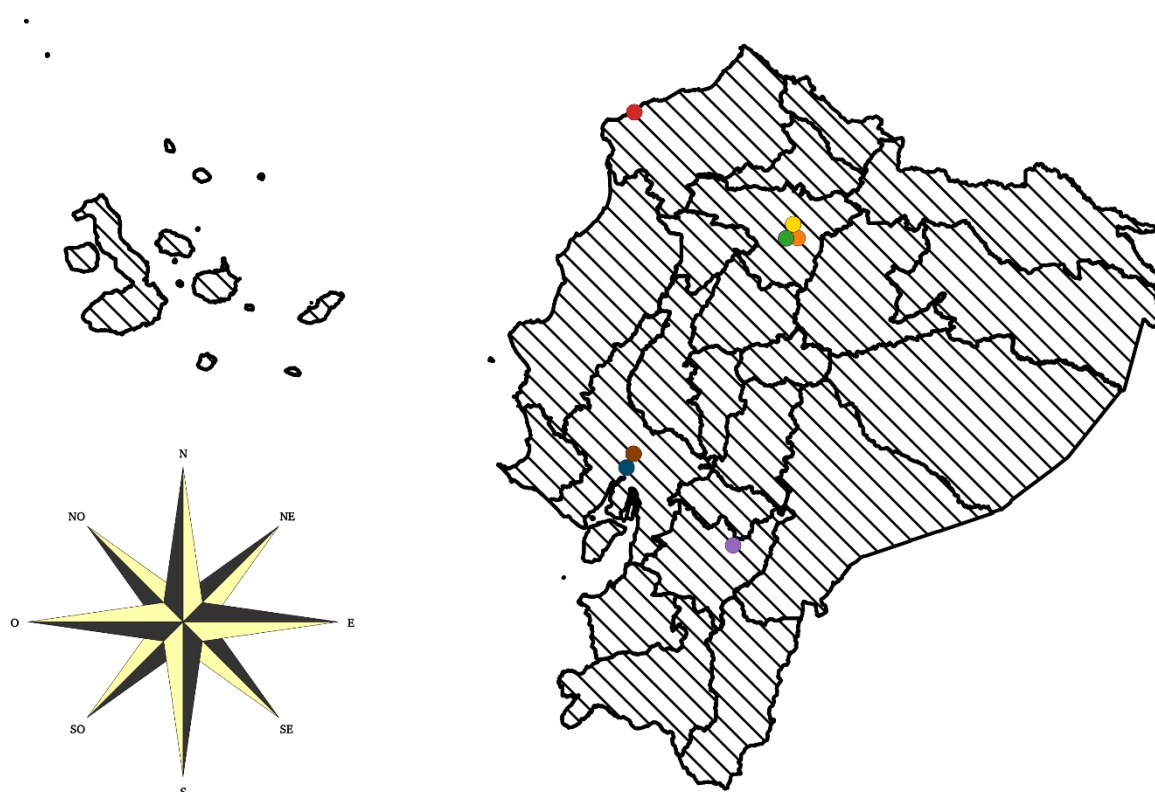


Figura 2.- Mapa geográfico del Ecuador, delimitado por provincias con los principales puntos de muestreo de los genomas. **Fuente:** Adaptado por el autor (2025).

Tabla 5.- Localización geográfica de los aislamientos de *Klebsiella* spp. en Ecuador y sus respectivos años de muestreo, parte 1. Fuente: El autor (2025).

Código de acceso	Especie	Localidad	Provincia	Año	Lugar de muestreo	Color
GCF_036937565.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937525.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937785.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937545.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937585.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937535.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937745.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937735.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937725.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937635.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937675.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2020	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_029956185.1	<i>K. pneumoniae</i>	Cuenca	Azuay	2021	Hospital del Río	
GCF_029960525.1	<i>K. quasipneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2021	Clínica Alcívar	
GCF_036937625.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2021	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_036937655.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2021	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_029955805.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2021	Hospital General Docente de Calderón	
GCF_029955685.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2021	Hospital General Docente de Calderón	
GCF_029956145.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2021	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029960265.1	<i>K. michiganensis</i>	Quito	Pichincha	2021	Hospital General Docente de Calderón	
GCF_029956065.1	<i>K. aerogenes</i>	Quito	Pichincha	2021	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029960425.1	<i>K. michiganensis</i>	Quito	Pichincha	2021	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029956095.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2021	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	

Tabla 6.- Localización geográfica de los aislamientos de *Klebsiella spp.* en Ecuador y sus respectivos años de muestreo, parte 2. **Fuente:** El autor (2025).

Código de acceso	Especie	Localidad	Provincia	Año	Lugar de muestreo	Color
GCF_030016955.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2022	Clínica Alcívar	
GCF_029956195.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2022	Clínica Alcívar	
GCF_029956205.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2022	Clínica Alcívar	
GCA_036937665.1	<i>K. pneumoniae</i>	Guayaquil	Guayas	2022	Hospital Dr. Roberto Gilbert	
GCF_029956045.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955985.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955965.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_037402565.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029956125.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955935.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029956165.1	<i>K. aerogenes</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029960345.1	<i>K. quasipneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955875.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955895.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955815.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de las Fuerzas Armadas	
GCF_029955825.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955695.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital General Docente de Calderón	
GCF_029955665.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital General Docente de Calderón	
GCF_030016835.1	<i>K. pneumoniae</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_029955765.1	<i>K. aerogenes</i>	Quito	Pichincha	2022	Hospital de Especialidades Eugenio Espejo	
GCF_041698955	<i>K. pneumoniae</i>	Atacames	Esmeraldas	2023	Camaroneras	
GCF_041699175	<i>K. pneumoniae</i>	Atacames	Esmeraldas	2023	Camaroneras	
GCF_041699275	<i>K. pneumoniae</i>	Atacames	Esmeraldas	2023	Camaroneras	

5.3 ALINEAMIENTO EN MAUVE

El alineamiento múltiple de genomas completos mediante progressiveMauve reveló una estructura conservada entre la mayoría de los aislados, identificándose bloques colineales (LCBs) que se mantienen sin mayores alteraciones. No obstante, también se detectaron inversiones y reordenamientos en regiones específicas, lo que aportó una visualización compleja del conjunto total, esto se puede apreciar en el Anexo 12.

La alta complejidad visual del alineamiento se explica principalmente por la diversidad intra e interespecífica, ya que además de *K. pneumoniae* el análisis incluyó otras especies del mismo género como *K. quasipneumoniae*, *K. aerogenes* y *K. michiganensis*. Esto produjo patrones más fragmentados o desplazados en los genomas que no comparten una cercanía filogenética directa.

Las regiones accesorias se interpretaron como aquellos segmentos que estaban presentes únicamente en un subconjunto de genomas visibles como LCBs que no alineaban con el resto, esto se puede ejemplificar en la Figura 4. Estas regiones, al no estar presentes en todos los genomas y localizarse fuera de las zonas conservadas, se vinculan a posibles islas génicas adquiridas horizontalmente. Mientras que se consideró como región conservada aquella que se encuentra presente en todos los genomas alineados, sin inversión ni desplazamiento, y que mantiene una posición relativa coherente. Aunque Mauve no etiqueta explícitamente los genes, la correspondencia con zonas variables observadas también en el análisis pan-genómico respalda su clasificación como componentes accesorios. Por claridad visual, solo se incluyó en el cuerpo del trabajo una imagen representativa del alineamiento. Asimismo, se identificaron regiones altamente conservadas entre todos los genomas, las cuales podrían representar componentes del genoma central, como genes esenciales de mantenimiento celular o funciones metabólicas conservadas. En la Figura 3, se aprecia el alineamiento del año 2020. El resto de los alineamientos completos se encuentra en los Anexos, donde puede apreciarse el detalle correspondiente a cada año de aislamiento (2020–2022).

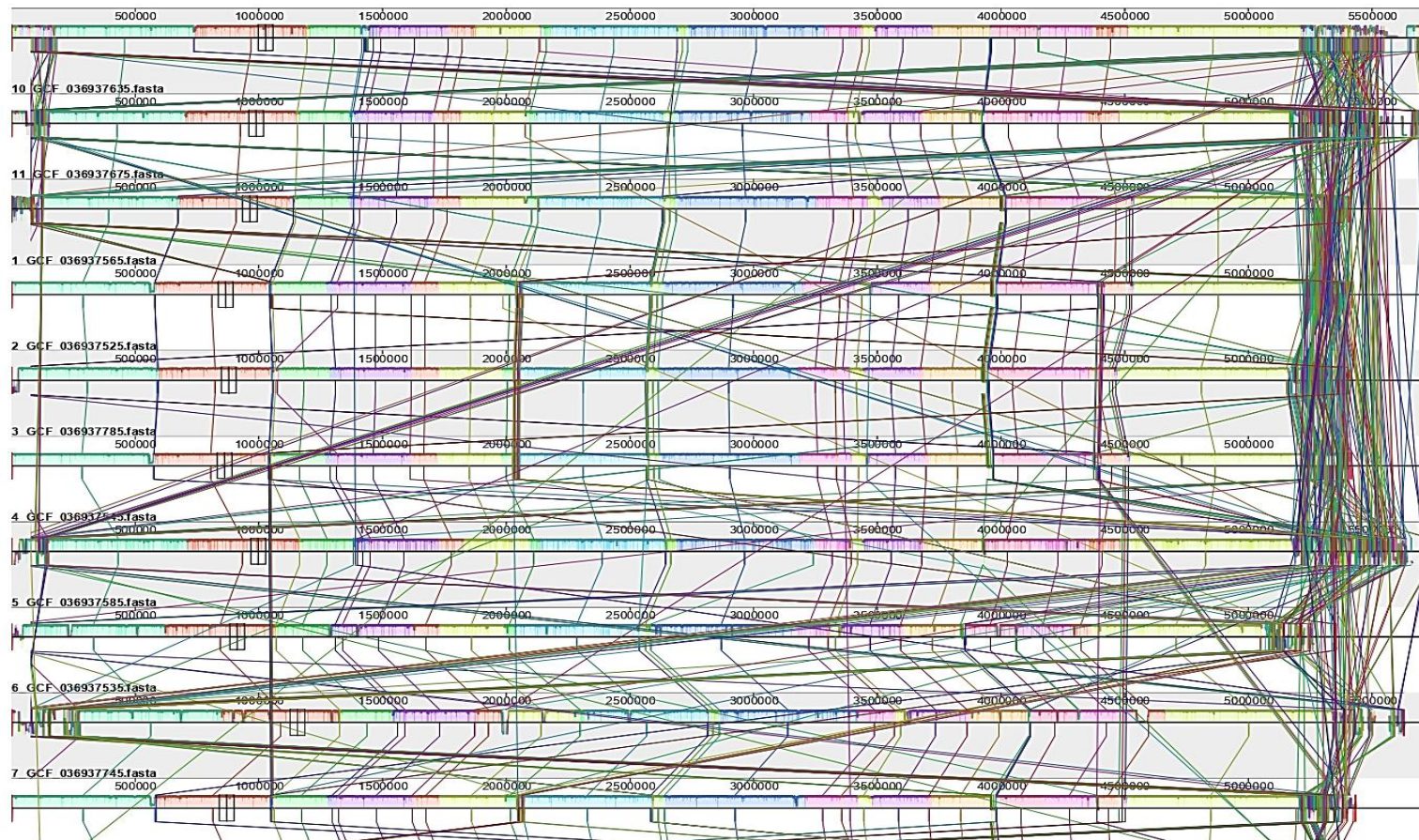


Figura 3.- Alineamiento múltiple de genomas correspondientes al año 2020 realizado con progressiveMauve. Los LCBs compartidos entre genomas se representan mediante franjas de color, mientras que los trazos cruzados indican inversiones y reordenamientos genómicos. . La alta conservación estructural observada sugiere una baja variabilidad entre las cepas de este grupo. **Fuente:** El autor (2025).

A continuación, más hallazgos:

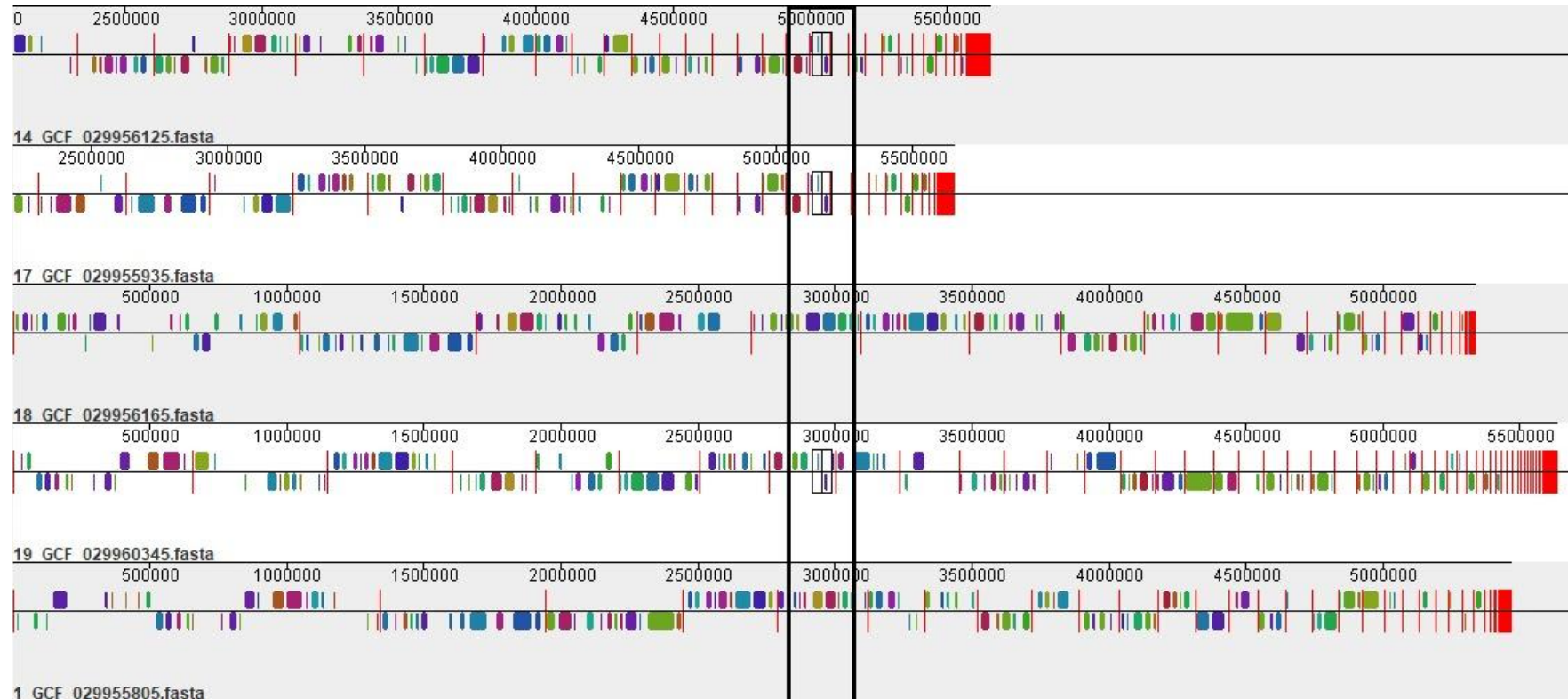


Figura 4.- Fragmento del alineamiento múltiple de genomas visualizado en Mauve. El recuadro negro señala una región aislada, presente en tres cepas (14 GCF 029956125, 17 GCF 029955935 y 19 GCF 022960345), lo que indica una posible región accesoria. Sin trazados de reordenamiento para evitar saturación visual. **Fuente:** El autor (2025).

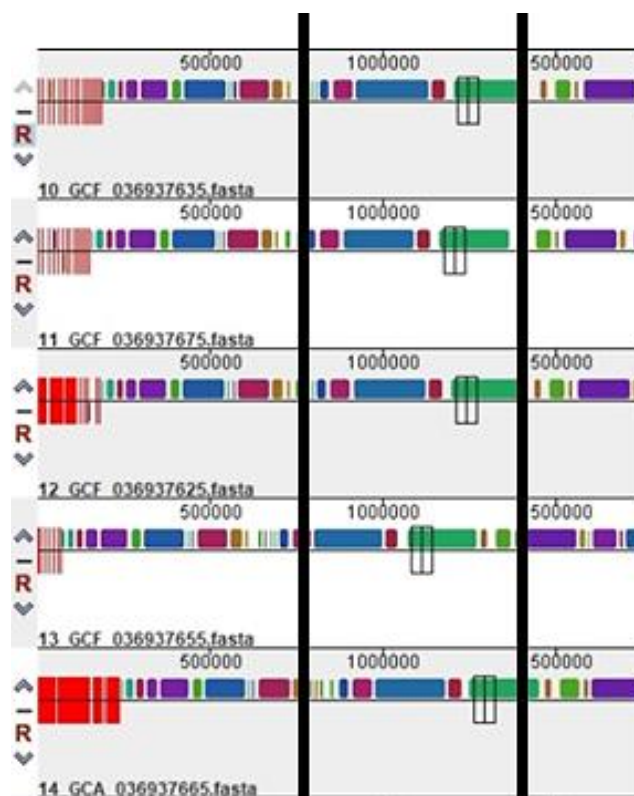


Figura 5.- Observación desde la herramienta Mauve de un fragmento del alineamiento múltiple provenientes de la región sur del Ecuador. Sin trazado de reordenamientos para una mejor visualización. **Fuente:** El autor (2025).

Nota: El recuadro negro destaca una región conservada, presente en todas las cepas analizadas. A pesar de pequeñas variaciones en la longitud o posición, esta región se mantiene en todas las secuencias, lo que sugiere su pertenencia al genoma central (core). Esta conservación sugiere una función esencial o estable a lo largo de las cepas evaluadas.

El alineamiento múltiple de los genomas de la región norte reveló una alta densidad de reordenamientos estructurales. Aunque inicialmente, al visualizar los LCBs sin trazos de conexión, se apreciaba cierta continuidad entre cepas, al habilitar las conexiones se evidenció un patrón complejo con múltiples entrecruzamientos y cambios en la orientación de los segmentos (Anexo 4). Este comportamiento sugiere una mayor presencia de inversiones, traslocaciones y fragmentación estructural entre los genomas de esta región. Tal complejidad puede reflejar una mayor diversidad genómica o presión evolutiva, así como posibles diferencias en la

calidad del ensamblaje. De acuerdo con A. E. Darling et al. (2010), la herramienta *progressiveMauve* permite detectar este tipo de reorganizaciones incluso entre cepas cercanas, siendo sensible a variaciones en el orden y la orientación de los LCBs.

Por otro lado, los genomas de la región sur mostraron un alineamiento visualmente más limpio. En varias secciones, los LCBs se mantuvieron paralelos y alineados entre las cepas, con menor número de entrecruzados, lo que indica una colinealidad estructural más conservada (Figura 5). Si bien *progressiveMauve* no permite inferir directamente la función de las regiones halladas, los análisis posteriores como la anotación con Prokka y la obtención del pangenoma con Panaroo, pueden sugerir que estas regiones están relacionadas con genes esenciales del *genoma central*, lo que puede incluir funciones fundamentales como la síntesis de proteínas, mantenimiento celular y rutas metabólicas básicas. A pesar de que se observan fragmentaciones puntuales y diferencias en la longitud de algunos segmentos, el patrón general refleja una menor complejidad en cuanto a reorganización estructural. Esta conservación puede estar asociada a un linaje más homogéneo o a ensamblajes más completos en ciertas cepas.

5.4 INFERENCIA FILOGENÉTICA UTILIZANDO EL MÉTODO DE MÁXIMA VEROSIMILITUD (ML)

Durante la construcción del pangenoma de con la herramienta Panaroo, se realizó una alineación múltiple de secuencias utilizando MAFFT. El árbol filogenético de , generado con IQ-TREE e iTOL a partir del genoma central, muestra una estructura bien soportada, con valores Bootstrap en su mayoría superiores al 70%, e incluso varios nodos con soporte $\geq 95\%$, lo que indica alta confianza en las relaciones filogenéticas inferidas (Nguyen et al., 2015). Estos valores reflejan la estabilidad de los clados principales y la baja variabilidad intraespecífica dentro de algunos grupos.

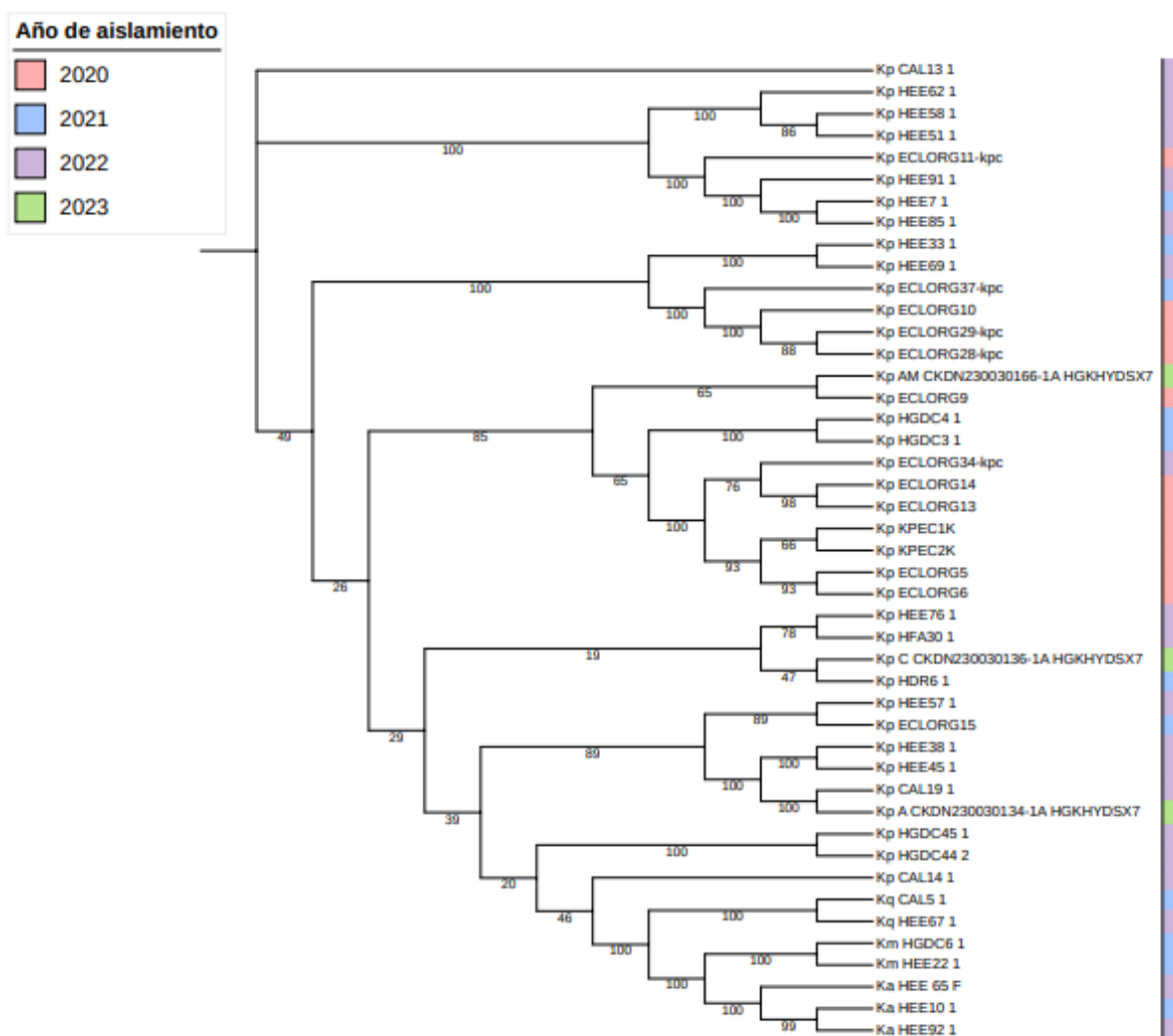


Figura 6.- Árbol filogenético de cepas del género *Klebsiella* aisladas en Ecuador entre 2020 y 2023, construido mediante análisis de máxima verosimilitud utilizando IQ-TREE a partir del genoma central definido por Panaroo. Se aplicó el modelo evolutivo HKY+F+I, los valores numéricos indican el soporte estadístico de cada nodo. **Fuente:** El autor (2025).

Se identifican agrupaciones claras por especie, especialmente en ramas con soporte alto y distancias cortas, lo que sugiere baja divergencia dentro de esos linajes. En contraste, no se observa una agrupación consistente por año de aislamiento: los colores (2020–2023) aparecen distribuidos de forma intercalada en múltiples clados. Esto indica que las cepas de distintos años pertenecen a linajes que han estado circulando simultáneamente, sin eventos recientes de diversificación asociados al tiempo. En conjunto, los datos sugieren que la evolución filogenética dentro del grupo está más influenciada por diferencias taxonómicas que por la fecha de aislamiento, lo cual es consistente con una circulación prolongada y estable de múltiples linajes en la región.

5.5 GENES DE IMPORTANCIA

Tras el cruce de los archivos de salida de Panaroo en conjunto con el BLASTn realizado con las secuencias de genes de resistencia obtenidos a partir de MEGARES se consiguieron los siguientes resultados:

5.5.1 AMINOGLUCÓSIDOS

Diferentes genes asociados a la resistencia frente a los aminoglucósidos fueron encontrados. Predominando los genes con capacidad de modificar a esta clase de antibióticos, como por ejemplo *aac6'* (también catalogada como PRIME), siendo este un gen común de y fue encontrado en 22 cepas cayendo en la categoría de genes accesorios con un 48.8% seguido de *aph3'* y de *aac3* hallado en 18 cepas 40%, en algunos casos al mismo tiempo. Adicionalmente existe la presencia de genes de alta preocupación como *armA* (3 cepas) y *rmtG* (1 cepa), a pesar de ser baja, los cuales confieren resistencia a todos los aminoglucósidos.

Estudios como Raro et al. (2020), reportaron, en aislados clínicos de *K. pneumoniae*, frecuencias de detección de genes como *aac(6')-Ib* en aproximadamente el 55% de los genomas analizados, valores comparables a los hallados en el presente estudio. Más relevante aún fue la observación de la coocurrencia de múltiples genes modificadores de aminoglucósidos en los mismos aislados, lo que incrementa la

complejidad del perfil de resistencia. Por otra parte, otras investigaciones recientes han documentado la diseminación de genes de metiltransferasas 16S como *armA* y *rmtG* en aislados de *K. pneumoniae*, situación particularmente preocupante debido a la resistencia de alto nivel que confieren frente a todos los aminoglucósidos clínicamente disponibles, comprometiendo seriamente las opciones terapéuticas (Papa-Ezdra et al., 2024).

5.5.2 BETALACTÁMICOS

Tras el cruce de data obtenida en el pangenoma y BLAST, se detectaron genes de resistencia a β -lactámicos en las diferentes cepas de . Se encontró marcada presencia de genes *CTX* y *TEM*. Ambos fueron identificados en 25 genomas, en muchos de los casos más de un gen de resistencia por cepa, esta evidencia es reforzada por estudios similares como el de Oliveira et al. (2022), en donde explica que *K. pneumoniae* tiene una gran capacidad de expandirse de forma clonal y para intercambiar elementos móviles como plásmidos. En este estudio también se menciona que la permutación genética favorece a la rápida diseminación de la resistencia sobre todo en ambientes con elevada presión antibiótica como justamente los ambientes hospitalarios.

Es relevante destacar la detección del gen *KPC* en 21 cepas, dado su papel crítico en la codificación de una carbapenemasa capaz de conferir resistencia a los carbapenémicos, considerados tratamientos de última línea. Soria-Segarra et al. (2024), realizaron estudios en bacterias Gramnegativas de Ecuador, encontrando que de todo el grupo bacteriano que fue estudiado, *K. pneumoniae* fue la especie con mayor frecuencia del gen *KPC*, identificando co-resistencia en estas cepas a otros antibióticos, como los aminoglicósidos.

La identificación de múltiples variantes del gen *OXA* en los aislados analizados sugiere una diversidad genética significativa dentro de esta familia de betalactamasas. Los resultados evidencian no solo la presencia de diferentes tipos de *OXA*, sino también su distribución entre cepas *accessory* y *singleton*, lo que apunta a eventos recientes de adquisición horizontal. Esta diversidad puede

interpretarse como el resultado de una acumulación evolutiva de múltiples versiones del gen a lo largo del tiempo, facilitada por mecanismos de transferencia genética como plásmidos y transposones, elementos que han sido ampliamente reconocidos en la propagación de genes de resistencia en *Klebsiella spp.* La presencia de distintas variantes OXA implica, además, un espectro ampliado de actividad enzimática, que abarca desde la resistencia a β -lactámicos de primera generación hasta carbapenémicos, lo que representa un desafío clínico importante, ya que limita severamente las opciones terapéuticas disponibles (Peirano & Pitout, 2025).

5.5.3 QUINOLONAS

La detección de genes de resistencia a quinolonas en los aislados analizados indicó una predominancia de genes *qnr*, especialmente la variante *qnrB*, la cual se encontró en 15 y 7 cepas (según sus alelos), mientras que *qnrS* y *qnrE* fueron encontradas en solo en dos y una cepas, respectivamente. Los resultados coinciden con lo reportado en Panamá por Núñez-Samudio et al. (2022), en cuanto a la alta prevalencia del gen *qnrB*, detectado en todos los aislados resistentes de *K. pneumoniae*, seguido de la detección ocasional de *qnrA*. Sin embargo, a diferencia de dicho estudio, en la presente comparativa se identificaron también genes como *qnrS* y *qnrE*, lo que sugiere una mayor diversidad de mecanismos de resistencia mediada por plásmidos. Otros estudios fuera del continente remarcan como principal gen de resistencia a las quinolonas a *qnrS*, por ejemplo Khosravi et al. (2025) en Irán, reportan hasta una prevalencia del 85.1% de este gen en los aislados de *K. pneumoniae*, pero además una coexistencia con otros genes como *aac(6')* y *qnrB* lo que confiere multiresistencia, declaran también que estos genes son fácilmente movilizados por plásmidos, pero los mismos no fueron caracterizados.

5.5.4 MLS (MACRÓLIDOS, LINCOSAMIDAS Y ESTREPTOMICINAS)

Para los macrólidos, lincosamidas y estreptomicinas, se identificaron genes como *mphA* (12 cepas), *mphE* y *msrE* (3 cepas cada uno). Se puede validar estos resultados

con la revisión de Nor Amdan et al. (2024), en donde señala que *mphA* es frecuentemente encontrada en bacterias gramnegativas siendo el gen más documentado en aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a macrólidos, por otro lado, *mphE* es más descrito en otras enterobacterias como *Pseudomonas*, lo que refuerza la transmisión horizontal de genes de resistencia entre bacterias. Estos dos genes tienen la capacidad de codificar fosfotransferasas que inactivan antibióticos como la eritromicina.

La transferencia horizontal de genes también se evidencia con el gen *msrE* por ejemplo en el reporte de Hernández et al. (2021), en donde se señala que este gen fue encontrado en el plásmido *pMS3802OXARMA* del tipo IncM2, y estaba en conjunto con otros genes como *mphE*. En el mismo plásmido también se localizó genes como *bla-OXA-48*, *armA*, *sul1*, *qacEΔ1* y un *ant(3'')-Ia* truncado.

5.5.5 GENES DE MULTIRESISTENCIA

La multiresistencia se da a entender por genes que confieren resistencia a más de un solo tipo de antibiótico a la vez (ejemplo a los betalactámicos y sulfonamidas), en el análisis pangenómico se encontraron este tipo de genes. Presencia principal del gen *ibcr*, encontrado en 22 cepas seguido por *ramr* en 4. Ambos con mecanismos distintos de resistencia, el uno es una acetiltransferasa capaz de modificar antibióticos mientras que el otro es un regulador de bombas de expulsión de tipo RND. Como ya se ha discutido, es posible que más de un solo gen esté presente en las cepas, y más cuando se trata de especies provenientes de ámbitos clínicos; en una primera caracterización realizada por García-Fulgueiras et al. (2020), se evidencia justamente la combinación similar de genes como *KPC*, *qnrB* e *ibcr* (identificado en la investigación como *aac(6')-Ib-cr*), lo que confiere resistencias para carbapenémicos, quinolonas, fluoroquinolonas y aminoglicósidos, siendo estos dos últimos por parte del gen *ibcr*. Por el lado del gen *ramR*, estudios como el de Yu et al. (2024), reportan su prevalencia y alta relevancia clínica, al haber sido identificado en el 17% de los aislados de *K. pneumoniae*, en contraste con el 8% encontrado en este estudio. Las distintas mutaciones detectadas en *RAMR* provocaron incrementos significativos en la resistencia a eravaciclina (fluorociclina),

así como a tetraciclinas de primera, segunda y tercera generación (tetraciclina, tigeciclina y minociclina), además de levofloxacin (fluoroquinolona). Asimismo, se observó que dichas mutaciones contribuyeron al aumento en la persistencia bacteriana y en la patogenicidad dentro del huésped.

5.5.6 FENICOLES

Tras el análisis pangenómico de Panaroo, se identificaron en total tres genes relacionados a la resistencia contra fenicoles. *catA* codifica para una acetiltransferasa de cloranfenicol y estuvo presente en siete cepas. Actualmente no se han encontrado estudios recientes asociados a este gen con en Latinoamérica. Estudios realizados en *Salmonella* encontrada en carne cruda, indican la presencia de diferentes genes de resistencia a antibióticos, como TEM, *gyrA* y por último *catA1*, el cual fue hallado en el 63.6% en Pakistán. Esta evidencia es importante ya que posibilita la idea de movimientos genéticos con estas secuencias de resistencia (Fatima et al., 2023). Esto se puede complementar con lo descrito por Shankar et al. (2020), quienes advierten sobre la emergencia de cepas hipervirulentas que, aunque suelen ser sensibles a los antibióticos, se transmiten con gran facilidad. No obstante, la adquisición de genes como *catA* podría representar un riesgo adicional, al dificultar su tratamiento efectivo.

Estudios recientes han reportado que la prevalencia conjunta de los genes *catA* y *cmIA* alcanza aproximadamente el 41.1% de los aislados analizados. Sin embargo, un hallazgo particularmente relevante es que, a pesar de la presencia de estos genes de resistencia, muchas de las cepas resultaron fenotípicamente susceptibles al cloranfenicol. Esta discrepancia se explicó por la presencia de inserciones de elementos móviles, como IS5, en regiones regulatorias que silencian la expresión de los genes de resistencia. Es posible que un fenómeno similar esté ocurriendo en los aislados analizados en este estudio, considerando que los resultados obtenidos mediante ResFinder indicaron que algunas cepas fueron clasificadas como parcialmente susceptibles al cloranfenicol (Graf et al., 2024). El gen *floR* ha sido documentado predominantemente en *E. coli* de origen alimentario, asociado a plásmidos conjugativos como IncFIB e IncFIA en países de América Latina como

México, Colombia y Brasil (Babines-Orozco et al., 2024). En el presente estudio, la detección de este gen en una única cepa podría indicar un evento de transferencia horizontal reciente, reflejando la capacidad de diseminación de elementos de resistencia entre poblaciones bacterianas en distintos nichos ecológicos.

5.5.7 RIFAMPICINAS

En el análisis realizado, se detectó un único gen (Arr) asociado a resistencia a rifampicina en once cepas. Este gen confiere resistencia mediante la modificación enzimática del antibiótico, un mecanismo conocido que afecta la eficacia terapéutica. Aunque la rifampicina no es un antimicrobiano de uso habitual frente a infecciones causadas por enterobacterias, debido a su propensión a inducir resistencia de forma rápida, su relevancia clínica se incrementa cuando estos genes se incorporan en bacterias multirresistentes. La presencia de genes de la familia Arr en *Klebsiella spp.* ha sido reportada previamente, como en el estudio de Wang et al. (2023), donde se observó una prevalencia de hasta el 10.4% (10/96) en aislados positivos para integrones de clase 1. En contraste, en el presente estudio se detectó una prevalencia superior, alcanzando el 24.4% (11/45), lo que podría sugerir una mayor presión selectiva o una diseminación reciente de estos determinantes de resistencia en las cepas analizadas.

5.5.8 SULFONAMIDAS

Para resistencia a sulfonamidas fueron hallados dos genes, *sulI* (denominado comúnmente como *sul1*), y *sulIII* (*sul3*). Ambos codifican para dihidropteroato sintetas resistentes a sulfonamidas, modificando la diana del fármaco. Se podría decir que es extremadamente común encontrar a *sul1* pues forma parte del segmento conservado 3' de los integrones de clase 1. Debido a esta organización estructural, siempre que una bacteria de este género porte un integrón de clase 1, inevitablemente también llevará el gen *sul1* asociado. Estudios como Wang et al. (2023), han corroborado esta asociación, al encontrar integrones del tipo *intI1–aadA2–qacEΔ1–sul1* directamente integrados en el cromosoma de cepas de *K. pneumoniae* pertenecientes a clones clínicamente relevantes como ST11 y ST340.

Esto subraya la importancia de *sul1* no solo como marcador de integrones, sino también como un determinante de resistencia persistente en las poblaciones bacterianas hospitalarias.

Por parte del gen *sul3*, en Brasil, una investigación enfocada en aislados productores de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) encontró la presencia de *sul2* en el 83.3% (10/12) de los casos, y de *sul3* en el 41.6% (5/12) de los aislados analizados (Carvalho et al., 2021). Al contrastarlo con los resultados obtenidos en el presente estudio, se observa una prevalencia considerablemente menor de *sul3*, detectándose únicamente en el 6.66% (3/45) de los aislados. Esta diferencia podría reflejar variaciones geográficas en la distribución de determinantes de resistencia a sulfonamidas o diferencias en los tipos de integrones y elementos genéticos móviles presentes en las cepas estudiadas.

5.5.9 TETRACICLINAS

En el análisis de los aislados se identificaron genes relacionados a tetraciclinas, específicamente *tetR*, que es un represor transcripcional mientras que *tetA* y *tetD* codifican para las bombas de expulsión tipo MFS. Solo se ha encontrado un estudio reciente proveniente de Latinoamérica, específicamente de Brasil, donde se reportó plásmidos con los genes de resistencia *tetR* y *tetD* en un plásmido identificado como *p114PB_I*, aislado de un clon ST273 de *K. pneumoniae*. Hasta la fecha, no se han encontrado otros estudios en la región que reporten la asociación de *tetR* con *tetA*. Por tanto, en el presente trabajo se documenta la co-detección de los genes *tetR* y *tetA* en aislados de *Klebsiella*, lo cual representa un hallazgo novedoso y relevante para el conocimiento de los mecanismos de resistencia en poblaciones locales, sugiriendo la conservación de un módulo funcional de regulación y expulsión de tetraciclinas (Silva et al., 2022).

5.5.10 TRIMETOPRIMA

Adicionalmente en el análisis también se encontró genes *dfrA*, los cuales codifican para una dihidrofolato reductasa resistente a la trimetoprima, permitiéndole

sobrevivir a la bacteria y seguir dividiéndose, pues este antibiótico inhibe la actividad de DFHR normal. Se asocian a integrones de clase 1, igual que las ya mencionadas sulfonamidas, detectándose comúnmente juntas, esto se puede confirmar con el estudio realizado en Brasil, en zonas aledañas a la amazonia, donde se encontró un gen de la familia *dfrA* (precisamente *dfrA14*) asociado con el gen *sul2* (Fonseca et al., 2023).

Tabla 7.- Lista de genes (y variantes) asociados a resistencia a los aminoglicósidos identificados en los genomas analizados. **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
22	<i>aac6-PRIME</i>	AAC6-PRIME (MEG_331)	N-acetiltransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
18	<i>aph3-DPRIME</i>	APH3-DPRIME (MEG_1057)	O-fosfotransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
18	<i>aac3</i>	AAC3 (MEG_64)	N-acetiltransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
17	<i>aph6</i>	APH6 (MEG_1086)	O-fosfotransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
11	<i>aph3-PRIME</i>	APH3-PRIME (MEG_1079)	O-fosfotransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
4	<i>ant3-DPRIME</i>	ANT3-DPRIME (MEG_915)	O-nucleotidiltransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
3	<i>aac3</i>	AAC3 (MEG_51)	N-acetiltransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
3	<i>aph4</i>	APH4 (MEG_1082)	O-fosfotransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
3	<i>ant3-DPRIME</i>	ANT3-DPRIME (MEG_975)	O-nucleotidiltransferasas de aminoglucósidos	ACCESSORY
3	<i>armA</i>	ARMA (MEG_1120)	Metiltransferasas del ARN ribosomal 16S	ACCESSORY
1	<i>rmtG</i>	RMTG (MEG_6073)	Metiltransferasas del ARN ribosomal 16S	SINGLETON

Tabla 8.- Genes asociados a mecanismos de resistencia frente a Betalactámicos identificados en los genomas analizados. **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
25	<i>bla-CTX</i>	CTX (MEG_2414)	Clase A de betalactamasas	ACCESSORY
25	<i>bla-CTX</i>	CTX (MEG_2263)	Clase A de betalactamasas	ACCESSORY
25	<i>bla-TEM</i>	TEM (MEG_6863)	Clase A de betalactamasas	ACCESSORY
21	<i>bla-KPC</i>	KPC (MEG_3508)	Clase A de betalactamasas	ACCESSORY
13	<i>bla-OXA</i>	OXA (MEG_4980)	Clase D de betalactamasas	ACCESSORY
5	<i>bla-OXA</i>	OXA (MEG_5159)	Clase D de betalactamasas	ACCESSORY
3	<i>bla-CMY</i>	CMY (MEG_1834)	Clase C de betalactamasas	ACCESSORY
3	<i>bla-OXA</i>	OXA (MEG_5255)	Clase D de betalactamasas	ACCESSORY
2	<i>bla-OXY</i>	OXY (MEG_5311)	Clase A de betalactamasas	ACCESSORY
2	<i>bla-GES</i>	GES (MEG_3129)	Clase A de betalactamasas	ACCESSORY
2	<i>bla-SHV</i>	SHV (MEG_6485)	Clase A de betalactamasas	ACCESSORY
1	<i>bla-OXA</i>	OXA (MEG_4977)	Clase D de betalactamasas	SINGLETON
1	<i>bla-OXA</i>	OXA (MEG_4770)	Clase D de betalactamasas	SINGLETON

Tabla 9.- Genes asociados a la resistencia de quinolonas identificados mediante BLAST. **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
15	<i>qnrB</i>	QNRB (MEG_5933)	Proteína de resistencia a quinolonas Qnr	ACCESSORY
7	<i>qnrB</i>	QNRB (MEG_5977)	Proteína de resistencia a quinolonas Qnr	ACCESSORY
2	<i>qnrS</i>	QNRS (MEG_6020)	Proteína de resistencia a quinolonas Qnr	ACCESSORY
1	<i>qnrE</i>	QNRE (MEG_6015)	Proteína de resistencia a quinolonas Qnr	SINGLETON

Tabla 10.- Genes y sus variantes relacionados a mecanismos de resistencia de macrólidos, lincosamidas y estreptomicinas (MLS). **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
12	<i>mphA</i>	MPHA (MEG_4029)	Fosfotransferasas de macrólidos	ACCESSORY
3	<i>mphE</i>	MPHE (MEG_4044)	Fosfotransferasas de macrólidos	ACCESSORY
3	<i>msrE</i>	MSRE (MEG_4075)	Bombas de expulsión ABC de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS)	ACCESSORY

Tabla 11.- Genes asociados la multiresistencia de diferentes antibióticos detectados en el pangenoma de . **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
22	<i>ibcr</i>	IBCR (MEG_3286)	Acetiltransferasa de multiresistencia (MDR)	ACCESSORY
4	<i>ramR</i>	RAMR (MEG_6045)	Regulador de bombas de expulsión RND de MR	ACCESSORY

Tabla 12.- Identificación de genes de resistencia a antibióticos del grupo de los fenicoles en el pangenoma de *Klebsiella spp.* **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
7	<i>catA</i>	CATA (MEG_1593)	Acetiltransferasas de cloranfenicol	ACCESSORY
4	<i>cmlA</i>	CMLA (MEG_1771)	Bombas de expulsión MFS de resistencia a fenicoles	ACCESSORY
1	<i>floR</i>	FLOR (MEG_2917)	Bombas de expulsión MFS de resistencia a fenicoles	SINGLETON

Tabla 13.- Detección de genes de resistencia a rifampicina en aislados de *Klebsiella spp.* **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
11	<i>arr</i>	ARR (MEG_1132)	ADP-ribosiltransferasa Arr de resistencia a rifampicina	ACCESSORY

Tabla 14.- Genes asociados a mecanismos de resistencia a sulfonamidas detectadas en los genomas bacterianos analizados. **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
17	<i>sull</i>	SULI (MEG_6616)	Sintetasas de dihidropteroato resistentes a sulfonamidas	ACCESSORY
3	<i>sulll</i>	SULIII (MEG_6639)	Sintetasas de dihidropteroato resistentes a sulfonamidas	ACCESSORY

Tabla 15.- Genes implicados en los mecanismos de resistencia a tetraciclinas obtenidos y detectados en los genomas analizados. **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
16	<i>tetR</i>	TETR (MEG_7185)	Represor transcripcional de tetraciclinas	ACCESSORY
16	<i>tetA</i>	TETA (MEG_7032)	Bombas de expulsión tipo MFS asociadas a resistencia a tetraciclinas	ACCESSORY
1	<i>tetD</i>	TETD (MEG_7068)	Bombas de expulsión tipo MFS asociadas a resistencia a tetraciclinas	ACCESSORY

Tabla 16.- Genes de resistencia a trimetoprima identificados en aislados de *Klebsiella spp.* **Fuente:** El autor (2025).

N° Cepas	Nombre funcional	ID funcional completo	Familia funcional	Tipo genoma
8	<i>dfra</i>	DFRA (MEG_2554)	Dihidrofolato reductasa	ACCESSORY
8	<i>dfra</i>	DFRA (MEG_2551)	Dihidrofolato reductasa	ACCESSORY

5.6 TEMPEST

El análisis de correlación temporal realizado con la herramienta TempEst reveló la existencia de siete muestras que divergían significativamente en comparación con los otros genomas. Estas muestras presentaron un patrón evolutivo distinto, lo que sugiere diferentes alternativas del porqué, entre los cuales están posibles eventos de evolución independiente o una mayor variabilidad temporal. El árbol filogenético generado a partir de estas muestras, tras el análisis temporal, fue el siguiente:

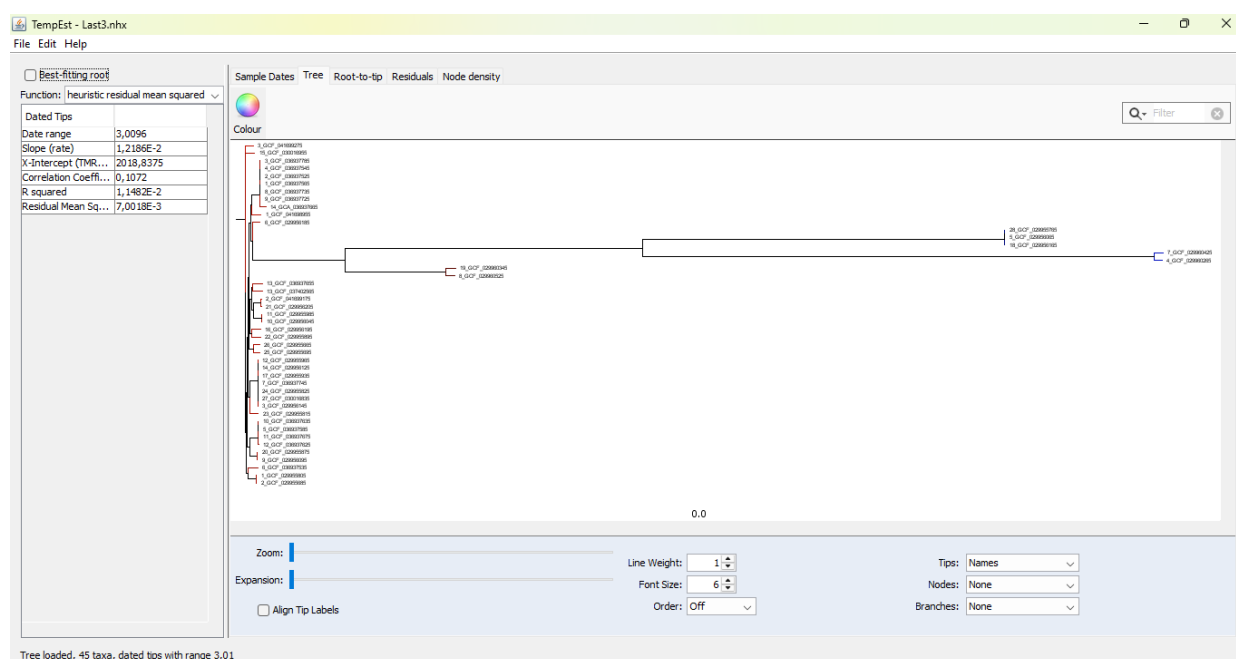


Figura 7.- Captura de pantalla del programa TempEst, se muestra el árbol filogenético construido en IQ-Tree con los cuarenta y cinco genomas. **Fuente:** El autor (2025).

Por bibliografía (véase Tabla 4), se encontró que para que un coeficiente de correlación sea aceptado se sugiere que esté en valores entre 0.4 y 0.6 (Duchêne et al., 2016; Duchene et al., 2020; Menardo et al., 2019; Rambaut et al., 2016; Tay et al., 2024); pues se demuestra una correlación entre el tiempo y la divergencia genética. En este caso, el coeficiente obtenido era 0.107, lo cual indicaba la posible presencia de factores que alteraban este coeficiente. Durante la revisión de las pestañas "Root-to-tip" y "Residuals" en TempEst, se evidenció la presencia de muestras outliers, las cuales afectaban negativamente la señal temporal del análisis. Al examinar más a fondo la información de estas siete muestras se descubrió que cuatro de ellas pertenecían a especies diferentes dentro del mismo género bajo estudio, lo que explicaba su divergencia temporal.

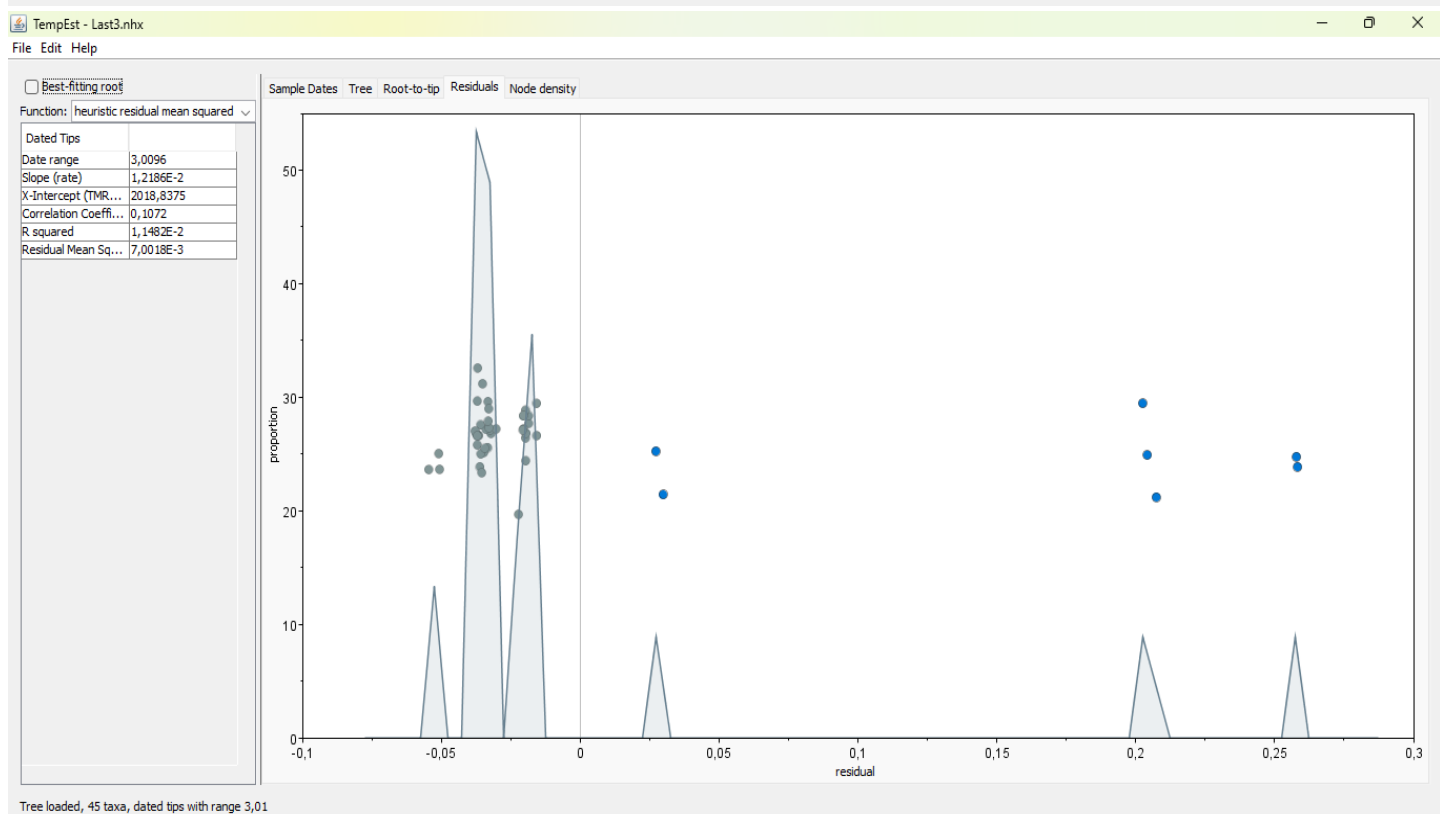
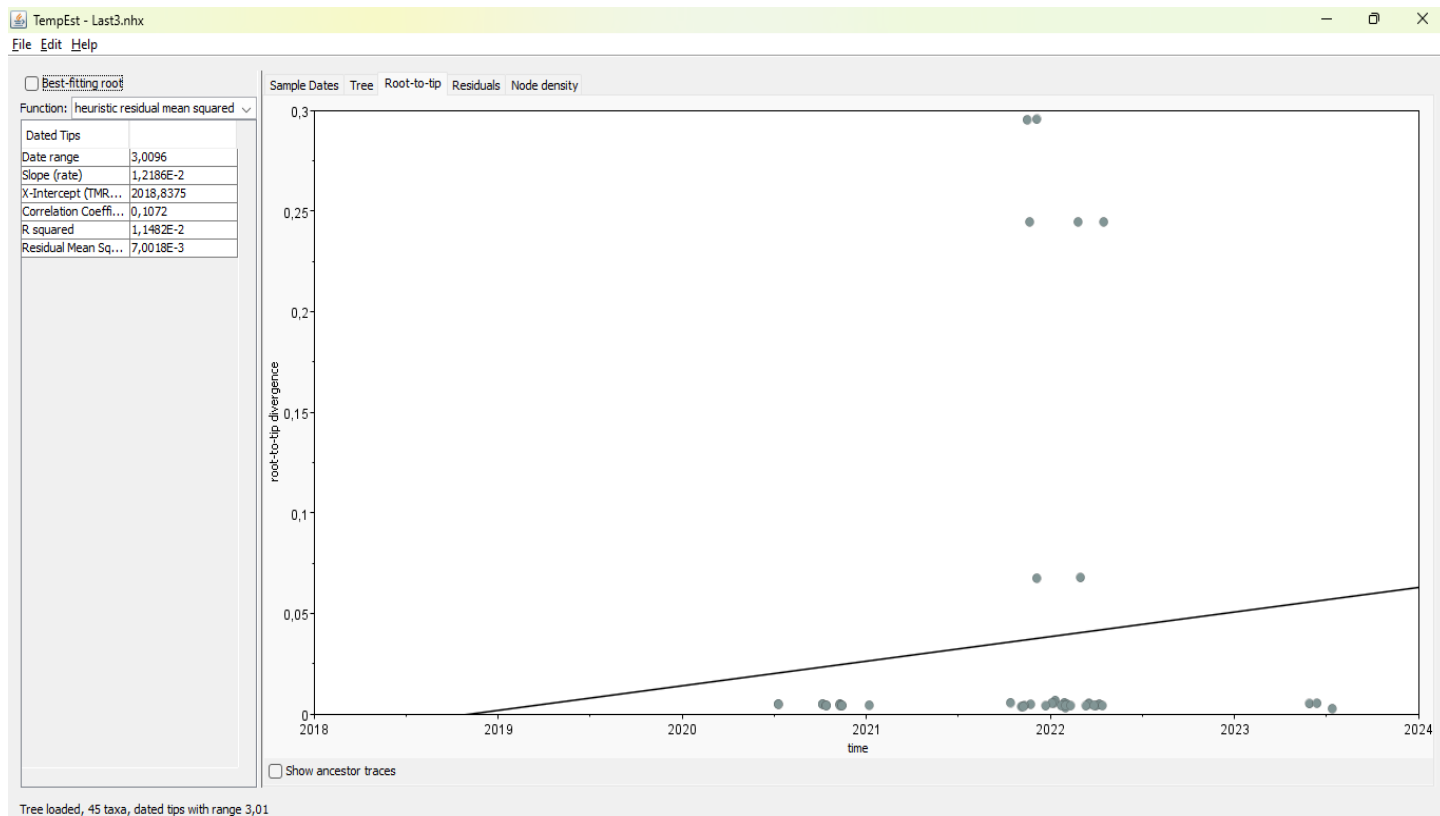


Figura 8.- Pestañas Root-to-tip (arriba) y Residuals (abajo) de la herramienta TempEst, se evidencia siete genomas más alejados del resto de muestras, así como una pendiente débil. **Fuente:** El autor (2025).

De estas muestras dos fueron pertenecientes a *K. michiganensis*, una de *K. aerogenes* y la otra de *K. quasipneumoniae*. A pesar de que las otras tres muestras eran de la especie predominante *K. pneumoniae* también fueron consideradas outliers, por lo que se terminó excluyendo los siete genomas. Las muestras excluidas fueron: 19_GCF_029960345, 8_GCF_029960525, 28_GCF_029955765, 5_GCF_029956065, 18_GCF_029956165, 7_GCF_029960425 y 4_GCF_029960265. Tras esto, se volvió a construir un árbol filogenético de máxima verosimilitud con IQ-Tree, siguiendo el mismo modelo evolutivo y parámetros anteriores, dando como resultado con treinta y ocho muestras el siguiente árbol:

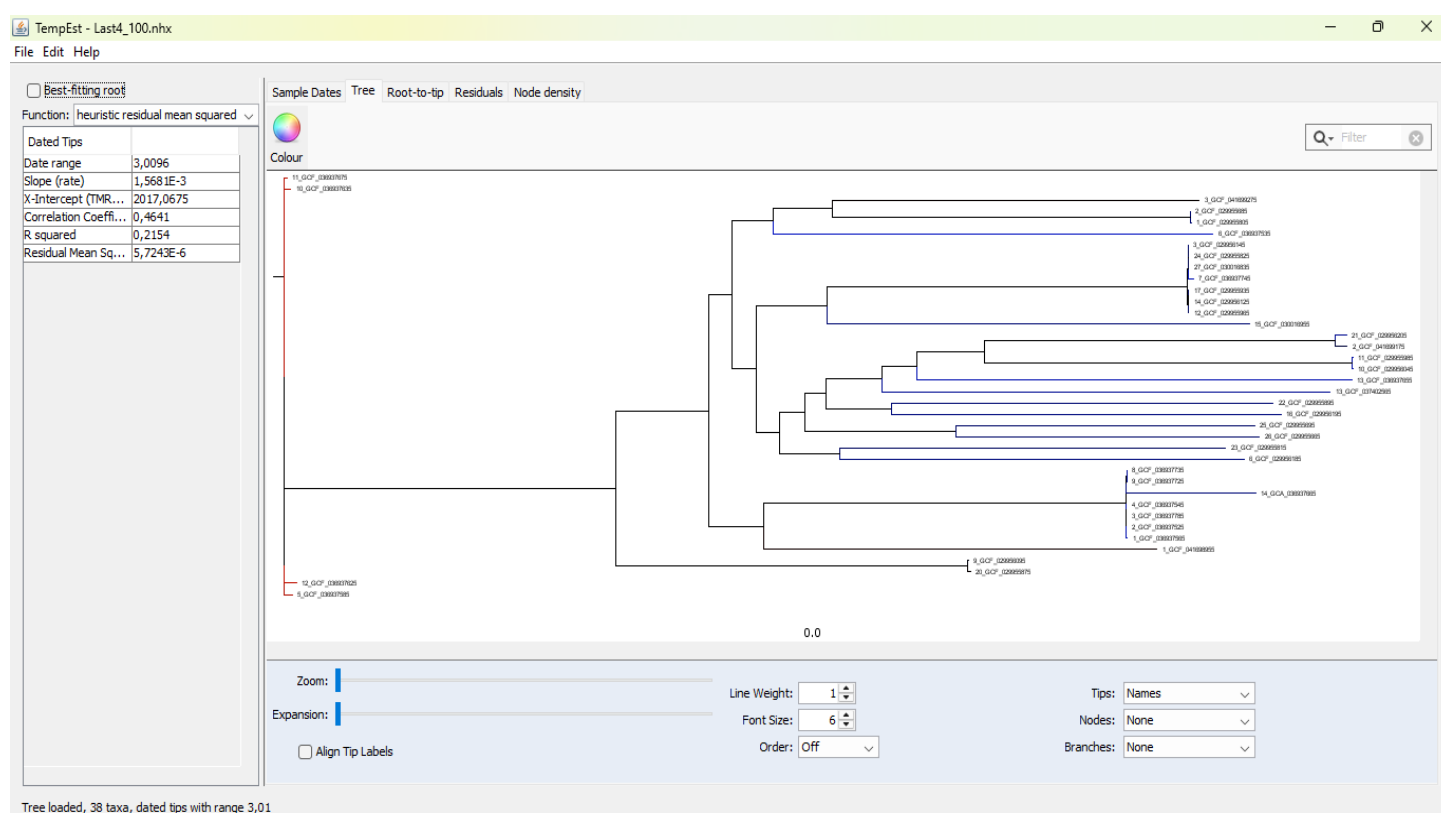


Figura 9.- Árbol filogenético obtenido a partir de IQ-Tree, modelo HFK+F+I, treinta y ocho genomas analizados, visualizados en TempEst. **Fuente:** El autor (2025).

Al realizar un nuevo análisis sin considerar los outliers excluidos, se pudo observar un mejoramiento considerable del coeficiente de correlación pasando de 0.107 a 0.464, entrando en valores aceptables para un estudio de reloj molecular pasando a la herramienta BEAUTi.

5.7 BEAUTi

Tras el ajuste de los parámetros en la herramienta BEAUTi, se generó el archivo XML que se ejecutó posteriormente en BEAST. Se recalca la importancia del archivo DAT que se generó con anterioridad para añadir las fechas de muestreo al XML.

5.8 BEAST

Tras la primera y segunda ejecución de BEAST, se obtuvieron los tres archivos de texto esperados OPS, LOG y el archivo tipo TREES. Fueron estos último empleados por Tracer y TreeAnnotator posteriormente.

5.9 TRACER

El archivo LOG generado por BEAST, fue analizado por la herramienta Tracer permitiendo evaluar la convergencia de las cadenas MCMC y examinar las distribuciones de los parámetros del modelo, entre los resultados más relevantes están: la convergencia muestra un tamaño efectivo de muestra (ESS), adecuado para la mayoría de los parámetros como *joint* y *likelihood*, son 160 y 145, respectivamente, lo que sugiere que las cadenas han alcanzado un equilibrio y son representativas de la distribución posterior. En la Figura 10 y 11 se aprecia completamente la captura de pantalla de Tracer.

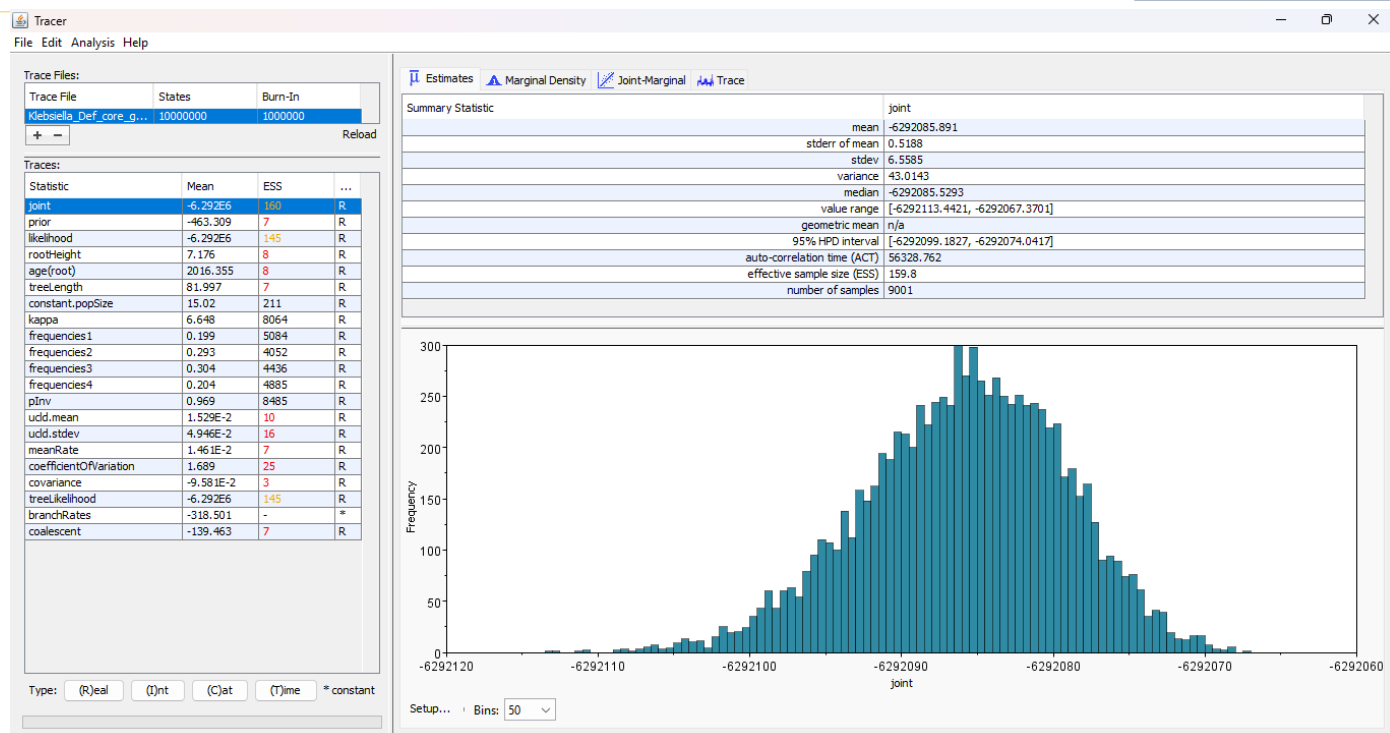


Figura 10.- Resultado del análisis del archivo LOG en la herramienta Tracer, se observa una buena estimación ESS. **Fuente:** El autor (2025).

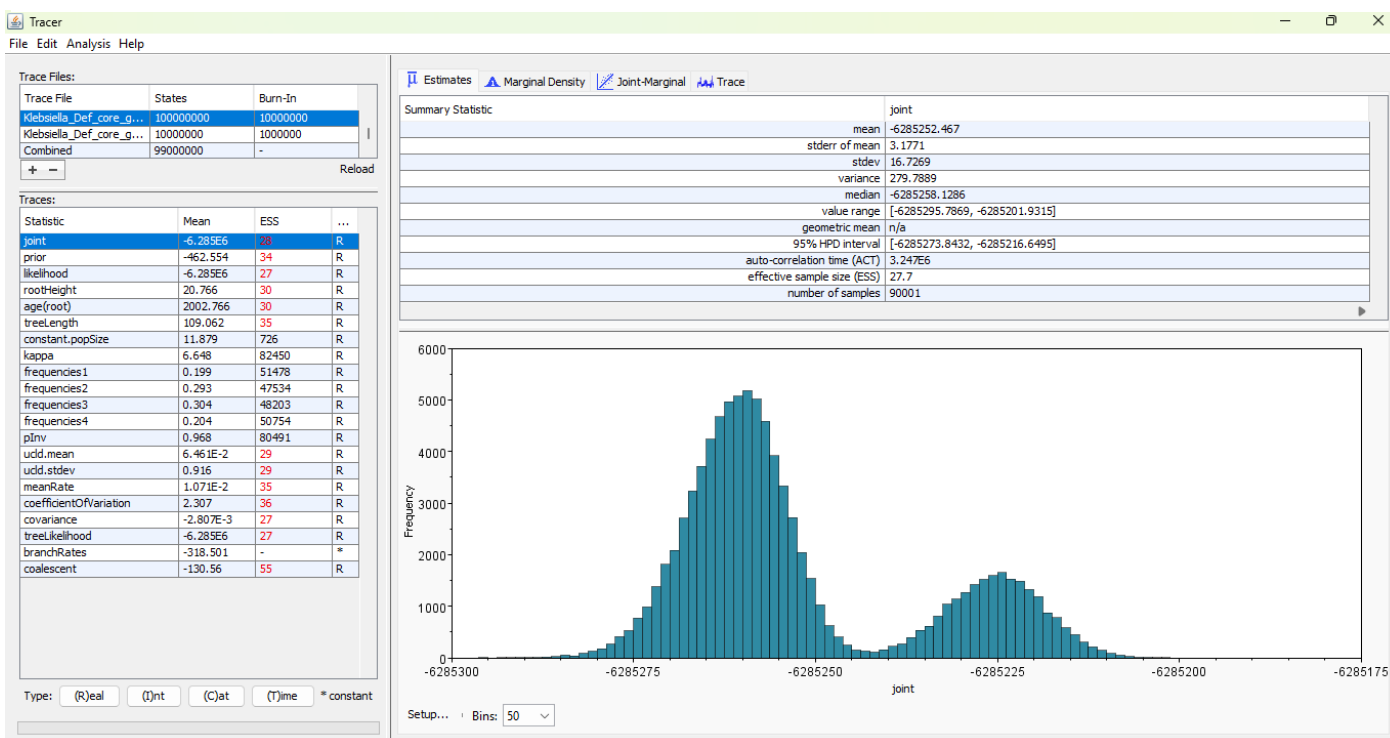


Figura 11.- Resultado de la segunda corrida de BEAST, el parámetro cambiado fue el número de iteraciones. **Fuente:** El autor (2025).

Dado que varios parámetros mostraban valores de ESS cercanos o por debajo del umbral recomendado de 200, se planteó una nueva ejecución del análisis en BEAST, incrementando el número de generaciones MCMC de 10 a 100 millones con el fin de mejorar la mezcla de la cadena y obtener estimaciones más robustas. Sin embargo, como se observa en la Figura 11, los valores de ESS en esta segunda corrida disminuyeron notablemente en comparación con los obtenidos en la ejecución inicial. Este resultado sugiere que el aumento en la longitud del MCMC no necesariamente garantiza una mejor exploración del espacio posterior, lo cual podría deberse a una mayor autocorrelación entre muestras o a una mezcla ineficiente de la cadena. Por esta razón, se optó por continuar con los resultados de la primera corrida para las etapas posteriores del análisis.

5.10 FIGTREE

Tras la generación del árbol objetivo por TreeAnnotator, se utilizó la herramienta FigTree para su visualización, adicionalmente se hizo ajustes tanto en las pestañas de *Time Scale* así como en *Scale Axis* para que se pueda observar la calibración temporal.

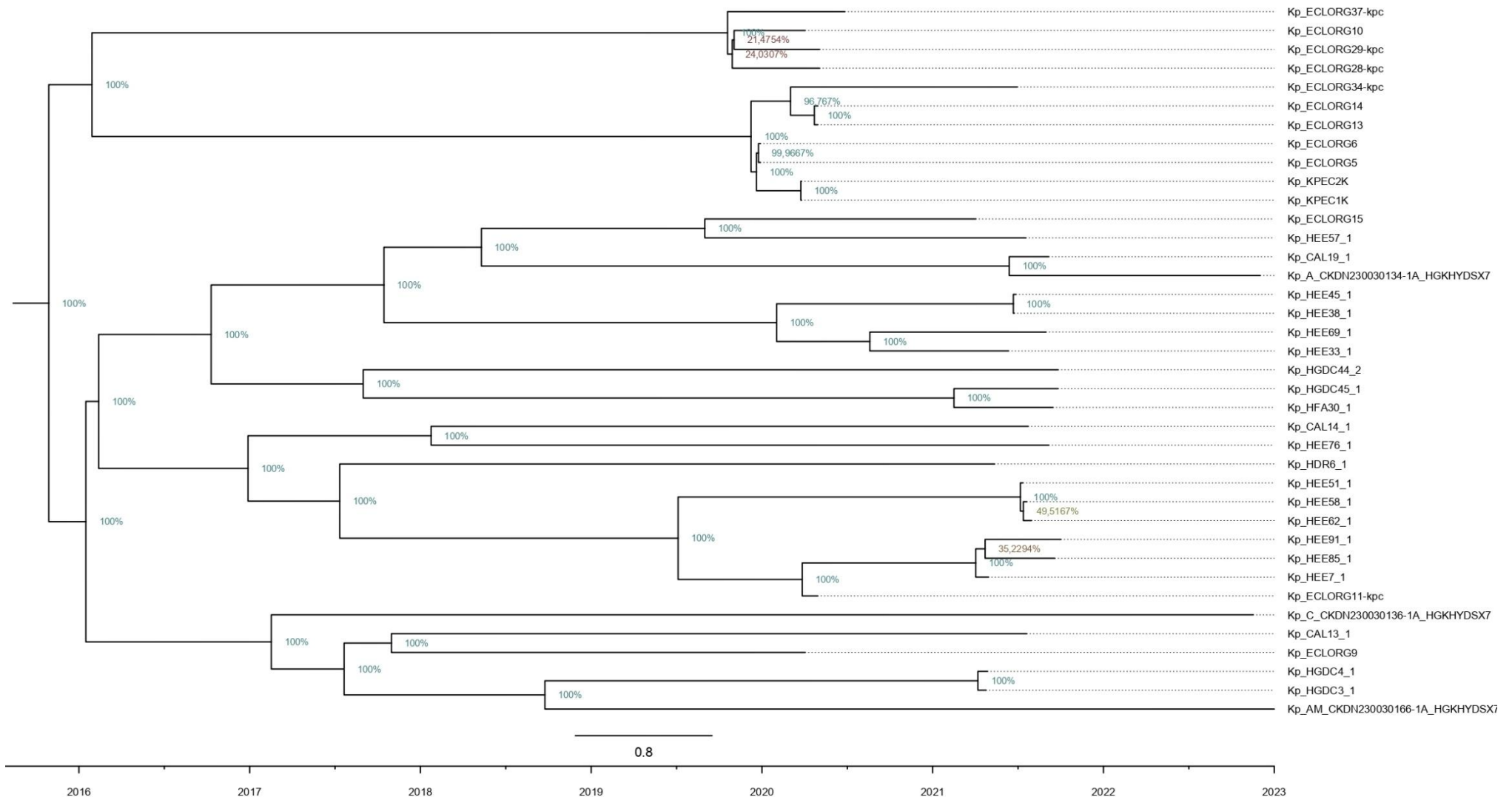


Figura 12.- Se muestra el árbol filogenético calibrado en el tiempo generado a partir del alineamiento de genes del genoma central (core genome) de aislamientos del género *Klebsiella*, empleando el enfoque Bayesiano implementado en BEAST. **Fuente:** El autor (2025).

5.10.1 PRIMERA RAMA

En el árbol filogenético se identificó un clado compuesto por once cepas altamente relacionadas, todas ellas aisladas en el Hospital Dr. Roberto Gilbert de Guayaquil, Ecuador, entre los años 2020 y 2022. La agrupación incluye cepas recolectadas en fechas muy cercanas, principalmente durante la segunda mitad del año 2020, con algunas extensiones hacia enero de 2021 y comienzos de 2022. La baja divergencia genética observada entre las secuencias, junto con su procedencia común y proximidad temporal, sugiere con fuerza la existencia de un evento clonal sostenido en esta institución. Este patrón filogenético es característico de procesos de transmisión intrahospitalaria prolongada, probablemente favorecidos por condiciones epidemiológicas estables o insuficientes medidas de contención. La disposición compacta del clado, con ramas cortas y paralelas, refuerza la hipótesis de que este linaje se mantuvo circulando activamente en el hospital durante al menos dieciocho meses. Cruzando la información con los genes de resistencia, se identificaron genes con alta prevalencia en las cepas analizadas. Destacaron principalmente *CTX*, con 14 coincidencias acumuladas, *TEM*, *aac(3)*, *aph(3')*-*DPRIME*, y *qnrB*, todos con al menos seis a siete coincidencias dentro del grupo en estudio. Esta coincidencia entre los perfiles de resistencia y la cercanía filogenética observada refuerza la hipótesis de una transmisión clonal sostenida en el tiempo, con un probable intercambio limitado de variantes genéticas y presión selectiva compartida (véase Tabla 18).

Tabla 17.- Descripción de los aislados de *K. pneumoniae*, primera rama. **Fuente:** El autor (2025).

LUGAR	FECHA	CODIGO
Guayaquil	10 07 2020	1_GCF_036937565
Guayaquil	10 07 2020	2_GCF_036937525
Guayaquil	6 10 2020	3_GCF_036937785
Guayaquil	6 10 2020	4_GCF_036937545
Guayaquil	14 10 2020	5_GCF_036937585
Guayaquil	10 11 2020	8_GCF_036937735
Guayaquil	10 11 2020	9_GCF_036937725
Guayaquil	14 11 2020	10_GCF_036937635
Guayaquil	14 11 2020	11_GCF_036937675
Guayaquil	7 01 2021	12_GCF_036937625
Guayaquil	11 01 2022	14_GCA_036937665

Tabla 18.- Cruce entre las cepas pertenecientes a la primera rama y los genes de resistencia. **Fuente:** El autor (2025).

ID funcional completo	N° Cepas	Coincidencias
CTX (MEG_2414)	25	7
CTX (MEG_2263)	25	7
TEM (MEG_6863)	25	7
AAC3 (MEG_64)	18	7
APH3-DPRIME (MEG_1057)	18	7
QNRB (MEG_5933)	15	7
APH6 (MEG_1086)	17	6
TETR (MEG_7185)	16	3
TETA (MEG_7032)	16	3
AAC6-PRIME (MEG_331)	22	2
IBCR (MEG_3286)	22	2
OXA (MEG_4980)	13	2
KPC (MEG_3508)	21	1
DFRA (MEG_2554)	8	1
OXA (MEG_5159)	5	1
RAMR (MEG_6045)	4	1
RMTG (MEG_6073)	1	1

5.10.2 SEGUNDA RAMA

El segundo clado filogenético está compuesto por 20 cepas de *K. pneumoniae* , recolectadas entre noviembre de 2020 y junio de 2023 en diversas ciudades del

Ecuador, principalmente Quito, pero también en Guayaquil, Cuenca y Atacames. Esta agrupación incluye aislamientos de múltiples instituciones, como el Hospital Dr. Roberto Gilbert, el Hospital del Río y el Hospital de Especialidades Eugenio Espejo, además de laboratorios de diagnóstico privados. La distribución geográfica y temporal de estas cepas, sumada a su agrupamiento filogenético cercano, sugiere la existencia de un linaje con amplio alcance epidemiológico, posiblemente diseminado a través de redes hospitalarias, circulación comunitaria o movilización interregional de pacientes. La persistencia de este clado durante un periodo de más de dos años refuerza su relevancia en términos de vigilancia genómica, ya que podría estar asociado a una mayor adaptabilidad, diseminación sostenida o presencia de determinantes genéticos de interés clínico. El patrón del árbol muestra una topología más abierta que en la primera rama, consistente con una evolución más heterogénea pero aún conectada por un ancestro común relativamente reciente.

Tabla 19.- Descripción de los aislados de *K. pneumoniae*, segunda rama. **Fuente:** El autor (2025).

LUGAR	FECHA	CODIGO
Guayaquil	10 11 2020	7_GCF_036937745
Guayaquil	14 10 2021	13_GCF_036937655
Quito	10 11 2021	3_GCF_029956145
Cuenca	23 11 2021	6_GCF_029956185
Quito	23 12 2021	9_GCF_029956095
Quito	4 01 2022	10_GCF_029956045
Quito	8 01 2022	11_GCF_029955985
Quito	23 01 2022	12_GCF_029955965
Quito	29 01 2022	13_GCF_037402565
Quito	31 01 2022	14_GCF_029956125
Guayaquil	3 02 2022	16_GCF_029956195
Quito	10 02 2022	17_GCF_029955935
Quito	13 03 2022	20_GCF_029955875
Guayaquil	19 03 2022	21_GCF_029956205
Quito	19 03 2022	22_GCF_029955895
Quito	28 03 2022	23_GCF_029955815
Quito	1 04 2022	24_GCF_029955825
Quito	8 04 2022	25_GCF_029955695
Quito	8 04 2022	26_GCF_029955665
Quito	14 04 2022	27_GCF_030016835
Atacames	14 06 2023	2_GCF_041699175

Por medio del cruce de información con los genes de resistencia, se identificaron múltiples determinantes con alta coincidencia en las cepas pertenecientes a la segunda rama del árbol filogenético. Entre los genes más prevalentes destacaron *CTX*, *TEM*, *KPC*, *aac(6')-PRIME*, *ibcr* y *aph(3')-DPRIME*, todos con más de 10 coincidencias en el grupo. Estos genes codifican mecanismos de resistencia frente a β -lactámicos, aminoglucósidos y macrólidos, y su recurrencia dentro de un mismo linaje filogenético sugiere una presión selectiva compartida y una posible propagación clonal prolongada entre las cepas pertenecientes a esta rama.

Tabla 20.- Obtención de genes más relevantes para la segunda rama por cruce de información. **Fuente:** El autor (2025).

ID funcional completo	N° Cepas	Coincidencias
IBCR (MEG_3286)	22	13
AAC6-PRIME (MEG_331)	22	13
CTX (MEG_2414)	25	11
TEM (MEG_6863)	25	11
KPC (MEG_3508)	21	11
CTX (MEG_2263)	25	10
SULI (MEG_6616)	17	10
MPHA (MEG_4029)	12	10
OXA (MEG_4980)	13	10
TETR (MEG_7185)	16	9
TETA (MEG_7032)	16	9
APH3-DPRIME (MEG_1057)	18	7
APH6 (MEG_1086)	17	7
DFRA (MEG_2551)	8	7
APH3-PRIME (MEG_1079)	11	6
CATA (MEG_1593)	7	6
AAC3 (MEG_64)	18	5
QNRB (MEG_5933)	15	5
ARR (MEG_1132)	11	5
CMLA (MEG_1771)	4	4
ANT3-DPRIME (MEG_915)	4	4
ANT3-DPRIME (MEG_975)	3	3
APH4 (MEG_1082)	3	3
RAMR (MEG_6045)	4	3
AAC3 (MEG_51)	3	3
OXA (MEG_5255)	3	3
SULIII (MEG_6639)	3	3
OXA (MEG_5159)	5	2
DFRA (MEG_2554)	8	2
SHV (MEG_6485)	2	2
GES (MEG_3129)	2	2
QNRB (MEG_5977)	7	1
QNRS (MEG_6020)	2	1
OXA (MEG_4977)	1	1
OXA (MEG_4770)	1	1
TETD (MEG_7068)	1	1
FLOR (MEG_2917)	1	1

5.10.3 TERCERA RAMA

La tercera agrupación filogenética está conformada por seis cepas de *K. pneumoniae*, recolectadas entre octubre de 2020 y julio de 2023 en tres ciudades del país: Guayaquil, Quito y Atacames. Las cepas 6_GCF_036937535 y 15_GCF_030016955 provienen de Guayaquil, mientras que 1_GCF_029955805 y 2_GCF_029955685 fueron aisladas en Quito, y las muestras 1_GCF_041689855 y 3_GCF_041699275 fueron recolectadas recientemente en Atacames, en la provincia de Esmeraldas. En el árbol, estas cepas se posicionan en ramas periféricas y más distantes con respecto a los clados principales, lo cual indica una mayor divergencia genética. Este patrón sugiere la evolución de linajes independientes, posiblemente desarrollados en entornos distintos a los hospitalarios tradicionales o introducidos desde contextos comunitarios no previamente caracterizados. La prolongación temporal de los aislamientos y su distribución geográfica relativamente amplia respaldan la hipótesis de circulación local diferenciada, evolución prolongada en reservorios o múltiples eventos de introducción. Estas cepas podrían representar genotipos raros, emergentes o persistentes que han escapado a los patrones de transmisión dominantes documentados en otros hospitales.

Tabla 21.- Descripción de los aislados de *K. pneumoniae*, tercera rama. **Fuente:** El autor (2025).

LUGAR	FECHA	CODIGO
Guayaquil	14 10 2020	6_GCF_036937535
Quito	5 11 2021	1_GCF_029955805
Quito	8 11 2021	2_GCF_029955685
Guayaquil	31 01 2022	15_GCF_030016955
Atacames	30 05 2023	1_GCF_041689855
Atacames	14 07 2023	3_GCF_041699275

A partir del análisis conjunto con los perfiles de resistencia, se identificaron varios genes con alta coincidencia entre las cepas que conforman la tercera rama filogenética. Destacaron *CTX*, *aph(3')-DPRIME* y *aph6*, presentes en al menos cuatro cepas, seguidos

por *tetR*, *aac(6')-PRIME*, *sulI*, *ibcr* y *tetA*, con tres coincidencias cada uno. La recurrencia de estos determinantes en cepas filogenéticamente cercanas sugiere un linaje compartido con mecanismos de resistencia similares, posiblemente favorecidos por condiciones selectivas comunes en su entorno clínico.

Tabla 22.- Genes de resistencia con mayor coincidencia en las cepas de la tercera rama filogenética. **Fuente:** El autor (2025).

ID funcional completo	N° Cepas	Coincidencias
CTX (MEG_2263)	25	4
APH3-DPRIME (MEG_1057)	18	4
APH6 (MEG_1086)	17	4
CTX (MEG_2414)	25	3
TETR (MEG_7185)	16	3
AAC6-PRIME (MEG_331)	22	3
SULI (MEG_6616)	17	3
IBCR (MEG_3286)	22	3
TETA (MEG_7032)	16	3
QNRB (MEG_5933)	15	2
AAC3 (MEG_64)	18	2
KPC (MEG_3508)	21	2
DFRA (MEG_2554)	8	2
ARR (MEG_1132)	11	2
TEM (MEG_6863)	25	1
OXA (MEG_4980)	13	1
APH3-PRIME (MEG_1079)	11	1
MPHA (MEG_4029)	12	1
DFRA (MEG_2551)	8	1
QNRS (MEG_6020)	2	1

6. CONCLUSIONES

Se analizaron 45 genomas de Ecuador, encontrándose que todas las cepas portaban genes de resistencia antimicrobiana, sin identificarse genomas sensibles. Estos resultados destacan la necesidad de fortalecer la vigilancia genómica frente a la expansión de bacterias multirresistentes en el país.

La comparación genómica a través de alineamientos múltiples de secuencias (MAUVE, MAFFT) y el análisis pan-genómico (Panaroo) permitió identificar una alta conservación en regiones centrales del genoma, contrastada con una notable variabilidad en regiones accesorias. Estos resultados reflejan la capacidad de para adaptarse mediante la adquisición de nuevos elementos genéticos, posiblemente impulsados por presiones ambientales y clínicas locales.

Se identificaron trece mecanismos moleculares distintos de resistencia a antibióticos, además de un mecanismo de regulación genética asociado a bombas de expulsión de tetraciclinas (*tetR*), cuya co-detección junto a *tetA* no había sido previamente reportada en Latinoamérica. Los mecanismos afectan diez clases de antibióticos, incluyendo aminoglucósidos, β -lactámicos, quinolonas, macrólidos-lincosamidas-estreptomicinas (MLS), sulfonamidas, tetraciclinas, fenicoles, rifampicinas, trimetoprima y genes de multiresistencia. La amplia diversidad genética observada, que comprende modificaciones enzimáticas, metilaciones ribosomales, bombas de expulsión y mutaciones en dianas moleculares, junto con la detección de reguladores asociados a la expresión de resistencia.

El análisis espacial y temporal de las cepas mediante mapeo geográfico y técnicas de reloj molecular permitió identificar agrupaciones regionales diferenciadas, así como linajes clonales y patrones de diseminación sostenida. La reconstrucción filogenética calibrada temporalmente reveló la dinámica evolutiva reciente de en Ecuador, aportando información crítica para el diseño de estrategias de control epidemiológico adaptadas a cada región.

7. REFERENCIAS

- Abueg, L. A. L., Afgan, E., Allart, O., Awan, A. H., Bacon, W. A., Baker, D., Bassetti, M., Batut, B., Bernt, M., Blankenberg, D., Bombarely, A., Bretaudeau, A., Bromhead, C. J., Burke, M. L., Capon, P. K., Čech, M., Chavero-Díez, M., Chilton, J. M., Collins, T. J., ... Zoabi, R. (2024). The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W83–W94. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae410>
- Altschup, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. In *J. Mol. Biol* (Vol. 215).
- Araújo, S., Silva, V., Quintelas, M., Martins, Â., Igrejas, G., & Poeta, P. (2025). From soil to surface water: exploring 's clonal lineages and antibiotic resistance odyssey in environmental health. In *BMC Microbiology* (Vol. 25, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03798-8>
- Arenas, M. (2015). Trends in substitution models of molecular evolution. *Frontiers in Genetics*, 6(OCT). <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00319>
- Arnold, B. J., Huang, I. T., & Hanage, W. P. (2022). Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 20, Issue 4, pp. 206–218). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00650-4>
- Askenasy, I., Swain, J. E. V., Ho, P. M., Nazeer, R. R., Welch, A., Bényei, É. B., Mancini, L., Nir, S., Liao, P., & Welch, M. (2024). Wild Type. In *Microbiology (United Kingdom)* (Vol. 170, Issue 8). Microbiology Society. <https://doi.org/10.1099/mic.0.001495>
- Astocondor-Salazar, L. (2018). Betalactamasas: la evolución del problema. *Revista Peruana de Investigación En Salud*, 2(2), 42–49. <https://doi.org/10.35839/repis.2.2.224>
- Babines-Orozco, L., Balbuena-Alonso, M. G., Barrios-Villa, E., Lozano-Zarain, P., Martínez-Laguna, Y., Rocha-Gracia, R. D. C., & Cortés-Cortés, G. (2024). Antimicrobial resistance in food-associated *Escherichia coli* in Mexico and Latin America. In *Bioscience of Microbiota, Food and Health* (Vol. 43, Issue 1, pp. 4–12). BMFH Press. <https://doi.org/10.12938/bmfh.2023-022>
- Balsalobre, L., Blanco, A., & Alarcón, T. (2020). Beta-Lactams. In J.-L. Capelo-Martínez & G. Igrejas (Eds.), *Antibiotic Drug Resistance* (pp. 57–72). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781119282546.ch3>
- Bastidas-Caldes, C., Guerrero-Freire, S., Ortuño-Gutiérrez, N., Sunyoto, T., Gomes-Dias, C. A., Ramírez, M. S., Calero-Cáceres, W., Harries, A. D., Rey, J., de Waard, J. H., & Calvopiña, M. (2023). Colistin resistance in *Escherichia coli* and *pneumoniae* in humans and backyard animals in Ecuador. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 47. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.48>
- BEAST Developers. (2020). *TreeAnnotator*. BEAST Documentation. <https://beast.community/treeannotator>
- Block, M., & Blanchard, D. L. (2023, July 17). *Aminoglycosides*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541105/>.
- Bonin, N., Doster, E., Worley, H., Pinnell, L. J., Bravo, J. E., Ferm, P., Marini, S., Prosperi, M., Noyes, N., Morley, P. S., & Boucher, C. (2023). MEGARes and AMR++, v3.0: an updated comprehensive database of antimicrobial resistance determinants and an

- improved software pipeline for classification using high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Research*, 51(1 D), D744–D752. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1047>
- Bush, K. (2023). Classification for β -lactamases: historical perspectives. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 21, Issue 5, pp. 513–522). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2023.2194633>
- Calero-Cáceres, W., Ortuño-Gutiérrez, N., Sunyoto, T., Gomes-Dias, C. A., Bastidas-Caldes, C., Ramírez, M. S., & Harries, A. D. (2023). Whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance in Ecuador: present and future implications. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, 47. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.8>
- Carvalho, I., Chenouf, N. S., Carvalho, J. A., Castro, A. P., Silva, V., Capita, R., Alonso-Calleja, C., de Lurdes Nunes Enes Dapkevicius, M., Igrejas, G., Torres, C., & Poeta, P. (2021). Multidrug-resistant *pneumoniae* harboring extended spectrum β -lactamase encoding genes isolated from human septicemias. *PLoS ONE*, 16(5 May). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250525>
- Castañeda, C., Martínez, R., & López, A. (2021). Grandes pandemias y sus desafíos. *Revista Dilemas Contemporáneos: Educación, Política y Valores.*, 3(47).
- Chang, D., Sharma, L., Dela Cruz, C. S., & Zhang, D. (2021). Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *pneumoniae* Infection. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750662>
- Chávez-Jacobo, V. M. (2020). La batalla contra las superbacterias: No más antimicrobianos, no hay ESKAPE. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.202>
- Chiner-Oms, A., Opez, M. G. L., Moreno-Molina, M., Furi, V., & Naki Comas, I. (2022). *Gene evolutionary trajectories in Mycobacterium tuberculosis reveal temporal signs of selection*. <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Coopman, E., D'Hert, S., Rademakers, R., & De Coster, W. (2025). MethyImap: visualization of modified nucleotides for large cohort sizes. *BMC Bioinformatics*, 26(1), 91. <https://doi.org/10.1186/s12859-025-06106-3>
- Cruz, H., Pinheiro, M., & Borges, V. (2024). ReporType: A Flexible Bioinformatics Tool for Targeted Loci Screening and Typing of Infectious Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/ijms25063172>
- Darling, A. C. E., Mau, B., Blattner, F. R., & Perna, N. T. (2004). Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research*, 14(7), 1394–1403. <https://doi.org/10.1101/gr.2289704>
- Darling, A. E., Mau, B., & Perna, N. T. (2010). Progressivemauve: Multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement. *PLoS ONE*, 5(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011147>
- Developers, B. (2018). *FigTree*. FigTree. <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Devi, L., Broor, S., Rautela, R., Grover, S., Chakravarti, A., & Chattopadhyaya, D. (2020). Increasing prevalence of *Escherichia coli* and *pneumoniae* producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase, carbapenemase, and NDM-1 in patients from a rural community with community acquired infections: A 3-year study. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 10(3), 156. https://doi.org/10.4103/ijabmr.ijabmr_360_19

- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969–1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>
- Duchene, S., Featherstone, L., Haritopoulou-Sinanidou, M., Rambaut, A., Lemey, P., & Baele, G. (2020). Temporal signal and the phylodynamic threshold of SARS-CoV-2. *Virus Evolution*, 6(2). <https://doi.org/10.1093/ve/veaa061>
- Duchêne, S., Holt, K. E., Weill, F. X., Le Hello, S., Hawkey, J., Edwards, D. J., Fourment, M., & Holmes, E. C. (2016). Genome-scale rates of evolutionary change in bacteria. *Microbial Genomics*, 2(11), e000094. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000094>
- El País. (2025, May 5). *Ecuador declara la alerta epidemiológica por fiebre amarilla y tosferina*. <https://elpais.com/america/2025-05-06/ecuador-declara-la-alerta-epidemiologica-por-fiebre-amarilla-y-tos-ferina.html>
- El-Gamal, M. I., Brahim, I., Hisham, N., Aladdin, R., Mohammed, H., & Bahaaeldin, A. (2017). Recent updates of carbapenem antibiotics. In *European Journal of Medicinal Chemistry* (Vol. 131, pp. 185–195). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.022>
- Faridah, H. D., Wibisono, F. M., Wibisono, F. J., Nisa, N., Fatimah, F., Effendi, M. H., Ugbo, E. N., Khairullah, A. R., Kurniawan, S. C., & Silaen, O. S. M. (2023). Prevalence of the blaCTX-M and blaTEM genes among extended-spectrum beta lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from broiler chickens in Indonesia. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 67(2), 179–186. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2023-0025>
- Fatima, A., Saleem, M., Nawaz, S., Khalid, L., Riaz, S., & Sajid, I. (2023). Prevalence and antibiotics resistance status of *Salmonella* in raw meat consumed in various areas of Lahore, Pakistan. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49487-2>
- Fonseca, É. L., Morgado, S. M., Freitas, F. S., Bighi, N. S., Cipriano, R., & Vicente, A. C. P. (2023). Unveiling the genome of a high-risk pandrug-resistant *pneumoniae* emerging in the Brazilian Amazon region, 2022. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 118. <https://doi.org/10.1590/0074-02760230081>
- Fortaleza Neves Bomfim, I. M., Almeida Amaral, M., Corrêa Rodrigues, Y., Murici Brasiense, D., Martins Aires, C. A., & Neto, R. M. (2023). High-risk clones of ESBL-producing *pneumoniae* colonizing ICU patients in Natal, northeastern Brazil. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 13(3). <https://doi.org/10.17058/reci.v13i3.18307>
- Garcia-Fulgueiras, V., Zapata, Y., Papa-Ezdra, R., Ávila, P., Caiata, L., Seija, V., Rojas Rodriguez, A. E., Magallanes, C., Márquez Villalba, C., & Vignoli, R. (2020). First characterization of *K. pneumoniae* ST11 clinical isolates harboring blaKPC-3 in Latin America. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.10.003>
- Glinka, M., Wojnowski, W., & Wasik, A. (2020). Determination of aminoglycoside antibiotics: Current status and future trends. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 131). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116034>
- González-Rocha, G., Vera-Leiva, A., Barría-Loaiza, C., Carrasco-Anabalón, S., Lima, C., Aguayo-Reyes, A., Domínguez, M., & Bello-Toledo, H. (2017). KPC: *pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias*. www.sochinf.cl

- Graf, F. E., Goodman, R. N., Gallichan, S., Forrest, S., Picton-Barlow, E., Fraser, A. J., Phan, M.-D., Mphasa, M., Hubbard, A. T. M., Musicha, P., Schembri, M. A., Roberts, A. P., Edwards, T., Lewis, J. M., & Feasey, N. A. (2024). Molecular mechanisms of re-emerging chloramphenicol susceptibility in extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacterales. *Nature Communications*, 15(1), 9019. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-53391-2>
- Guzmán, M., Salazar, E., Albarado, L., Rodolfo, H., Donato, M., & Guzmán, F. (2016). Identificación de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos en cepas intrahospitalarias de *pneumoniae*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36:10-15, 10–15.
- Hernández, M., López-Urrutia, L., Abad, D., Serna, M. D. F., Ocampo-Sosa, A. A., & Eiros, J. M. (2021). First report of an extensively drug-resistant ST23 *pneumoniae* of capsular serotype K1 co-producing CTX-M-15, OXA-48 and ArmA in Spain. *Antibiotics*, 10(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020157>
- Hussain, H. I., Aqib, A. I., Seleem, M. N., Shabbir, M. A., Hao, H., Iqbal, Z., Kulyar, M. F. e. A., Zaheer, T., & Li, K. (2021). Genetic basis of molecular mechanisms in β -lactam resistant gram-negative bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105040>
- Janda, J., & Abbott, S. (2021). The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order: “Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 46–76). <https://doi.org/10.1128/jcm.21.1.46-76.1985>
- Jeon, M., Huh, K., Ko, J. H., Cho, S. Y., Huh, H. J., Lee, N. Y., Kang, C. I., Chung, D. R., & Peck, K. R. (2021). Difference in the Clinical Outcome of Bloodstream Infections Caused by aerogenes and Enterobacter cloacae Complex. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 8, Issue 8). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab390>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K.-I., & Miyata, T. (2002). *MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform*.
- Khalefa, H. S., Arafa, A. A., Hamza, D., El-Razik, K. A. A., & Ahmed, Z. (2025). Emerging biofilm formation and disinfectant susceptibility of ESBL-producing *pneumoniae*. *Scientific Reports*, 15(1), 1599. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-84149-x>
- Khosravi, A. D., Meghdadi, H., Saki, M., Bakhtiyariniya, P., Heidari, R., Akrami, S., Dargahi, Z., Alami, A., Khoshnood, S., Moradi, M., Ahmadvhosravi, N., & Motahar, M. (2025). Molecular identification of plasmid-mediated quinolone resistance genes among *pneumoniae* clinical isolates from southwest Iran. *BMC Infectious Diseases*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-025-10596-0>
- Kim, C. Y., Lee, M., Yang, S., Kim, K., Yong, D., Kim, H. R., & Lee, I. (2021). Human reference gut microbiome catalog including newly assembled genomes from under-represented Asian metagenomes. *Genome Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-021-00950-7>
- Kuzhuppillymyal, L., Martínez, A., & Cruz, F. (2023). LOS METABOLITOS SECUNDARIOS COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS. *Biocencia*, 6(12), 33–38.
- Lalitha Aishwarya, K. V., Venkataramana Geetha, P., Eswaran, S., Mariappan, S., & Sekar, U. (2020). Spectrum of Aminoglycoside Modifying Enzymes in Gram-Negative

- Bacteria Causing Human Infections. *Journal of Laboratory Physicians*, 12(01), 27–31. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713687>
- Li, Y., Fang, L., Dong, M., Cai, H., Hua, X., Jiang, Y., Yu, Y., & Yang, Q. (2023). blaKPC-2 overexpression and blaGES-5 carriage as major imipenem/relebactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones ST463 and ST235, respectively, in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67(11). <https://doi.org/10.1128/aac.00675-23>
- Liang, J., Zhou, K., Li, Q., Dong, X., Zhang, P., Liu, H., Lin, H., Zhang, X., Lu, J., Lin, X., Li, K., Xu, T., Zhang, H., Bao, Q., Zhu, M., Hu, Y., & Ren, P. (2021). Identification and Characterization of a Novel Aminoglycoside 3''-Nucleotidyltransferase, ANT(3'')-IId, From *Acinetobacter lwoffii*. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.728216>
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. (2018). Colonization, infection, and the accessory genome of *pneumoniae*. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 8, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>
- Mattenberger, F., Vila-Nistal, M., & Geller, R. (2021). Increased RNA virus population diversity improves adaptability. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86375-z>
- Mehta, D., & Sharma A. Kumar. (2016). Cephalosporins A Review on Imperative Class of Antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology*, 1, 1–6.
- Mello, B., & Schrago, C. G. (2024). Modeling Substitution Rate Evolution across Lineages and Relaxing the Molecular Clock. In *Genome biology and evolution* (Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/10.1093/gbe/evae199>
- Menardo, F., Duchêne, S., Brites, D., & Gagneux, S. (2019). The molecular clock of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathogens*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008067>
- Mentasti, M., David, S., Turton, J., Morgan, M., Turner, L., Westlake, J., Jenkins, J., Williams, C., Rey, S., Watkins, J., Daniel, V., Mitchell, S., Forbes, G., Wootton, M., & Jones, L. (2023). Clonal expansion and rapid characterization of *pneumoniae* ST1788, an otherwise uncommon strain spreading in Wales, UK. *Microbial Genomics*, 9(9). <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001104>
- Mills Iv, W. T., Eadara, S., Jaffe, A. E., & Meffert, M. K. (2023). *SCRAP: a bioinformatic pipeline for the analysis of small chimeric RNA-seq data*. <https://doi.org/10.1261/rna>
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., Von Haeseler, A., Lanfear, R., & Teeling, E. (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>
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2025, April 1). *Ministerio de Salud Pública fortalece acciones contra la tuberculosis en centros de privación de libertad*. <https://www.salud.gob.ec/ministerio-de-salud-publica-fortalece-acciones-contra-la-tuberculosis-en-centros-de-privacion-de-libertad/>
- Morey-León, G., Andrade-Molina, D., Fernández-Cadena, J. C., & Berná, L. (2022). Comparative genomics of drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Ecuador. *BMC Genomics*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-022-09042-1>
- Naghavi, M., Vollset, S. E., Ikuta, K. S., Swetschinski, L. R., Gray, A. P., Wool, E. E., Robles Aguilar, G., Mestrovic, T., Smith, G., Han, C., Hsu, R. L., Chalek, J., Araki, D. T., Chung,

- E., Raggi, C., Gershberg Hayoon, A., Davis Weaver, N., Lindstedt, P. A., Smith, A. E., ... Murray, C. J. L. (2024). Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *The Lancet*, 404(10459), 1199–1226. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(24\)01867-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(24)01867-1)
- National Center for Biotechnology Information (US). (2008). *BLAST® Command Line Applications User Manual*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279690/>
- Neelanjana, P., & Cascella, M. (2023, June 23). *Beta-Lactam Antibiotics*.
- Neog, N., Phukan, U., Puzari, M., Sharma, M., & Chetia, P. (2021). *oxytoca* and Emerging Nosocomial Infections. In *Current Microbiology* (Vol. 78, Issue 4, pp. 1115–1123). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02402-2>
- Nguyen, L. T., Schmidt, H. A., Von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2015). IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Nor Amdan, N. A., Shahrulzamri, N. A., Hashim, R., & Mohamad Jamil, N. (2024). Understanding the evolution of macrolides resistance: A mini review. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 38, pp. 368–375). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.07.016>
- Núñez-Samudio, V., Pimentel-Peralta, G., Herrera, M., Pecchio, M., Quintero, J., & Landires, I. (2022). Molecular Genetic Epidemiology of an Emerging Antimicrobial-Resistant *pneumoniae* Clone (ST307) Obtained from Clinical Isolates in Central Panama. *Antibiotics*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121817>
- Oliveira, R., Castro, J., Silva, S., Oliveira, H., Saavedra, M. J., Azevedo, N. F., & Almeida, C. (2022). Exploring the Antibiotic Resistance Profile of Clinical *pneumoniae* Isolates in Portugal. *Antibiotics*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111613>
- Pant, A. B. (2024). Penicillin. In *Dictionary of Toxicology* (1st ed., Vol. 8, pp. 780–780). Springer Singapore.
- Papa-Ezdra, R., Cordeiro, N. F., Ferreira, F., García-Fulgueiras, V., Araújo, L., Mota, M. I., Outeda, M., Seija, V., Vignoli, R., & Bado, I. (2024). First Detection of High-Level Aminoglycoside-Resistant *pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* Isolates Due to 16S rRNA Methyltransferases with and Without bla_{NDM} in Uruguay. *Antibiotics*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13111029>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2025). Rapidly spreading Enterobacterales with OXA-48-like carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*, e0151524. <https://doi.org/10.1128/jcm.01515-24>
- Perry, J., Waglechner, N., & Wright, G. (2016). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197>
- Prado-Vivar, M. B., Ortiz, L., Reyes, J., Villacis, E., Fornasini, M., Baldeon, M. E., & Cardenas, P. A. (2019). Molecular typing of a large nosocomial outbreak of KPC-producing bacteria in the biggest tertiary-care hospital of Quito, Ecuador. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.014>
- Qin, J., Wu, Y., Shi, L., Zuo, X., Zhang, X., Qian, X., Fan, H., Guo, Y., Cui, M., Zhang, H., Yang, F., Kong, J., Song, Y., Yang, R., Wang, P., & Cui, Y. (2023). Genomic diversity of *Yersinia pestis* from Yunnan Province, China, implies a potential common

- p>
- ancestor as the source of two plague epidemics. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05186-2>
- Rahmat Ullah, S., Irum, S., Mahnoor, I., Ismatullah, H., Mumtaz, M., Andleeb, S., Rahman, A., & Jamal, M. (2024). Exploring the resistome, virulome, and mobilome of multidrug-resistant *pneumoniae* isolates: deciphering the molecular basis of carbapenem resistance. *BMC Genomics*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10139-y>
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, 67(5), 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Rambaut, A., Lam, T. T., Carvalho, L. M., & Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus Evolution*, 2(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vew007>
- Ramírez-Sánchez, D., Gibelin-Viala, C., Mayjonade, B., Duflos, R., Belmonte, E., Pailler, V., Bartoli, C., Carrere, S., Vailleau, F., & Roux, F. (2022). Investigating genetic diversity within the most abundant and prevalent non-pathogenic leaf-associated bacteria interacting with *Arabidopsis thaliana* in natural habitats. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.984832>
- Raro, O. H. F., da Silva, R. M. C., Filho, E. M. R., Sukiennik, T. C. T., Stadnik, C., Dias, C. A. G., Oteo Iglesias, J., & Pérez-Vázquez, M. (2020). Carbapenemase-Producing *pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC–2 or blaNDM–1. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01563>
- Russo, T., & Marr, C. M. (2019). Hypervirulent *pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 57(6), 739–740. <https://doi.org/10.1128/JCM.01206>
- Samal, K. C., Sahoo, J. P., Behera, L., & Dash, T. (2021). Understanding the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Program and a Step-by-step Guide for its use in Life Science Research. *Bhartiya Krishi Anusandhan Patrika, Of*. <https://doi.org/10.18805/bkap283>
- Santos, J. D., Sobral, D., Pinheiro, M., Isidro, J., Bogaardt, C., Pinto, M., Eusébio, R., Santos, A., Mamede, R., Horton, D. L., Gomes, J. P., & Borges, V. (2024). INSaFLU-TELEVIR: an open web-based bioinformatics suite for viral metagenomic detection and routine genomic surveillance. *Genome Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-024-01334-3>
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
- Shankar, C., Jacob, J. J., Vasudevan, K., Biswas, R., Manesh, A., Sethuvel, D. P. M., Varughese, S., Biswas, I., & Veeraraghavan, B. (2020). Emergence of Multidrug Resistant Hypervirulent ST23 *pneumoniae*: Multidrug Resistant Plasmid Acquisition Drives Evolution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.575289>
- Silva, C. P., Oliveira, C. J. B. de, Leite, E. L., Cibulski, S. P., Fernandes, M., Vasconcelos, P. C., Dias, L. M., Silva, N. M. V. da, Garino Júnior, F., & Fernandes, A. C. de C. (2022). CTX-M-15-producing *pneumoniae* ST273 associated with nasal infection in a domestic cat. In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 28, pp. 203–205). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.01.004>

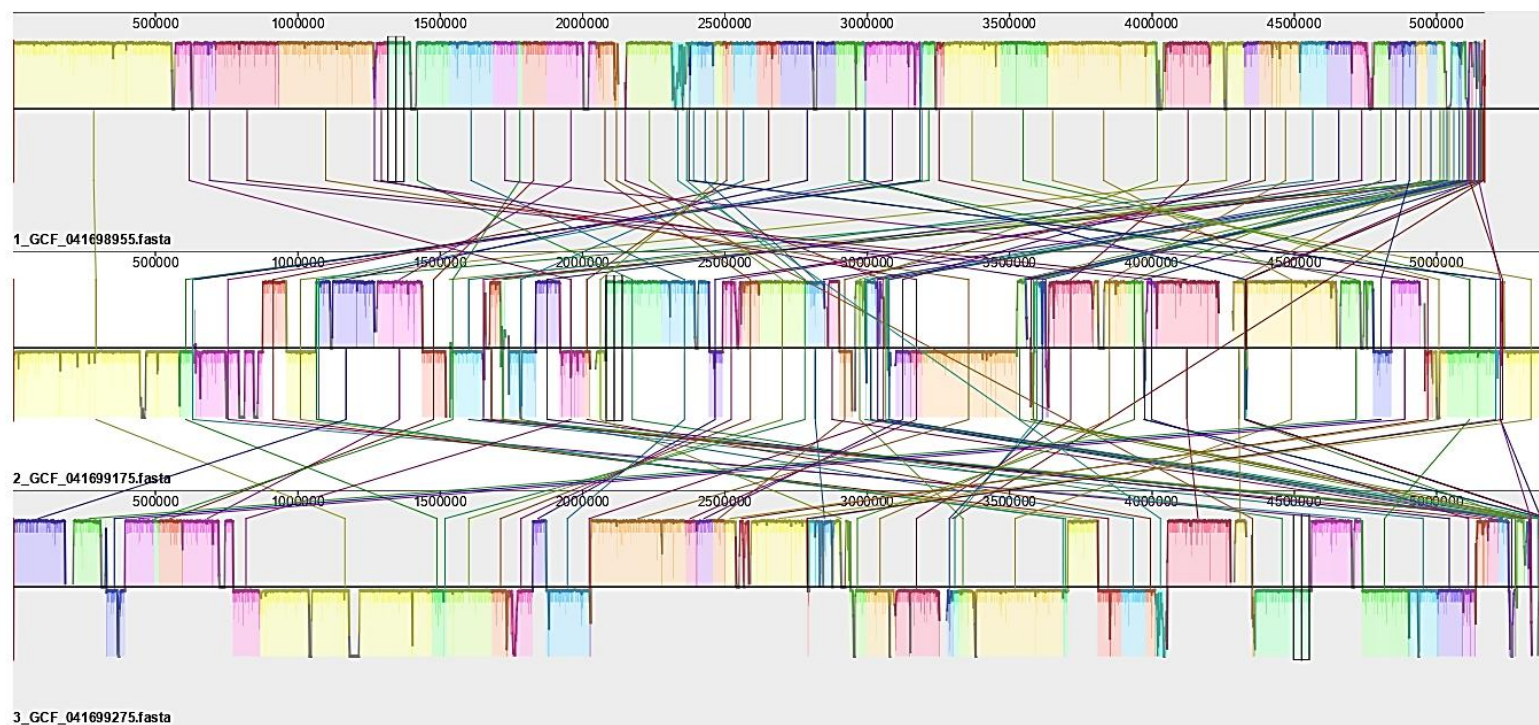
- Soria-Segarra, C., Soria-Segarra, C., Molina-Matute, M., Agreda-Orellana, I., Núñez-Quezada, T., Cevallos-Apolo, K., Miranda-Ayala, M., Salazar-Tamayo, G., Galarza-Herrera, M., Vega-Hall, V., Villacis, J. E., & Gutiérrez-Fernández, J. (2024). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Ecuador. *BMC Infectious Diseases*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09248-6>
- Suchard, M. A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D. L., Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2018). Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution*, 4(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>
- Swissinfo. (2025, May 5). *Ecuador reporta 11 muertes por tosferina en lo que va de 2025, la mayoría recién nacidos*. <https://www.swissinfo.ch/spa/ecuador-reporta-11-muertes-por-tosferina-en-lo-que-va-de-2025%2C-la-mayor%C3%ADa-reci%C3%A9n-nacidos/89268250>
- Tay, J. H., Kocher, A., & Duchene, S. (2024). Assessing the effect of model specification and prior sensitivity on Bayesian tests of temporal signal. *PLOS Computational Biology*, 20(11), e1012371. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1012371>
- Tettelin, H., Maignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Angiuoli, S. V., Crabtree, J., Jones, A. L., Scott Durkin, A., DeBoy, R. T., Davidsen, T. M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit Ros, I., Peterson, J. D., Hauser, C. R., Sundaram, J. P., Nelson, W. C., ... Fraser, C. M. (2005). *Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: Implications for the microbial “pan-genome.”* www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506758102
- Tilahun, M., Kassa, Y., Gedefie, A., & Ashagire, M. (2021). Emerging carbapenem-resistant enterobacteriaceae infection, its epidemiology and novel treatment options: A review. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 14, pp. 4363–4374). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/IDR.S337611>
- Tonkin-Hill, G., MacAlasdair, N., Ruis, C., Weimann, A., Horesh, G., Lees, J. A., Gladstone, R. A., Lo, S., Beaudoin, C., Floto, R. A., Frost, S. D. W., Corander, J., Bentley, S. D., & Parkhill, J. (2020). Producing polished prokaryotic pangenomes with the Panaroo pipeline. *Genome Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02090-4>
- Uddin, T. M., Chakraborty, A. J., Khusro, A., Zidan, B. R. M., Mitra, S., Emran, T. Bin, Dhama, K., Ripon, M. K. H., Gajdács, M., Sahibzada, M. U. K., Hossain, M. J., & Koirala, N. (2021). Antibiotic resistance in microbes: History, mechanisms, therapeutic strategies and future prospects. In *Journal of Infection and Public Health* (Vol. 14, Issue 12, pp. 1750–1766). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.10.020>
- Varela, M. F., Stephen, J., Lekshmi, M., Ojha, M., Wenzel, N., Sanford, L. M., Hernandez, A. J., Parvathi, A., & Kumar, S. H. (2021). Bacterial resistance to antimicrobial agents. In *Antibiotics* (Vol. 10, Issue 5). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050593>
- Venkatesan, M., Fruci, M., Verellen, L. A., Skarina, T., Mesa, N., Flick, R., Pham, C., Mahadevan, R., Stogios, P. J., & Savchenko, A. (2023). Molecular mechanism of plasmid-borne resistance to sulfonamide antibiotics. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39778-7>
- Vernikos, G. S. (2020). A review of pangenome tools and recent studies. In *The Pangenome: Diversity, Dynamics and Evolution of Genomes* (pp. 89–112). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-38281-0_4

- Wang, L., Zhu, M., Yan, C., Zhang, Y., He, X., Wu, L., Xu, J., Lu, J., Bao, Q., Hu, Y., Xu, T., & Liang, J. (2023). Class 1 integrons and multiple mobile genetic elements in clinical isolates of the *pneumoniae* complex from a tertiary hospital in eastern China. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.985102>
- Wei, L., Wu, L., Wen, H., Feng, Y., Zhu, S., Liu, Y., Tang, L., Doughty, E., van Schaik, W., McNally, A., Zong, Z., Wei, C. L., & Schaik, van W. (2021). Spread of Carbapenem-Resistant *pneumoniae* in an Intensive Care Unit: A Whole-Genome Sequence-Based Prospective Observational Study. *MicrobiolSpectrum.Asm.Org*, 9, 58–79. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00058>
- Werth, B. J. (2024). *Sulfonamidas* (Vol. 2024). Manual Merck. <https://www.merckmanuals.com/es-us/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-fármacos-antibacterianos/sulfonamidas>
- Wielgoss, S., Van Dyken, J. D., & Velicer, G. J. (2024). Mutation Rate and Effective Population Size of the Model Cooperative Bacterium *Myxococcus xanthus*. *Genome Biology and Evolution*, 16(5). <https://doi.org/10.1093/gbe/evae066>
- Winter, M., Harms, K., Johnsen, P., & Vos, M. (2023). Collection of Annotated *Acinetobacter* Genome Sequences. *Microbiology Resource Announcements*, 12(3). <https://doi.org/10.1128/mra.01094-22>
- Wyres, K. L., & Holt, K. E. (2018). *pneumoniae* as a key trafficker of drugresistance genes from environmental to clinicallyimportant bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 131–139.
- Wyres, K. L., Lam, M. M. C., & Holt, K. E. (2020). Population genomics of *pneumoniae*. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Issue 6, pp. 344–359). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0315-1>
- Yang, J., Zhang, K., Ding, C., Wang, S., Wu, W., & Liu, X. (2023). Exploring multidrug-resistant *pneumoniae* antimicrobial resistance mechanisms through whole genome sequencing analysis. *BMC Microbiology*, 23(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02974-y>
- Yu, W., Jia, P., Chu, X., Li, S., Jia, X., Zhu, Y., Liu, X., Xu, Y., & Yang, Q. (2024). Dual role of *ramR* mutation in enhancing immune activation and elevating eravacycline resistance in *pneumoniae*. *IMetaOmics*, 1(2). <https://doi.org/10.1002/imo2.39>
- Yushchuk, O., Binda, E., & Marinelli, F. (2020). Glycopeptide Antibiotic Resistance Genes: Distribution and Function in the Producer Actinomycetes. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01173>
- Zhang, X. (2024). Fourier transform-based electronic logic information processing architecture design. *Applied Mathematics and Nonlinear Sciences*, 9(1). <https://doi.org/10.2478/amns.2023.1.00393>
- Zhao, W. (2024). Penicillin and Beta-Lactam Drug Allergy. In W. A. Zuelzer & S. Metikala (Eds.), *Unusual Conditions That Every Orthopaedic Surgeon Should Know: A Case-Based Guide* (pp. 329–349). Springer Nature Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-031-58946-1_16
- Zhu, J., Wang, T., Chen, L., & Du, H. (2021). Virulence Factors in Hypervirulent *pneumoniae*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642484>

8. ANEXOS



Anexo 1.- Alineamiento de los genomas correspondientes al año 2022 solo de *K. pneumoniae*. Se observan más fragmentaciones y cambios en el orden de las secuencias, lo que indica una mayor variabilidad entre las cepas analizadas ese año. **Fuente:** El autor (2025).



Anexo 2.- Alineamiento de genomas correspondientes al año 2023. Aunque se analizaron menos cepas, se observaron varios cambios en la posición y orientación de los fragmentos, lo que sugiere diferencias estructurales relevantes entre los genomas. **Fuente:** El autor (2025).

BEAUti - BEAUTi1

File Edit Help

Partitions Taxa Tips Traits Sites Clocks Trees States Priors Operators MCMC

☒ Use tip dates

Parse Dates Import Dates Set Dates Clear Dates Set Uncertainty

Dates as: Years Since some time in the p... Specify origin date: unable to parse date

Name	Date	Uncertainty	Height
10_GCF_036937635	2020.8688524590164	0.0	2.6626543902987123
3_GCF_041699275	2023.531506849315	0.0	0.0
8_GCF_036937735	2020.8579234972678	0.0	2.673583352047217
3_GCF_029956145	2021.8575342465754	0.0	1.6739726027396955
4_GCF_036937545	2020.7622950819673	0.0	2.7692117673477696
17_GCF_029955935	2022.109589041096	0.0	1.4219178082191775
15_GCF_030016955	2022.0821917808219	0.0	1.4493150684932061
21_GCF_029956205	2022.2109589041097	0.0	1.3205479452053623
23_GCF_029955815	2022.2356164383561	0.0	1.2958904109589184
7_GCF_036937745	2020.8579234972678	0.0	2.673583352047217
9_GCF_029956095	2021.9753424657533	0.0	1.556164383561736
2_GCF_029955685	2021.8520547945207	0.0	1.6794520547944103
3_GCF_036937785	2020.7622950819673	0.0	2.7692117673477696
25_GCF_029955695	2022.2657534246575	0.0	1.2657534246575324
6_GCF_036937535	2020.7841530054645	0.0	2.747353843850533
14_GCF_029956125	2022.0821917808219	0.0	1.4493150684932061
14_GCA_036937665	2022.027397260274	0.0	1.504109589041036
12_GCF_029955965	2022.0602739726028	0.0	1.4712328767122926
2_GCF_036937525	2020.5218579234972	0.0	3.009648925817828
5_GCF_036937585	2020.7841530054645	0.0	2.747353843850533
22_GCF_029955895	2022.2109589041097	0.0	1.3205479452053623
20_GCF_029955875	2022.194520547945	0.0	1.3369863013699614
11_GCF_029955985	2022.0191780821917	0.0	1.5123287671233356
2_GCF_041699175	2023.4493150684932	0.0	0.08219178082185863
27_GCF_030016835	2022.282191780822	0.0	1.2493150684931607
11_GCF_036937675	2020.8688524590164	0.0	2.6626543902987123
13_GCF_037402565	2022.0767123287671	0.0	1.454794520547921
13_GCF_036937655	2021.7835616438356	0.0	1.747945205479482

Tip date sampling: Off Apply to taxon set: All taxa

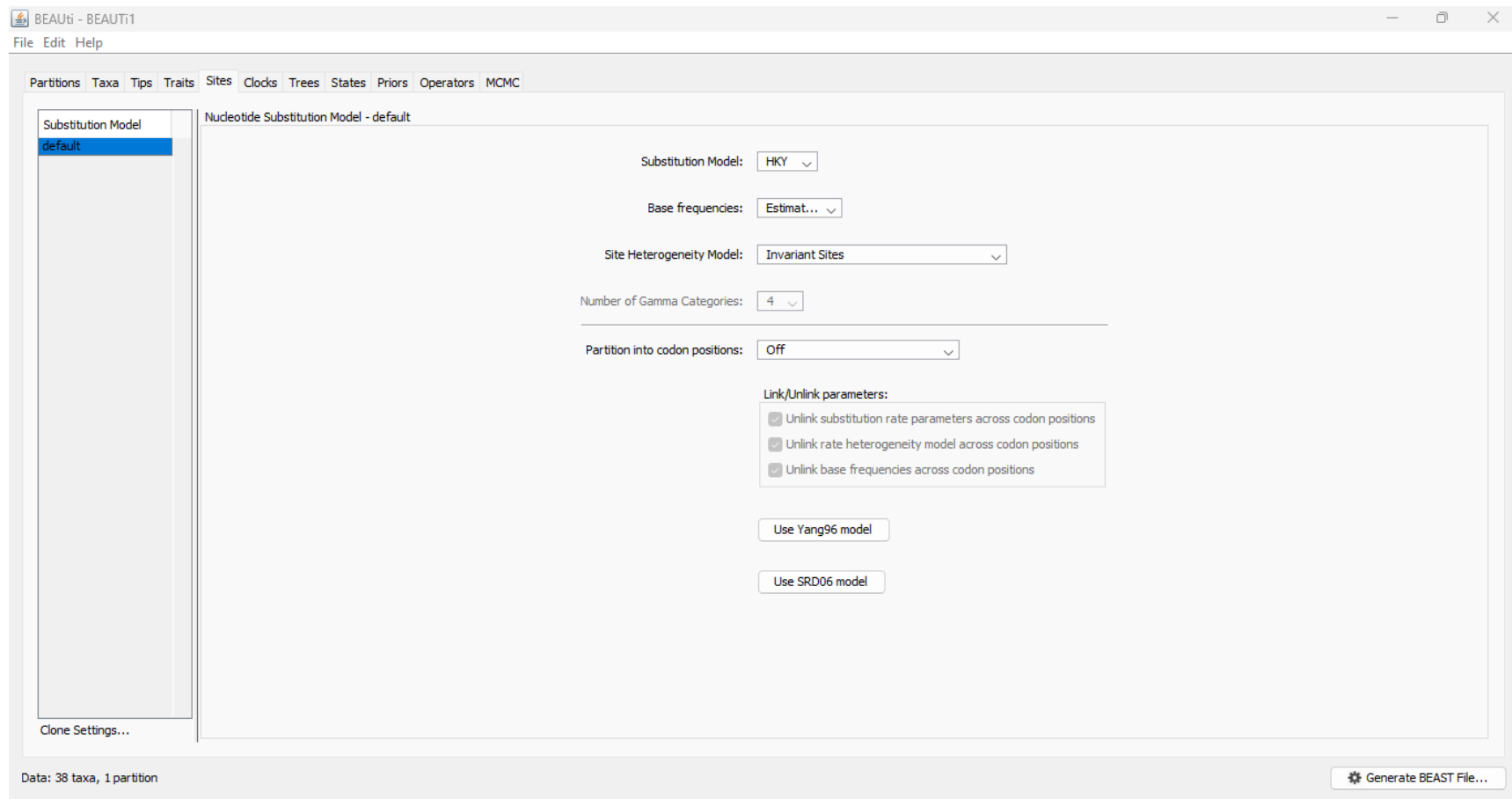
Data: 38 taxa, 1 partition

Generate BEAST File...

Anexo 3.- Captura de pantalla de la herramienta BEAUti, en la pestaña de configuración de fechas (*Tip Dates*). Se muestran las fechas de muestreo asignadas a cada cepa, expresadas en formato decimal, junto con los valores de incertidumbre y la altura relativa empleada para la calibración temporal en BEAST. **Fuente:** El autor (2025).

Cepa codificada	Fecha
1_GCF_029955805	5 11 2021
1_GCF_036937565	10 07 2020
1_GCF_041698955	30 05 2023
10_GCF_029956045	4 01 2022
10_GCF_036937635	14 11 2020
11_GCF_029955985	8 01 2022
11_GCF_036937675	14 11 2020
12_GCF_029955965	23 01 2022
12_GCF_036937625	7 01 2021
13_GCF_036937655	14 10 2021
13_GCF_037402565	29 01 2022
14_GCA_036937665	11 01 2022
14_GCF_029956125	31 01 2022
15_GCF_030016955	31 01 2022
16_GCF_029956195	3 02 2022
17_GCF_029955935	10 02 2022
18_GCF_029956165	25 02 2022
19_GCF_029960345	2 03 2022
2_GCF_029955685	8 11 2021
2_GCF_036937525	10 07 2020
2_GCF_041699175	14 06 2023
20_GCF_029955875	13 03 2022
21_GCF_029956205	19 03 2022
22_GCF_029955895	19 03 2022
23_GCF_029955815	28 03 2022
24_GCF_029955825	1 04 2022
25_GCF_029955695	8 04 2022
26_GCF_029955665	8 04 2022
27_GCF_030016835	14 04 2022
28_GCF_029955765	17 04 2022
3_GCF_029956145	10 11 2021
3_GCF_036937785	6 10 2020
3_GCF_041699275	14 07 2023
4_GCF_029960265	16 11 2021
4_GCF_036937545	6 10 2020
5_GCF_029956065	21 11 2021
5_GCF_036937585	14 10 2020
6_GCF_029956185	23 11 2021
6_GCF_036937535	14 10 2020
7_GCF_029960425	5 12 2021
7_GCF_036937745	10 11 2020
8_GCF_029960525	5 12 2021
8_GCF_036937735	10 11 2020
9_GCF_029956095	23 12 2021
9_GCF_036937725	10 11 2020

Anexo 4.- Fechas de muestreo de las distintas cepas. Estas fechas fueron obtenidas a partir de los metadatos de cada muestra y empleadas en la construcción del archivo DAT para su uso en BEAUTi. **Fuente:** El autor (2025).



Anexo 5.- Captura de pantalla de la herramienta BEAUti, en la pestaña *Sites*, donde se configuró el modelo de sustitución HKY. Esta sección permite definir las características del modelo evolutivo utilizado en el análisis filogenético. **Fuente:** El autor (2025).

BEAUti - BEAUTi1

File Edit Help

Partitions Taxa Tips Traits Sites Clocks Trees States **Priors** Operators MCMC

Parameter	Prior	Bound	Description
kappa	* LogNormal [1, 1.25], initial=2	[0, ∞]	HKY transition-transversion parameter
frequencies	* Dirichlet [1,1]	[0, ∞]	base frequencies
pInv	* Uniform [0, 1], initial=0.5	[0, 1]	proportion of invariant sites parameter
ucld.mean	* Approx. Reference Prior, initial=...	[0, ∞]	uncorrelated lognormal relaxed clock mean
ucld.stdev	* Exponential [0.333333], initial=0...	[0, ∞]	uncorrelated lognormal relaxed clock stdev
treeModel.rootHeight	* Using Tree Prior in [3.009649, ∞]	[3.009649, ∞]	root height of the tree
constant.popSize	* LogNormal [0, 1], initial=1	[0, ∞]	coalescent population size parameter

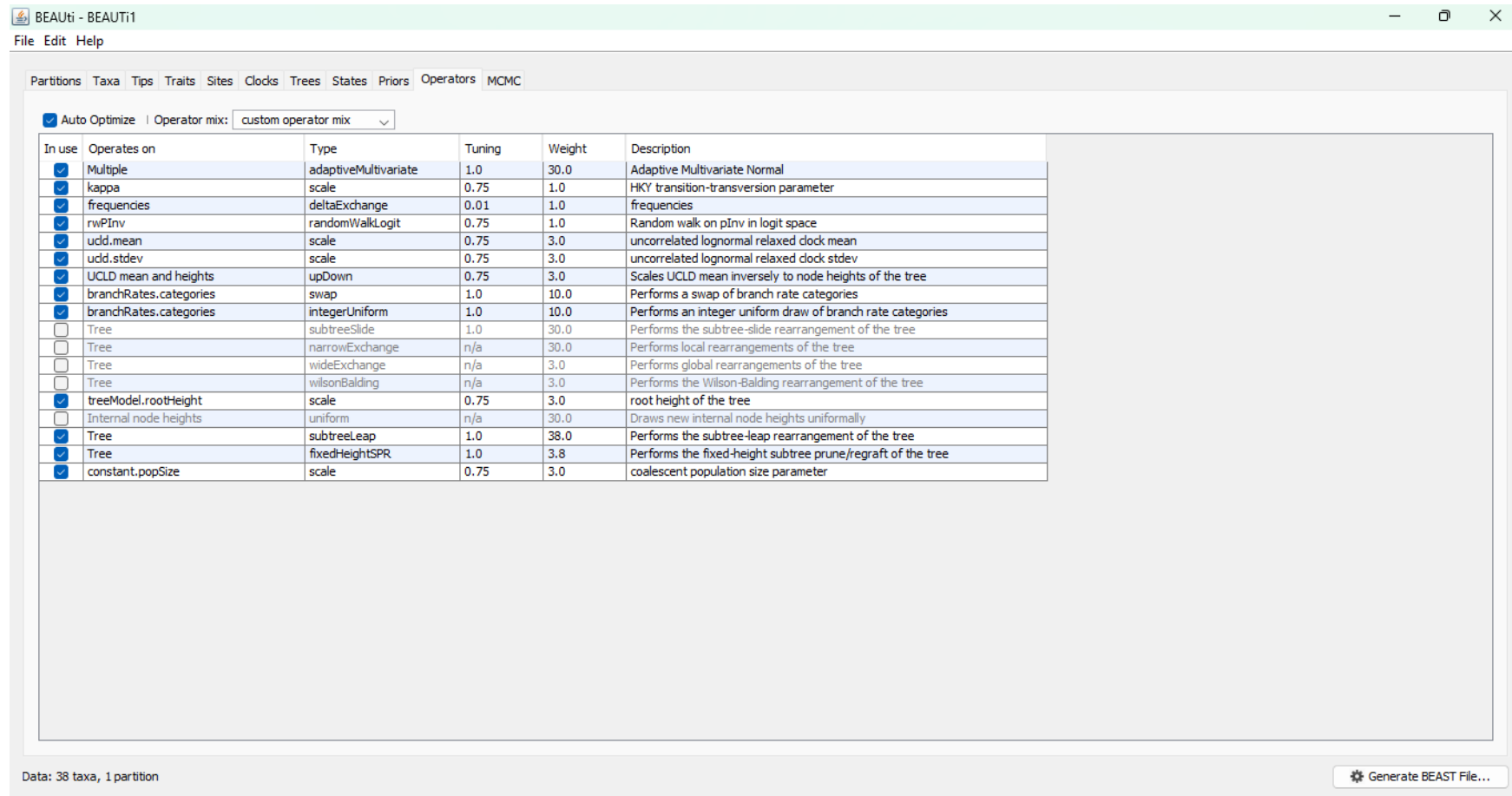
Link parameters together Link parameters into a hierarchical model Unlink parameters

* Marked parameters currently have a default prior distribution. You should check that these are appropriate.

Data: 38 taxa, 1 partition

Generate BEAST File...

Anexo 6.- Vista de la pestaña *Priors* en BEAUti, donde se definen las distribuciones a priori para los parámetros del modelo. En este análisis se mantuvieron las configuraciones por defecto asignadas automáticamente por la herramienta. **Fuente:** El autor (2025).



Anexo 7.- Vista de la pestaña Operators en BEAUTi, donde se definen los movimientos aplicados a cada parámetro durante la simulación MCMC. En este análisis se mantuvo la configuración sugerida por el programa, utilizando el esquema de operadores por defecto con la opción *Auto Optimize* habilitada para ajustar automáticamente los valores durante la ejecución. **Fuente:** El autor (2025).

BEAUti - BEAUTi1

File Edit Help

Partitions Taxa Tips Traits Sites Clocks Trees States Priors Operators MCMC

Length of chain: 10000000

Echo state to screen every: 1000

Log parameters every: 1000

Checkpoint every: 1000000

File name stem: Klebsiella_Def_core_gene

☒ Add .txt suffix

Log file name: Klebsiella_Def_core_gene.log.txt

Trees file name: Klebsiella_Def_core_gene.trees

Checkpoint file name: Klebsiella_Def_core_gene.chkpt

☐ Create tree log file with branch length in substitutions:

Substitutions trees file name:

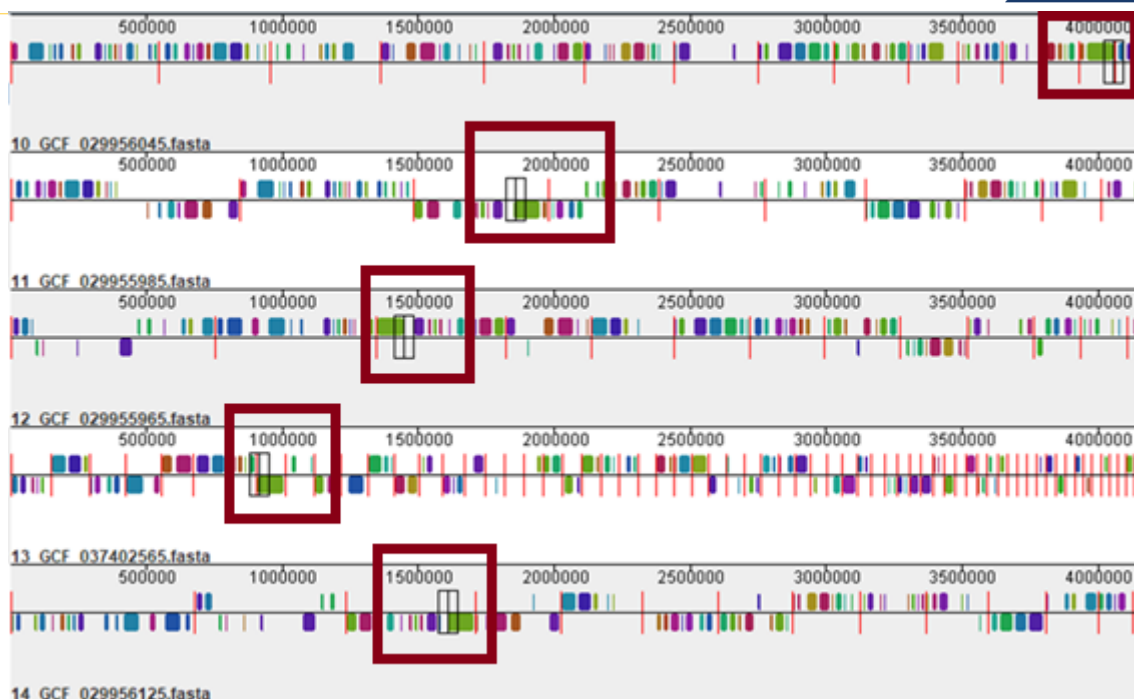
☒ Create operator analysis file:

Operator analysis file name: Klebsiella_Def_core_gene.ops.txt

Data: 38 taxa, 1 partition

Generate BEAST File...

Anexo 8.- Pestaña *MCMC* de BEAUti, utilizada para definir la longitud de la cadena, la frecuencia de muestreo y los archivos de salida del análisis. En este caso, se estableció una cadena de 10 millones de iteraciones y se generaron los archivos de log, árboles y puntos de control.
Fuente: El autor (2025).



Anexo 9.- Visualización del alineamiento múltiple de seis genomas mediante Mauve. Los recuadros señalan regiones con evidencia de reordenamientos e inversiones. Estas se manifiestan como bloques alineados en diferentes posiciones entre cepas o invertidos en orientación. La variación en el orden y orientación de estos bloques refleja diferencias estructurales significativas a nivel genómico, propias de regiones no conservadas o sujetas a reorganización evolutiva. **Fuente:** El autor (2025).