



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito- Ecuador”

Realizado por:

Verónica Mercedes Chuquitarco Catagña

Director del proyecto:

José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 5 de Abril de 2024

“Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **VERONICA MERCEDES CHUQUITARCO CATAGÑA**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° 1721126561, declaro bajo juramento que el Proyecto de Investigación titulado: **Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador** es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Verónica Mercedes Chuquitarco Catagña

C.C.: 1721126561

“Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

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

José Rubén Ramírez Iglesias

CC.: 3050666993

“Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

LOS PROFESORES INFORMANTES

Gianina Lizeth Suárez Rodríguez

Adriana Gabriela Castillo Landin

Después de revisar el Proyecto de Investigación, lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.



Gianina Lizeth Suárez Rodríguez
CC: 1720210978



Adriana Gabriela Castillo Landin
CC: 1718555871

Quito, 5 de Abril del 2024

“Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

DEDICATORIA

A mis padres, a mi hermano y esposo por acompañarme en cada pasito que doy en la búsqueda de ser una excelente persona y profesional, por alentarme para continuar a pesar de los tropezones y las inseguridades, por acompañarme en las noches de desvelo y por motivarme a iniciar y finalizar cada meta propuesta, los amo infinitamente.

A mis amigas Cyntia y Pamela, por su amistad desinteresada y más allá de cualquier cosa, gracias por el empujoncito y el apoyo incondicional.

A Gaby por todos los momentos y las experiencias que nos permitió vivir esta maestría a nivel personal y profesional.

A mis docentes de la UISEK por cada gramo de sabiduría impartido.

“Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

AGRADECIMIENTOS

Al área de microbiología del Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador, por proporcionarnos los aislados bacterianos para este estudio en cuestión.

Al Dr. Giovani Núñez ex jefe técnico del servicio de laboratorio y medicina transfusional por otorgar la respectiva autorización para el desarrollo de este estudio.

Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el período 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador.

Verónica Chuquitarco^{1*}, José Rubén Ramírez², Juan Carlos Navarro³, Milton Nuñez⁴

¹ Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; veronica.chuquitarco@uisek.edu.ec

² Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; jose.ramirez@uisek.edu.ec

³ Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

⁴ Hospital General Docente de Calderón, Laboratorio clínico, HGDC; milton.nunez@hgdc.gob.ec

* Autor de Correspondencia: veronica.chuquitarco@uisek.edu.ec

Resumen: Las enterobacterias ampliamente distribuidas a nivel hospitalario representan una seria preocupación debido a su capacidad para desarrollar multirresistencias. Analizar el resistoma es crucial para predecir el riesgo de que ciertas bacterias con genes de resistencia se propaguen en el medio ambiente. Sin embargo, en Ecuador no existen estudios que utilicen metodologías moleculares, como la secuenciación de tercera generación, que permite detectar y caracterizar todas las variaciones genéticas asociadas a mecanismos moleculares de resistencia mediante la secuenciación de todo el genoma bacteriano. El objetivo de este estudio fue conocer los determinantes genéticos implicados en la RAM en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el año 2022 en Hospital General Docente de Calderón (HGDC) de Quito a través de la secuenciación de tercera generación y verificar que el gen de resistencia bacteriano *bla_{KPC}* tiene mayor propagación y tasa de resistencia sobre otros genes que codifican carbapenemasas (*bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*) y betalactamasas de espectro extendido (BLEE, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* y *bla_{TEM}*). Se verificó la viabilidad de los aislados bacterianos en el HGDC. Se realizó la extracción de ADN de 10 aislados bacterianos. A continuación, se realizó la agrupación de acuerdo con el género, fenotipo de resistencia y tipo de muestra. Se construyó las librerías, posteriormente se secuenció utilizando el dispositivo MinION y finalmente el análisis de datos se realizó a través de la plataforma EPI2ME. Se determinaron los siguientes genes *bla_{KPC-2}* y *bla_{KPC-3}*, *bla_{TEM-4}*, el *bla_{OXA-181}*, el *bla_{OXA-1}* que otorgan resistencia a los antibióticos betalactámicos, *OqxB*, *qnrS1*, *qnrB5* que otorgan resistencia a los antibióticos fluoroquinolónicos y *aph(3')-Ia* que otorga resistencia a los aminoglucósidos. A pesar de que el número de secuencias fue bajo cada gen identificado y caracterizado logró la cobertura suficiente para abarcar toda la región relevante de cada gen descrito, mostrando así que, el gen *bla_{KPC}* no es el único gen encontrado en estos aislados.

Palabras clave: Enterobacterias, resistencia antimicrobiana, genes de resistencia, entornos hospitalarios, betalactamasas, fluoroquinolonas, aminoglucósidos, multirresistencia.

Abstract: Enterobacteriaceae, widely distributed in hospitals, represent a serious concern due to their ability to develop multidrug resistance. Analyzing the resistome is crucial to predict the risk of certain bacteria with resistance genes spreading in the environment. However, in Ecuador there are no studies that use molecular methodologies, such as third-generation sequencing, which allows the detection and characterization of all genetic variations associated with molecular mechanisms of resistance through the sequencing of the entire bacterial genome. The objective of this study was to know the genetic determinants involved in AMR in the collection of isolates of the Enterobacteriaceae family captured during the year 2022 at the Calderón General Teaching Hospital (HGDC) in Quito through third-generation sequencing and to verify that the bacterial resistance gene *bla_{KPC}* has greater spread and resistance rate than other genes that encode carbapenemases (*bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA}*) and extended-spectrum beta-lactamases (BLEE, *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* and *bla_{TEM}*). The viability of the bacterial isolates was verified at the HGDC. DNA extraction was carried out from 10 bacterial isolates. Grouping was then performed according to gender, resistance phenotype, and sample type. The libraries were built, subsequently sequenced using the MinION device and finally the data analysis was carried out through the EPI2ME platform. The following genes *bla_{KPC-2}* and *bla_{KPC-3}*, *bla_{TEM-4}*, *bla_{OXA-181}*, *bla_{OXA-1}*, which provide resistance to beta-lactam antibiotics, *OqxB*, *qnrS1*, *qnrB5*, which provide resistance to fluoro-quinolone antibiotics, were determined. and *aph(3')-Ia* which provides resistance to aminoglycosides. Although the number of sequences was low, each gene identified and characterized achieved sufficient coverage to cover the entire relevant region of each gene described, thus showing that the *bla_{KPC}* gene is not the only gene found in these isolates.

Keywords: Enterobacteriaceae, antimicrobial resistance, resistance genes, hospital environments, beta-lactamases, fluoroquinolones, aminoglycosides, multidrug resistance

1. Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM) es una preocupación mundial creciente y una gran amenaza para la salud pública, siendo declarada problema de salud mundial por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en abril de 2011, en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE). En el 2015, la OMS propuso un plan de acción contra la RAM, que plantea estrategias para reducir de forma sostenible la incidencia de la infectividad a lo largo del tiempo, ya que aproximadamente 700.000 personas mueren actualmente por enfermedades resistentes a los medicamentos cada año y se estima que para el año 2050 podrían alcanzar los 10 millones de defunciones anuales en todo el mundo (Alós, 2015; Fariña, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2020).

En los últimos años, ha existido un incremento de la RAM por enzimas bacterianas, convirtiéndose en uno de los problemas de salud pública más graves que se deben enfrentar en la actualidad (OMS, 2018). Un grupo de bacterias ampliamente distribuidas a nivel hospitalario son los bacilos gramnegativos pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae, causantes de enfermedades, infecciones comunitarias y nosocomiales de tipo respiratorias, urinarias, del sistema nervioso central y de heridas quirúrgicas que tienen la capacidad de llegar al torrente sanguíneo por vías respiratorias o infecciones de heridas (Espinoza, 2020). Estas bacterias se caracterizan por su capacidad para adquirir y desarrollar resistencia a los antimicrobianos y en especial a los carbapenémicos, debido a la presencia de genes de resistencia. La diseminación de estos genes puede ocurrir por medio de la transferencia horizontal de material genético, por medio de la conjugación, transducción o transformación bacteriana. Esto ha permitido el desarrollo de resistencia a múltiples antimicrobianos, dificultando el tratamiento de las infecciones causadas por este género de bacterias (Calderón & Aguilar, 2016; Lirola et al., 2022; Ochman et al., 2000).

Actualmente, el ámbito hospitalario constituye un elemento crítico que agrava la problemática de la RAM en bacterias, en donde factores como el uso generalizado de antimicrobianos en pacientes inmunocomprometidos y en unidades de cuidados intensivos hospitalarios (UCI), implementación creciente de dispositivos médicos invasivos (ventiladores, catéteres, vías intravenosas periféricas y sondas uretrales) y la presencia de infecciones cruzadas, puede ocasionar el desarrollo de infecciones causadas por bacterias resistentes asociadas a la atención en salud (Yanet et al, 2017). Otros factores como el lavado inadecuado de manos, falta de medidas en el aislamiento del paciente, control en el ingreso de personal a áreas críticas (UCI, cirugía, salas de hospitalización) y uso prolongado de guantes, mascarillas y batas, también contribuyen al incremento de esta problemática (Martín et al, 2023). Con base en los factores anteriormente mencionados, se han reducido las posibilidades de un tratamiento antimicrobiano eficaz, incrementando el tiempo de hospitalización de los pacientes, y por ende el aumento del riesgo de morbilidad y de los costos directos o indirectos para el establecimiento de salud, paciente y entorno familiar, este último por el uso de antimicrobianos de segunda y tercera generación (Hernández-Gómez et al, 2014).

En Ecuador, el primer aislamiento de enterobacterias con resistencia antimicrobiana a nivel hospitalario data del año 2010 en la ciudad de Azogues, con la identificación de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas; una enzima que impide la acción de los antimicrobianos de tipo carbapenémicos. Tras este caso, también se han descrito otras bacterias multirresistentes como *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterobacter cloacae*. Los genes de resistencia presentes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 y OXA-486) están involucrados en la producción de carbapenemasas y β -lactamasas clase D (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2018). Existen otros estudios moleculares efectuados en Ecuador en donde se muestran datos sobre los genes de mayor circulación a nivel hospitalario. En el 2017, el gen *bla_{NDM}* fue descrito en *K. pneumoniae* ST 147 con plásmido del grupo IncA/C, identificado en un paciente HIV positivo en Esmeraldas, con triple terapia de fosfomicina, meropenem y colistina (Romero et al, 2017). Un estudio previo sobre *K. pneumoniae* productora de KPC en un centro hospitalario de tercer nivel en la ciudad de Quito, estableció que la variante del gen *bla_{KPC}* de mayor frecuencia fue el tipo 5 (*bla_{KPC}-5*) (Prado et al, 2019). En la enterobacteria *E. coli*, se reportó el gen BLEE en infecciones del tracto urinario (ITU) en pacientes pediátricos en un hospital de tercer nivel de Quito con tratamiento con nitrofurantoína y fosfomicina (Garrido et al, 2017). Otro caso de *E. coli* BLEE fue reportado en una infección sistémica, identificándose varios clones (ST131, ST10, ST23, ST14) que contenían los genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM}* y *bla_{SHV}* (Zurita et al, 2019).

Se reportó la presencia del gen *bla_{NDM}* en la bacteria *Acinetobacter baumannii* ST32, la cual fue encontrada en un paciente extranjero con complicaciones cardíacas ingresado en el Hospital de Los Valles. Se concluyó que el ingreso en UCI y el uso de antibióticos de amplio espectro fueron factores de riesgo para la mencionada contaminación bacteriana (Villacís, 2019). Por otro lado, en 2020 se reportó la presencia del gen OXA-48 en la cepa ST307 de *Klebsiella pneumoniae* del Hospital Eugenio Espejo de Quito. El paciente era un ciudadano extranjero que había venido previamente de un hospital ucraniano. El plásmido que contenía el gen *bla_{OXA-48}* se analizó secuenciando el genoma completo y se determinó que correspondía al plásmido IncL/M (pOXA-48) (Villacís et al., 2020).

Los estudios anteriormente descritos enfatizan la continua vigilancia epidemiológica mediante el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual constituye una metodología relativamente rápida que puede proporcionar resultados en cuestión de horas, pero requiere de un conocimiento previo de la secuencia objetivo y puede pasar por alto variantes nuevas o desconocidas del gen (Comas et al., 2020; Garza-Ramos et al., 2019, Trujillo et al., 2022). Actualmente en el Ecuador, no existen estudios que se basen en la utilización de otras metodologías moleculares como la secuenciación de tercera generación mediante la tecnología Oxford Nano Pore (Oxford Nanopore Technologies, 2008), que permita secuenciar el genoma completo bacteriano para detectar y caracterizar todas sus variaciones genéticas asociadas a mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos.

El análisis del resistoma constituye un factor clave que permite predecir el riesgo de que determinadas bacterias con genes de resistencia se expandan ante un tratamiento antibiótico inicial, provocando a posteriori una infección de difícil tratamiento. Por tal motivo, es necesario reforzar la vigilancia epidemiológica a nivel hospitalario para desarrollar políticas y medidas de control que permitan reducir los riesgos clínicos por el uso indiscriminado de antibióticos, principal causa de la RAM en el ámbito hospitalario (Yanet et al, 2017).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue conocer los determinantes genéticos implicados en la RAM en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae captados durante el año 2022 en Hospital General Docente de Calderón de Quito a través de la secuenciación de tercera generación con el dispositivo MinION, con lo que se detectó e identificó precisamente las variantes de los genes de resistencia a antimicrobianos que con mayor frecuencia se encontraban circulando en esta casa de salud en ese período de tiempo.

De acuerdo a la información recopilada se pudo corroborar o refutar la hipótesis planteada de que el gen de resistencia bacteriano *bla*_{KPC} tiene mayor propagación y tasa de resistencia sobre otros genes que codifican carbapenemasas (*bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{OXA}) y betalactamasas de espectro extendido (BLEE, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM}), contribuyendo de esta manera a comprender, detectar y controlar la RAM con la consecuente generación de estrategias de vigilancia epidemiológica adecuadas, además de una optimización y personalización del tratamiento antimicrobiano.

2. Materiales y Métodos

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo y transversal, a partir de la colección de 10 aislados de la familia Enterobacteriaceae que presentaron algún fenotipo de resistencia detectados a través del sistema automatizado VITEK® 2 Compact. Estos aislamientos se obtuvieron durante el periodo 2022 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador, como se detalla en la Tabla 1. Es importante señalar que estos aislados no se extrajeron directamente de los pacientes, por lo que no se requirió un formulario de consentimiento informado firmado ni la aprobación de un Comité Ético de Investigación Humana (CEIH). Sin embargo, el estudio fue aprobado por la Dirección de Investigación del Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador.

Tabla 1. Aislados de la familia Enterobacteriaceae captados por el área de microbiología del HGDC durante el año 2022.

| CÓDIGO | AÑO | MICROORGANISMO | TIPO DE MUESTRA | FENOTIPO DE RESISTENCIA PREVIAMENTE CARACTERIZADO |
|-------------|------|------------------------------|-----------------|---|
| 2022-KPN-4 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | sangre | <i>bla</i> * _{KPC} |
| 2022-KPN-7 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | |
| 2022-KPN-5 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | orina | <i>bla</i> _{KPC} |
| 2022-KPN-12 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | <i>bla</i> _{OXA-48} |
| 2022-KPN-1 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | hisopado rectal | <i>bla</i> _{KPC} |
| 2022-KPN-2 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | |
| 2022-KPN-6 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | aspirado | MBL |
| 2022-KPN-8 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | <i>bla</i> _{KPC} |

| | | | |
|-------------|------|------------------------------|----------|
| 2022-KPN-10 | 2022 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | traqueal |
| 2022-KOX-13 | 2022 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | |

*bla: gen que codifica una beta-lactamasa

Este estudio se realizó en dos fases. La primera fase tuvo lugar en el Laboratorio de Microbiología del Hospital General Docente de Calderón, situado en la avenida Capitán Giovanni Calles y la calle Derby en Calderón, provincia de Pichincha, cantón Quito, barrio Sierra Hermosa. Durante esta fase se verificó la viabilidad de los aislados de la colección de la familia Enterobacteriaceae.

2.1. Verificación de la viabilidad de los aislados bacterianos de la familia Enterobacteriaceae:

Los aislados conservados en crioviales de 2 ml con crioperlas de vidrio tratadas con crioprotectores, se colocaron a temperatura ambiente hasta su descongelación. Una vez descongelados, los crioviales se homogenizaron y con un asa de inoculación desechable de 25 uL se tomó una muestra y se sembró por la técnica de agotamiento en medio de cultivo TSA (Agar Triptona – Soja). Los medios fueron incubados por 24 horas. Transcurrido ese tiempo se verificó el crecimiento de las colonias de los diferentes aislados de la familia Enterobacteriaceae en el agar. A continuación, se transfirieron y se conservaron en microtubos de caldo nutritivo LB (Luria Bertani), por 24 horas en la incubadora. Transcurrido ese tiempo los microtubos de caldo nutritivo LB con las colonias fueron centrifugados en microcentrífuga a una velocidad de 10000 rpm por 10 minutos, posterior se desechó el sobrenadante y el precipitado se conservó congelado a -20 °C por 72 horas y finalmente fueron trasladados al laboratorio de la UISEK.

La segunda fase tuvo lugar en el laboratorio de investigación de la Universidad Internacional SEK, situado en el campus Miguel de Cervantes, calle Alberto Einstein (S/N) y 5ª Transversal en Carcelén, provincia de Pichincha, cantón Quito. En esta fase se realizó la extracción, la cuantificación de ADN y el análisis molecular de los aislados bacterianos viables.

2.2. Extracción de ADN bacteriano total

La extracción de ADN bacteriano se realizó utilizando el Protocolo Rápido FB022 del Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard para bacterias gramnegativas. Al microtubo con bacterias se agregó 600 µL de la solución de lisis de núcleos. Se incubó a 80°C por 5 minutos y se enfrió a temperatura ambiente. A continuación, se agregó 3 µL de solución de ARNasa, se mezcló y se incubó a 37°C durante 15 a 60 minutos, tras lo cual se enfrió a temperatura ambiente. Para precipitar las proteínas, se agregó 200 µL de solución de precipitación de proteínas y se llevó al vortex. Posteriormente se incubó en hielo durante 5 minutos y se centrifugó a 13000–16000 × gramo por 3 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio con 600 µL de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó nuevamente. Se decantó el sobrenadante y se añadió 600 µL de etanol al 70 % a temperatura ambiente. Se mezcló y se centrifugó por 2 minutos a 13000–16000 × gramo. Se aspiró el etanol y el sedimento se secó al aire durante 10 a 15 minutos y se almacenó congelado a -20 °C.

2.3. Cuantificación de ADN bacteriano total

Se utilizó el fluorómetro Qubit con el kit de ensayo dsADN BR (ThermoFisher Scientific) para realizar el análisis. Las muestras almacenadas se descongelaron a temperatura ambiente y se agitaron brevemente en vortex para garantizar una homogeneización adecuada antes de la cuantificación. Previamente, los reactivos del kit estaban a temperatura ambiente y se mezcló el reactivo de trabajo del kit dsDNA BR según las instrucciones del fabricante. A continuación, se prepararon los estándares y las muestras siguiendo las instrucciones del kit. Se transfirió 190 µL de reactivo de trabajo a los tubos de muestra limpios y se agregó 10 µL de cada muestra o estándar en los tubos correspondientes. Las muestras y los estándares se mezclaron suavemente por inversión o por vortex a baja velocidad. Se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 2 minutos y se realizó la lectura según las instrucciones del fabricante.

La concentración de ADN de cada muestra era superior al límite de detección del fluorómetro, por lo que se debió realizar las diluciones correspondientes para poder cuantificarlas. Los primeros resultados se obtuvieron en las siguientes unidades ng/0,02mL ya posterior se realizó la conversión a ng/uL y se multiplicaron por su factor de dilución, obteniéndose los valores de concentración total de ADN bacteriano de cada muestra como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Concentración total de ADN bacteriano de cada aislado de la familia Enterobacteriaceae captados por el área de microbiología del HGDC durante el año 2022.

| CÓDIGO | MICROORGANISMO | FENOTIPO DE RESISTENCIA | TIPO DE MUESTRA | [DNA] (ng/0,02mL) | [DNA] (ng/uL) | [DNA](ng/uL) x FD* (4) |
|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|---------------|------------------------|
| 2022-KPN-4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> * _{KPC} | sangre | 51,1 | 10,22 | 40,88 |
| 2022-KPN-7 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 510 | 102 | 408 |
| 2022-KPN-5 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | orina | 290 | 58 | 232 |
| 2022-KPN-12 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{OXA-48} | | 229 | 45,8 | 183,2 |
| 2022-KPN-1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | hisopado rectal | 444 | 88,8 | 355,2 |
| 2022-KPN-2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 228 | 45,6 | 182,4 |
| 2022-KPN-6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL | aspirado traqueal | 442 | 88,4 | 353,6 |
| 2022-KPN-8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 237 | 47,4 | 189,6 |
| 2022-KPN-10 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 339 | 67,8 | 271,2 |
| 2022-KOX-13 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 530 | 106 | 424 |

*bla: gen que codifica una beta-lactamasa

*[DNA] concentración de ADN

*FD: factor de dilución.

2.4. Preparación de la Librería Genómica:

- 2.4.1. *Agrupación de muestras para generar los códigos de barras:* Las muestras se clasificaron según el año de almacenamiento, el género del microorganismo, el fenotipo de resistencia y el tipo de muestra: sangre, orina, hisopos rectales y secreciones traqueales. Fue así como se obtuvieron 4 códigos de barras para los 10 aislados bacterianos, designados con los números 5, 6, 7 y 8 como se observa en la tabla 3.
- 2.4.2. *Concentración de ADN para preparar las librerías:* la cantidad de ADN genómico de alto peso molecular que se requiere para el Kit de Codificación de Barras (Rapid Barcoding - SQK-RBK004) es de ~400 ng, fue así como se seleccionó a las muestras con mayor concentración de cada código de barras para diluirlas, realizar los cálculos correspondientes y obtener la concentración requerida por cada código de barra como se observa en la tabla 3 y mismas que oscilan entre los 337,9 a 386,7 ng.

Tabla 3. Concentración total de ADN bacteriano de cada aislado de la familia Enterobacteriaceae captados por el área de microbiología del HGDC durante el año 2022 para cada código de barra.

| CODIGO/AÑO | MICROORGANISMO | FENOTIPO DE RESISTENCIA | TIPO DE MUESTRA | [DNA] (ng/uL) | BC | VOL. DNA (uL) | VOL. AGUA (uL) | FD | [ADN FINAL] (ug/uL) | [ADN]/BC |
|-------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|---------------|------|---------------|----------------|-----|------------------------|--|
| 2022-KPN-4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> * _{KPC} | sangre | 40,9 | BC 5 | 10 | 10 | 2 | 40,9 | 367,6 ng/5uL (4uL de KPN-4 + 1uL de KPN-7) |
| 2022-KPN-7 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 408 | | | | | 10 | 10 |
| 2022-KPN-5 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | orina | 232 | BC 6 | 5 | 10 | 1,5 | 154,7 | 337,9 ng/2uL (1uL/ADN) |
| 2022-KPN-12 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{OXA-48} | | 183,2 | | | | | 183,2 | |
| 2022-KPN-1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | hisopado rectal | 355,2 | BC 7 | 10 | 10 | 2 | 177,6 | 386,7 ng/3uL (1uL/ADN) |
| 2022-KPN-2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 182,4 | | | | | 91,2 | |
| 2022-KPN-6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL | aspirado traqueal | 353,6 | BC 8 | 10 | 20 | 3 | 117,9 | |
| 2022-KPN-8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 189,6 | | | | | 94,8 | |
| 2022-KPN-10 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | 271,2 | 135,6 | | | | | 371,7 ng/3uL (1uL/ADN) | |
| 2022-KOX-13 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | 424 | | 10 | 20 | 3 | 141,3 | |

*bla: gen que codifica una beta-lactamasa

*[ADN final] concentración final de ADN

*FD: factor de dilución.

2.4.3. *Ajuste de volumen final para preparación de la biblioteca:* Tras obtener las cantidades finales de ADN para cada código de barras, que fueron 244,9 ng para el código de barras 5; 337,9 ng para el código de barras 6; 386,7 ng para el código de barras 7 y 371,7 ng para el código de barras 8, se ajustó el volumen de cada código de barras a 7,5 µl utilizando agua libre de nucleasas como se observa en la tabla 4.

Tabla 4. Ajuste de volumen final para cada código de barras de los aislados de la familia Enterobacteriaceae captados por el área de microbiología del HGDC durante el año 2022.

| CODIGO/ANO | MICROORGANISMO | FENOTIPO DE RESISTENCIA | TIPO DE MUESTRA | BC* | [ADN]/BC (ng/uL) | VOL. ADN | VOL. AGUA LIBRE DE NUCLEASAS | AJUSTE VOL. FINAL |
|-------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------|-----|------------------|----------|------------------------------|-------------------|
| | | | | | | (uL) | (uL) | (uL) |
| 2022-KPN-4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla*_{KPC}</i> | sangre | BC | 367,6 | 5 | 2,5 | 7,5 |
| 2022-KPN-7 | | | | 5 | | | | |
| 2022-KPN-5 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla_{KPC}</i> | orina | BC | 337,9 | 2 | 5,5 | 7,5 |
| 2022-KPN-12 | | <i>bla_{OXA-48}</i> | | 6 | | | | |
| 2022-KPN-1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla_{KPC}</i> | hisopado | BC | 386,7 | 3 | 4,5 | 7,5 |
| 2022-KPN-2 | | | rectal | 7 | | | | |
| 2022-KPN-6 | | MBL | | | | | | |
| 2022-KPN-8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla_{KPC}</i> | aspirado | BC | 371,7 | 3 | 4,5 | 7,5 |
| 2022-KPN-10 | | | traqueal | 8 | | | | |
| 2022-KOX-13 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | | | | | | |

*bla: gen que codifica una beta-lactamasa

*BC: código de barras

2.4.4. *Codificación de Barras (Rapid Barcoding - SQK-RBK004)*: Los reactivos del kit se descongelaron a temperatura ambiente, se centrifugaron en una microcentrifuga y se mezclaron según las instrucciones del fabricante. Se mezclaron 7,5 µL de cada código de barras con ~400 ng de ADN molde y 2,5 µL de cada mezcla de fragmentación RB01 a RB12, lo que dió como resultado un volumen final de 10 µL por cada código de barras. Las muestras se homogenizaron y se incubaron a 30°C durante 1 minuto, seguido de 80°C durante 1 minuto, y luego se enfriaron en hielo. A continuación, se combinaron todas las muestras en un tubo Eppendorf. Se resuspendieron las perlas de AMPure y se añadieron al tubo, se mezclaron y se incubaron durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se colocó la muestra en un rack magnético para que las perlas sedimentaran, y se pipeteó el sobrenadante. Las perlas se lavaron dos veces con etanol al 70% recién preparado, y luego se dejaron secar. Posteriormente, retiramos el tubo del rack magnético y se resuspendió el sedimento con 10 uL de Tris-HCl, incubándolo durante 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se colocó el tubo en el rack magnético hasta que el sobrenadante se tornó incoloro y transparente. Por último, se extrajo y se conservó 10 uL del eluido en un nuevo tubo Eppendorf. A este tubo se agregó 1 uL de RAP, se homogenizó suavemente y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente.

2.4.5. *Cebado y carga de la celda de flujo*: se descongelaron, homogenizaron y centrifugaron, el tampón de secuenciación (SQB), las perlas de carga (LB), el Flush Teather (FLT) y el Flush Buffer (FB) a temperatura ambiente. Inmediatamente, se preparó la mezcla de cebado con 30 uL de FLT en el tubo de FB y se mezcló en vórtex. Se retiró la tapa del dispositivo MinION y se colocó la celda de flujo, se verificó el estado y funcionalidad de su hardware mediante el software MinKNOW GUI (versión 5.0.5). A continuación, se retiró un pequeño volumen de tampón del puerto de cebado para eliminar burbujas y seguidamente se cargó 800 uL de la mezcla de cebado en la celda de flujo evitando burbujas, se esperó 5 minutos y en ese lapso se preparó ~ 75 uL de la biblioteca con 34 uL de SQB, 25.5 ul de LB, 4.5 uL de agua libre de nucleasas y 11 uL de la biblioteca de ADN. Se levantó la cubierta del puerto de muestras y previamente se cargó 200 uL de la mezcla de cebado en el puerto de cebado de la celda de flujo. Antes de cargar la biblioteca esta se homogenizó suavemente y se inoculó 75 uL en el puerto de muestras, se colocó nuevamente las cubiertas y la tapa del dispositivo.

2.5. *Secuenciación usando la Tecnología Oxford Nanopore, obtención y analisis de resultados mediante el uso de la Plataforma EPI2ME.*

Una vez iniciada la secuenciación, se inició el proceso de adquisición de datos y el proceso basecalling a través del software MinKNOW. Las lecturas procesadas en tiempo real por 72 horas se obtuvieron en formato FASTQ que posteriormente fueron analizadas por el programa EPI2ME versión 5.1.9. de la Oxford Nanopore Technologies (ONT) sin ninguna modificación. El protocolo usado fue Fastq Resistencia a los Antimicrobianos versión v2023.04.26-1808834, que permitió la identificación y cuantificación de especies (What's in my pot), así como la detección de genes de resistencia a los antimicrobianos comparando las secuencias con la Base de Datos Integral de Resistencia a los Antibióticos (CARD versión 1.1.3)

3. Resultados

3.1. Librerías genómicas de los aislados bacterianos.

Los 10 aislados bacterianos de la familia Enterobacteriaceae pertenecientes a la colección de microorganismos del Hospital General Docente de Calderón del año 2022 fueron agrupados en 4 códigos de barra (BC) designados con los números 5, 6, 7 y 8 respectivamente como se muestra en la tabla 1. El tipo de muestra de la cual fue aislado el microorganismo se usó únicamente para facilitar la clasificación de los códigos de barra mencionados anteriormente, sin más relevancia en este estudio.

Tabla 1. Clasificación de los códigos de barra para los 10 aislados bacterianos de la familia Enterobacteriaceae en el año 2022.

| CÓDIGO | TIPO DE MUESTRA | MICROORGANISMO | FENOTIPO DE RESISTENCIA* | NÚMERO DE MUESTRAS | ID* CB* |
|-------------|-------------------|------------------------------|--------------------------|--------------------|---------|
| 2022-KPN-4 | sangre | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> *KPC | 2 | BC 5 |
| 2022-KPN-7 | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | |
| 2022-KPN-5 | orina | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> KPC | 2 | BC 6 |
| 2022-KPN-12 | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> OXA-48 | | |
| 2022-KPN-1 | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> KPC | | |
| 2022-KPN-2 | hisopado rectal | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | 3 | BC 7 |
| 2022-KPN-6 | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL | | |
| 2022-KPN-8 | aspirado traqueal | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | 3 | BC 8 |
| 2022-KPN-10 | | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> KPC | | |
| 2022-KOX-13 | | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | | |

*

FENOTIPO DE RESISTENCIA: previamente caracterizado por medios convencionales.

* ID: Identificación de código de barras.

* BC: Código de Barras

3.2. Calidad del ADN extraído y de la secuenciación de los aislados bacterianos.

La información que nos proporcionó la secuenciación para los 12 códigos de barras nos mostró que se procesaron 3103 lecturas, lo que dio como resultado un total de 14,5 Mbases, presentó un nivel de calidad de 8,55 y la longitud media de todas las lecturas fue de 4.956 pares de bases.

El análisis del control de calidad (QC) nos proporcionó una visión completa del rendimiento de los códigos de barra usados en el proceso de secuenciación, así como de las diferencias en el número de las lecturas, el nivel de calidad de ADN y la longitud de las secuencias para este grupo de códigos de barras.

El BC7 presentó el menor número de lecturas procesadas con un valor de 91 lecturas con respecto al BC8 con 216 lecturas procesadas, el BC5 con 362 lecturas procesadas y el BC6 con 364 lecturas procesadas. En particular, considerando que se trataba de una secuenciación de genoma completo (WGS) el número de lecturas procesadas para todos los códigos de barra fue bajo.

En cuanto al nivel de calidad de ADN, el BC7 presentó un q-score de 8.8 con respecto al BC8 con 8,99, el BC5 con 9,3 y el BC6 con 9,47. El nivel de calidad promedio fue un q-score de 9,14 para todos los códigos, este valor nos indicó que la calidad de las secuencias obtenidas fue razonablemente buena.

Con respecto a la longitud promedio de secuencias procesadas se observó una variabilidad significativa entre el BC7 que presentó la longitud promedio más baja con 2394 pb en comparación con el BC8 con 5311 pb, el BC5 con 7306 pb y el BC6 con 7631 pb, siendo estos dos últimos los que presentaron las longitudes promedio más altas. En cuanto a la longitud total de secuencias, el BC7 conformado por 3 aislados bacterianos presentó la longitud total de secuencia más baja con 217,9 Kbases, con respecto al BC 8 conformado por 3 aislados con una longitud total de secuencia de 1,1 Mbases, el BC5 y BC6 conformados por 2 aislados bacterianos respectivamente presentaron una longitud total de secuencia de 2,8 Mbases, las longitudes totales más altas destacando diferencias significativas entre cada código de barras como se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Análisis de la calidad de las secuencias obtenidas a través de la tecnología Oxford Nanopore de los aislados bacterianos de la familia Enterobacteriaceae en el año 2022.

| CÓDIGO | MICROORGANISMO | FENOTIPO DE RESISTENCIA* | [DNA] (ng/uL) | ID* BC* | QC* | | | |
|-------------|------------------------------|------------------------------|---------------|---------|----------------------|------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| | | | | | LECTURAS POR ID ONT* | NIVEL DE CALIDAD | LONGITUD MEDIA DE SECUENCIAS S (pb) | LONGITUD TOTAL DE SECUENCIAS |
| 2022-KPN-4 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} * | 367,6 | BC 5 | 362 | 9,3 | 7603 | 2,8 Mbases |
| 2022-KPN-7 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | | | | | |
| 2022-KPN-5 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | 337,9 | BC 6 | 364 | 9,47 | 7631 | 2,8 Mbases |
| 2022-KPN-12 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{OXA-48} | | | | | | |
| 2022-KPN-1 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | | | | | | |
| 2022-KPN-2 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | 386,7 | BC 7 | 91 | 8,8 | 2394 | 217,9 Kbases |
| 2022-KPN-6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | MBL | | | | | | |
| 2022-KPN-8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | | | | | | |
| 2022-KPN-10 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} | 371,7 | BC 8 | 216 | 8,99 | 5311 | 1,1 Mbases |
| 2022-KOX-13 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | | | | | | | |

*FENOTIPO DE RESISTENCIA: previamente caracterizado por medios convencionales.

* ID: Identificación de código de barras.

* BC: Código de Barras

* QC: Nivel de calidad

*ONT: Tecnología Oxford Nanopore

3.3. Identificación taxonómica de los aislados bacterianos.

La herramienta What's in my pot (WIMP) de EPI2ME realizó la clasificación taxonómica de las secuencias generadas de los aislados bacterianos que componen cada código de barras durante la secuenciación. Esto lo realizó al filtrar los archivos FASTQ con una calidad suficiente de q-score 8.8 o superior y las comparó con una base de datos estándar que incluye genomas completos RefSeq del NCBI para bacterias, virus, hongos y arqueas.

La identificación a nivel de especie realizada con WIMP, para los códigos de barra 5, 6, 7 y 8 confirmó la presencia de bacterias del género *Klebsiella* validando así las identificaciones fenotípicas que se tenían previamente de los aislados bacterianos de la colección del Hospital General Docente Calderón en el año 2022.

En los cuatro códigos de barras analizados en este estudio, se observó una variabilidad en el número de lectura y asignaciones taxonómicas. El BC7 tuvo el menor número de lecturas, con un valor de 91. De estas lecturas, el 59% (equivalente a 54 lecturas) se asignaron a un taxón, y de ellas, 13 se asignaron al género *Klebsiella*. EL BC8 tuvo 216 lecturas, con un 87% (188 lecturas) asignadas a un taxón, y de éstas, 143 se asignaron al género *Klebsiella*. El BC5 tuvo 362 lecturas, con un 85% (308 lecturas) asignadas a un taxón, y de éstas, 213 fueron asignadas al género *Klebsiella* y finalmente el BC6 tuvo 364 lecturas, con un 88% (322 lecturas) asignadas a un taxón, y de éstas, 178 fueron asignadas al género *Klebsiella*, siendo estas dos últimas las lecturas que mostraron el porcentaje más alto de asignaciones taxonómicas para el género *Klebsiella* tal y como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Identificación taxonómica en contraste con la identificación fenotípica de los aislados bacterianos pertenecientes al Hospital General Docente de Calderón en el año 2022.

| ID* BC* | MICROORGANISMO IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA | NÚMERO DE MUESTRAS/BC | MICROORGANISMO IDENTIFICACIÓN MOLECULAR | LECTURAS POR ID | SECUENCIAS CLASIFICADAS | LECTURAS |
|------------|--|--------------------------|---|--------------------|----------------------------|--|
| | | | | | | ASIGNADAS AL GÉNERO <i>Klebsiella</i> |
| BC 5 | <i>Klebsiella</i> | 2 | <i>Klebsiella</i> | 362 | 308 (85%) | 213 |
| BC 6 | <i>Klebsiella</i> | 2 | <i>Klebsiella</i> | 364 | 322 (88%) | 178 |
| BC 7 | <i>Klebsiella</i> | 3 | <i>Klebsiella</i> | 91 | 54 (59%) | 13 |
| BC 8 | <i>Klebsiella</i> | 3 | <i>Klebsiella</i> | 216 | 188 (87%) | 143 |

* ID: Identificación de código de barras.

* BC: Código de Barras

3.4. Análisis de genes de resistencia en los aislados bacterianos.

La Detección de los genes de resistencia antimicrobiana se realizó mediante la herramienta ARM Alignment del programa EPI2ME. Esta herramienta alineó las lecturas de entrada con todas las secuencias de referencia disponibles en la Base de Datos Integral de Resistencia a los Antibióticos (CARD) y proporcionó información en tiempo real sobre la cobertura encontrada para cada gen, así como su resistencia a los antibióticos, destacando el número de lecturas alineadas y la precisión media de la detección para cada código de barras.

Para este grupo de códigos de barras se encontró la siguiente información detallada en la tabla 4, el BC5 presentó un total de 308 lecturas analizadas de las cuales 15 lecturas se alinearon con 12 genes de resistencia, con una precisión media de 83.6 %. El BC6 presentó un total de 322 lecturas analizadas de las cuales 21 lecturas se alinearon con 16 genes de resistencia, con una precisión media de 85.3 %. El BC7 presentó un total de 57 lecturas analizadas de las cuales 1 lectura se alineó con 1 gen de resistencia, con una precisión media de 82 % y finalmente el BC8 presentó un total de 188 lecturas analizadas de las cuales 13 lecturas se alinearon con 1 gen de resistencia, con una precisión media de 84.1 %. En general la precisión media de la detección fue de 83.8 % para todos los códigos de barra.

Tabla 4. Resumen del número total de lecturas que se han alineado correctamente con una secuencia de resistencia en la base de datos CARD.

| ID* | MICROORGANISMO | FENOTIPO DE RESISTENCIA CARACTERIZADO | LECTURAS ANALIZADAS | ALINEAMIENTOS | PRESICIÓN MEDIA (%) | GENES EN CARD* |
|------|--|---|---------------------|---------------|---------------------|----------------|
| BC 5 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> * _{KPC} | 308 | 15 | 83.6 | 12 |
| BC 6 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} <i>bla</i> _{OXA-48} | 322 | 21 | 85.3 | 16 |
| BC 7 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>bla</i> _{KPC} MBL | 54 | 1 | 82 | 1 |
| BC 8 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>bla</i> _{KPC} | 188 | 13 | 84.1 | 1 |

* ID: Identificación de código de barras.

* BC: Código de Barras.

* CARD: Base de Datos Integral de Resistencia a los Antibióticos

Los genes identificados con mayor relevancia clínica en los códigos de barras 5, 6, 7 y 8 de los aislados de la familia Enterobacteriaceae mediante la secuenciación ONT, fueron *bla*_{TEM-4}, *Oqx*B, *bla*_{OXA-181}, *bla*_{OXA-1}, *aph*(3')-Ia, *qnr*S1, *qnr*B5, *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3}. Estos genes están asociados a la resistencia a antibióticos betalactámicos como penicilinas, cefalosporinas, carbapenems y monobactámicos, así como a antibióticos no betalactámicos como macrólidos, aminoglucósidos, quinolonas y tetraciclinas como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Resumen del número total de lecturas que se han alineado correctamente con una secuencia de resistencia en la base de datos CARD.

| ID* | FENOTIPO DE RESISTENCIA | GENES DETECTADOS CON ONT* | ALINEAMIENTOS | COBERTURA GENÉTICA (%) | DISTRIBUCIÓN DE LA PRESICIÓN (%) | RESISTENCIA |
|------|----------------------------------|-------------------------------|---------------|------------------------|----------------------------------|------------------|
| BC 5 | <i>bla</i> _{KPC} | <i>bla</i> _{TEM-4} | 1 | 99,5 | 94,1 | betalactámicos |
| | | OqxB | 1 | 99,8 | 85 | fluoroquinolonas |
| BC 6 | <i>bla</i> _{KPC} | <i>bla</i> _{OXA-181} | 2 | 99,8 | 91,5 | betalactámicos |
| | | <i>bla</i> _{OXA-1} | 1 | 66,4 | 92,6 | betalactámicos |
| | | <i>aph</i> (3')-Ia | 1 | 99,8 | 92,9 | aminoglucósidos |
| | | <i>qnr</i> S1 | 1 | 99,8 | 91,1 | fluoroquinolonas |
| BC 7 | <i>bla</i> _{KPC} MBL | <i>qnr</i> B5 | 1 | 97.9 | 82 | fluoroquinolonas |
| BC8 | <i>bla</i> _{KPC} | <i>bla</i> _{KPC-3} | 1 | 99,7 | 88,3 | betalactámicos |
| | | <i>bla</i> _{KPC-2} | 1 | 99,7 | 89,3 | betalactámicos |

* ID: Identificación de código de barras.

* BC: Código de Barras.

* ONT: Tecnología Oxford Nanopore

El BC5 presentó 2 genes de resistencia. El primero, el gen *bla*_{TEM-4} responsable de la resistencia a los betalactámicos. Este gen presentó 1 alineamiento con una precisión del 94.1 % (valor que mostró que tan buena es la alineación de las lecturas de este gen) y una cobertura genética del 99.5 % lo que sugiere una cobertura casi completa del gen en contraste con la secuencia del gen de referencia. El segundo, el gen *oqx*B responsable de la resistencia a las fluoroquinolonas presentó 1 alineamiento con una precisión del 85 % y una cobertura genética del 99.8 % lo que sugiere una cobertura casi completa del gen en contraste con la secuencia del gen de referencia. Los genes determinados para este código de barras no coincidieron con el fenotipo de resistencia caracterizado previamente, que implicaba la presencia del gen *bla*_{KPC}.

El BC6 presentó 4 genes de resistencia, el gen *bla*_{OXA} con sus variantes OXA-181 y OXA-1 responsables de la resistencia a los betalactámicos. La primera variante presentó 2 alineamientos con una precisión del 91,5 % y una cobertura de 99.8 %, mientras que la segunda variante presentó 1 alineamiento con una precisión del 92.6 % y una cobertura de 66.4 % en contraste con la secuencia de sus genes de referencia. El gen *aph*(3)-Ia responsable de la resistencia a los aminoglucósidos presentó 1 alineamiento con una precisión del 92,9 % y una cobertura genética del 99.8 % en contraste con la secuencia del gen de referencia y finalmente el gen *qnr*S1 responsable de la resistencia a las fluoroquinolonas, presentó 1 alineamiento con una precisión del 91.1 % y una cobertura genética del 99.8 % en contraste con la secuencia del gen de referencia. Los genes determinados para este código de barras coinciden en un 50 % con el fenotipo de resistencia caracterizado previamente del gen *bla*_{OXA}; pero no implicaba la presencia del gen *bla*_{KPC}.

El BC7 presentó 1 gen de resistencia, el gen *qnr*B5 responsable de la resistencia a las fluoroquinolonas que presentó 1 alineamiento con una precisión del 82 % y una cobertura genética del 97.9 % en contraste con la secuencia del gen de referencias. El gen determinado para este código de barras no coincidió con los fenotipos de resistencia caracterizados previamente y que implicaban la presencia de los genes *bla*_{KPC} y MBL.

El BC8 presentó 2 genes de resistencia. El gen *bla*_{KPC} con sus variantes KPC-2 y KPC-3 responsables de la resistencia a los betalactámicos. La primera variante presentó 1 alineamiento con una precisión del 89,3 % y una cobertura de 99.7 %, mientras que la segunda variante presentó 1 alineamiento con una precisión del 88,3 % y una cobertura de 99,7 % en contraste con la secuencia de sus genes de referencia. Los genes determinados para este código de barras coincidieron con el fenotipo de resistencia caracterizado previamente en un 100% con la presencia del gen *bla*_{KPC}.

4. Discusiones

En particular, teniendo en cuenta que se trataba de una secuenciación de genoma completo, el número de lecturas para todos los códigos de barra fue bajo y considerando que la cantidad del ADN estuvo dentro de límites aceptables, la razón por la que se obtuvieron bajas lecturas fue posiblemente por inconvenientes relacionados con el almacenamiento, la manipulación, preparación y carga de la librería en el secuenciador.

Según las especificaciones técnicas del kit de secuenciación rápida SQK-RBK004, es fundamental garantizar que la entrada de ADN cumpla con la cantidad y calidad requeridos para evitar un impacto perjudicial tanto en la preparación de la biblioteca como en la precisión de la secuenciación. Es así como el método de extracción de ADN debe proporcionar la pureza e integridad requerida, por lo que se destaca que cantidades insuficientes o excesivas de ADN, así como ADN de calidad inferior que incluya ADN muy fragmentado, ADN con ARN o impurezas químicas podrían generar bajas lecturas. Ya en la preparación de la biblioteca, lo que también pudo influir podría ser la baja recuperación de ADN tras la limpieza con las microesferas AMPure que podrían haberse encontrado en baja proporción; esto considerando que estas perlas sedimentan rápidamente por lo que es necesario resuspenderlas bien antes de añadirlas a la muestra. Otro punto para tomar en cuenta es en la fase de lavado, donde el ADN se eluyó de las perlas usando etanol al 70 %, probablemente no se recuperó el ADN suficiente ya que el etanol podría haber variado en sus características químicas y haber cambiado su concentración. La presencia de microburbujas durante el proceso de carga del buffer o de la biblioteca también pudo afectar potencialmente los resultados de la secuenciación al causar saturación o daño a los poros dentro de la celda de flujo. Para evitar este tipo de inconveniente es sumamente importante tomar en cuenta las condiciones de almacenamiento del kit. La humedad, los cambios de temperatura, la exposición a la luz y el tiempo de almacenamiento pueden comprometer la estabilidad y degradar los reactivos, las enzimas y los adaptadores comprometiendo la calidad de la secuenciación.

De igual manera es crucial poner atención a las instrucciones de uso que se proporcionan en los kits, ya que en ellos se define la correcta manipulación de los reactivos, enzimas y adaptadores para cada paso de la extracción de ADN, la preparación de la biblioteca y su secuenciación.

La variedad de genes de resistencia a los antibióticos detectada mediante la secuenciación de tercera generación en estos grupos de códigos de barras difiere en su mayoría de la identificación fenotípica que presentaban los aislados bacterianos pertenecientes al género *Klebsiella* de la colección con la presencia del gen *bla*_{KPC}. Aquí hay que considerar que la cantidad de pares de bases necesarios para determinar un gen de resistencia puede variar según la longitud del gen, la calidad de la secuenciación y la cobertura deseada. Es así que en este estudio los genes de resistencia obtenidos para el género *Klebsiella* fueron *bla*_{TEM-4} con una cobertura del 99,5%, *OqxB* con una cobertura del 99,8%, *bla*_{OXA-181} con una cobertura del 99,8%, *bla*_{OXA-1} con una cobertura del 66,4%, *aph(3')-Ia* con una cobertura del 99,8%, *qnrS1* con una cobertura del 99,8%, *qnrB5* con una cobertura del 97,5%, *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} con una cobertura del 99,7% cada uno. Estos genes fueron identificados y caracterizados al lograr una cobertura suficiente para abarcar toda la región relevante de cada gen descrito con sus datos.

Los diversos genes determinados en este estudio para *Klebsiella pneumoniae* principalmente otorgan resistencia a los antibióticos betalactámicos, seguidos por las fluoroquinolonas y finalmente, por los aminoglucósidos. La diseminación de la resistencia a los carbapenémicos en la familia Enterobacteriaceae es actualmente un importante problema de salud pública debido a la amplia distribución de genes de resistencia y a su capacidad de transferencia horizontal. En Ecuador, la *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC ha sido descrita como una de las principales bacterias multirresistentes, responsable de un gran número de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS) en hospitales a nivel nacional (Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2018; Prado-vivar et al., 2019; Tamayo et al., 2022). Las variantes KPC-2 y KPC-3 son responsables de los brotes epidémicos intrahospitalarios, así lo demuestran los estudios previos que se han realizado en el país como el citado por (Tamayo et al., 2022) que indica que Ecuador en el año 2010 dio conocer uno de los primeros casos de resistencia antimicrobiana para *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC-2. También podemos mencionar el estudio realizado por (Reyes et al., 2020) en 2020, donde se caracterizaron los elementos genéticos móviles (plásmidos) en los que se encuentra el gen *bla*_{KPC-2} y otros estudios han descrito 24 alelos del gen *bla*_{KPC}, desde *bla*_{KPC-1} a *bla*_{KPC-24}, diferentes entre sí por 1 a 3 aminoácidos. La variante KPC-2 es la enzima más predominante en el mundo, con brotes informados en USA, Europa y China, mientras que KPC-3 ha sido detectada principalmente en USA, Israel y América Latina (Campoverde et al., 2024). Otro de los genes reportados en estos estudios en Ecuador es el gen OXA-48 en cepas de *Klebsiella pneumoniae*, pero no se encuentra información relevante de las variantes OXA-1 y OXA-181 que codifican para enzimas betalactamasas de clase D, capaces de hidrolizar antibióticos betalactámicos confiriendo resistencia a las penicilinas y cefalosporinas. Un estudio molecular realizado por (Sugumar et al., 2014) mostró una distribución frecuente del gen *bla*_{OXA-1} en *K. pneumoniae* a nivel mundial, excepto en Norteamérica, mientras que las cepas de *K. pneumoniae* portadoras de *bla*_{OXA-181} se encontraron con más frecuencia en países asiáticos. Esta información aumenta la posibilidad de la posible importación de este mecanismo de resistencia. Entre las betalactamasas de localización plasmídicas que se identifican con mayor frecuencia en *K. pneumoniae*, se encuentran las enzimas TEM, hay aproximadamente 150 tipos de BLEEs TEM según (Guzman & Alonso, 2009) lo que corrobora la identificación del gen *bla*_{TEM-4} con una cobertura del 99,5% proporcionando resistencia específica a las cefalosporinas de tercera generación y otras penicilinas.

La presencia del gen *oqxB* confiere resistencia a antibióticos fluoroquinolónicos como la ciprofloxacina y la levofloxacina, en *Klebsiella pneumoniae* ya que codifica para una bomba de eflujo que pertenece a la familia de proteínas RND (Resistencia Nodulosa a Drogas). Actualmente los antibióticos como los aminoglucosidos, los betalactámicos, las quinolonas, la nitrofurantoína, la tigeciclina y la colistina, que tenían un amplio espectro contra *K. pneumoniae* están demostrando ser ineficaces; lo que podría deberse al aumento de la expresión de las bombas de expulsión como lo explica (Bharatham et al., n.d.) en su estudio.

El gen *qnrS1*, confiere un bajo nivel de resistencia a las fluoroquinolonas mediados por plásmidos así lo comenta (Kocsis et al., 2013). Este gen codifica para una proteína que protege el sitio de unión de los antibióticos fluoroquinolónicos a la girasa bacteriana, confiriendo resistencia a la ciprofloxacina, la tetraciclina y el trimetoprim. El gen *qnrB5* se descubrió por primera vez en un aislado de *Klebsiella pneumoniae* de Birmingham, Alabama, EE. UU. Este codifica para la proteína *qnr* que protege el sitio de unión de los antibióticos fluoroquinolónicos, como la ciprofloxacina y la levofloxacina. Un estudio realizado por (Wang et al., 2011) sugiere

que el gen *qnrB* es el que tiene más probabilidades de sufrir mutaciones, y los plásmidos podrían desempeñar un papel crucial en la diseminación y evolución de estos.

De acuerdo la información detallada por (Guzman & Alonso, 2009) en su estudio nos indica que la presencia del gen *aph(3')-Ia* en *Klebsiella pneumonia* codifica la enzima fosfotransferasa, que fosforila los grupos hidroxilo de los aminoglucósidos, modificando químicamente su estructura e impidiendo que se unan a los ribosomas bacterianos y confiriendo resistencia de alto nivel a kanamicina y sensibilidad a tobramicina y gentamicina.

En general la mayoría de los genes determinados en este estudio como el *bla*_{TEM-4}, el *OqxB*, el *bla*_{OXA-181}, el *bla*_{OXA-1}, el *aph(3')-Ia*, el *qnrS1* y el *qnrB5* no presentan estudios previos en en nuestro territorio, a diferencia de las investigaciones que se han realizado en torno a las variantes *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} del del gen *bla*_{KPC}; pero la literatura científica nos indica que se encuentran presentes en el género *Klebsiella* y son transmitidos horizontalmente a través de mecanismos como, la conjugación, la transformación y la transducción (Stokes & Gillings, 2011). Estos mecanismos permiten que los genes se propaguen rápidamente aumentando su diversidad.

Los hallazgos en cuanto a diversidad de genes de resistencia encontrados en este grupo de 10 aislados nos muestra que el gen de resistencia bacteriano *bla*_{KPC} no tiene la mayor propagación y tasa de resistencia sobre otros genes que codifican carbapenemasas (*bla*_{OXA}) y betalactamasas de espectro extendido (*bla*_{TEM}). También se determinó que este grupo de aislados nos muestra genes de resistencia hacia las fluoroquinolonas con los genes, *OqxB*, *qnrS1* y *qnrB5* y resistencia a aminoglucosidos con el gen el *aph(3')-Ia* corroborando la multiresistencia de los aislados bacterianos del género *Klebsiella*, lo que representa un desafío significativo para el tratamiento de las infecciones y la eficacia de los antibióticos que sean seleccionados para su tratamiento.

El uso de la secuenciación ONT en este estudio de secuenciación de genoma completo nos ofreció algunas ventajas significativas como una alta resolución en el análisis genómico, el análisis simultaneo de una gran cantidad de genes que pueden tener múltiples mecanismos de resistencia, la identificación de alta precisión de genes nuevos o genes de resistencia previamente desconocidos en el ámbito hospitalario. Hay que considerar que la secuenciación de genomas completos nos proporcionó una visión integral de los mecanismos de resistencia de los aislados, contribuyendo de esta manera a comprender, detectar y controlar la RAM con la consecuente generación de estrategias de vigilancia epidemiológica molecular adecuadas, además de una optimización y personalización del tratamiento antimicrobiano

5. Conclusiones

Los determinantes genéticos implicados en la RAM en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae para el género *Klebsiella* captados durante el año 2022 en Hospital General Docente de Calderón de Quito a través de la secuenciación de tercera generación fueron, las variantes *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3}, *bla*_{TEM-4}, el *bla*_{OXA-181}, el *bla*_{OXA-1} que otorgan resistencia a los antibióticos betalactámicos, seguidos de *OqxB*, *qnrS1*, *qnrB5* que otorgan resistencia a los antibióticos fluoroquinolónicos y finalmente *aph(3')-Ia* que otorga resistencia a los aminoglucósidos. A pesar de que el número de secuencias fue bajo cada gen identificado y caracterizado logró la cobertura suficiente para abarcar toda la región relevante de cada gen descrito.

Estos hallazgos señalan la complejidad y la diversidad de los mecanismos de resistencia presentes en las cepas del género *Klebsiella* analizadas, destacando la importancia de la vigilancia continua y el monitoreo de la resistencia antimicrobiana en entornos hospitalarios debido a la presencia aleatoria de cepas multiresistentes.

6. Recomendaciones:

Como recomendación a futuro, se sugiere realizar una nueva secuenciación usando el Rapid Barcoding Kit 24 V14 (SQK-RBK114.24), un kit para secuenciar hasta 24 bibliotecas y capaz de generar altas precisiones de secuenciación de más del 99 %. También se recomienda hacer un seguimiento del kit desde que es enviado tomando en cuenta que la temperatura de transporte debe ser de 2–8° C hasta su llegada al laboratorio donde su temperatura de almacenamiento a largo plazo debe ser –20°C, además se debe verificar las condiciones de almacenamiento del kit para evitar alterar la estabilidad o degradar los reactivos, las enzimas y los adaptadores comprometiendo la calidad de la secuenciación.

Financiamiento/Fondos: Esta investigación fue financiada por la UISEK.

Agradecimientos: Hospital General Docente de Calderón, por haber proporcionado la colección de aislados para el estudio, Dr. Giovanni Núñez, (ex) jefe técnico de laboratorio clínico y servicio de medicina transfusional.

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

Referencias citadas

- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Bharatham, N., Bhowmik, P., Aoki, M., Okada, U., Sharma, S., Yamashita, E., Shanbhag, A. P., Rajagopal, S., Thomas, T., Sarma, M., Narjari, R., Nagaraj, S., Ramachandran, V., Katagihallimath, N., Datta, S., & Murakami, S. (n.d.). Structure and function relationship of Oqx B ef fl ux pump from Klebsiella pneumoniae. *Nature Communications*, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25679-0>
- Bisso, A. (2018). Resistencia a los antimicrobianos. *Rev Soc Peru Med Interna*. 2018;31(2):50-59., 31(2), 50–59. https://medicinainterna.net.pe/sites/default/files/revista_vol_23_2/SPMI_2018-2_Resistance_a_los_antimicrobianos.pdf
- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001>
- Calderón, G., & Aguilar, L. (2016). RESISTENCIA ANTIMICROBIANA: MICROORGANISMOS MÁS RESISTENTES Y ANTIBIÓTICOS. *REVISTA MEDICA DE COSTA RICA Y CENTROAMERICA LXXIII*, 621, 757–763. <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/621/art03.pdf>
- Campoverde, D., Reinoso, Y., & Herrera, E. (2024). Antimicrobial resistance in Klebsiella pneumoniae , Ecuador. December 2021. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.107>
- Cercenado, E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter*, 28, 8–11. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimi->
- Comas, I., Cancino-Muñoz, I., Mariner-Llicer, C., Goig, G. A., Ruiz-Hueso, P., Francés-Cuesta, C., García-González, N., & González-Candelas, F. (2020). Uso de las tecnologías de secuenciación masiva para el diagnóstico y epidemiología de enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(Supl 1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.006>
- Dirección Nacional de Vigilancia Epidemiológica. (2018). Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018. Ministerio de Salud Pública, 2(1), 1–10. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
- Fariña, N. (2016). Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. 14(1), 4–5. http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282016000100001
- García-Lozano, T., López-Guerrero, J. A., & Aznar-Oroval, E. (2013). Colección de microorganismos («cepario») para uso en investigación biomédica. Experiencia de un hospital oncológico. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(4), 270–271. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.11.004>
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. 51(1), 439–446.
- Guzman, M., & Alonso, G. (2009). Caracterización de b -lactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas nosocomiales de K. pneumoniae . *Sucre-Venezuela* . 50(4), 419–431. <http://ve.scielo.org/pdf/ic/v50n4/art02.pdf>
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Kocsis, E., Fontana, R., & Cornaglia, G. (2013). Identification of bla LAP-2 and qnrS1 genes in the internationally successful Klebsiella pneumoniae ST147 clone Printed in Great Britain. 269–273. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.050542-0>
- Lepe, J. A., & Martínez-Martínez, L. (2022). Mecanismos de resistencia en bacterias gramnegativas. *Medicina Intensiva*, 46(7), 392–402. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.medin.2022.02.004>
- Lirola, L., Ávila, Á., Fernández, M., Reinoso, Á., & Martínez, S. (2022). La resistencia bacteriana. Generalidades, carbapenemasas y actualidad: una revisión narrativa. 65–74. [https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/75043/ES - Resistencias.pdf?sequence=1#:~:text=Generalidades%2C carbapenemasas y actualidad%3A una revisión narrativa,.-Lirola- Andreu%2C Laura&text=generar resistencia a dichos fármacos,son múltiples y muy div](https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/75043/ES_-_Resistencia.pdf?sequence=1#:~:text=Generalidades%2C carbapenemasas y actualidad%3A una revisión narrativa,.-Lirola- Andreu%2C Laura&text=generar resistencia a dichos fármacos,son múltiples y muy div)
- López, D., Torres, M., & Prada, C. (2016). Genes de resistencia en bacilos Gram negativos: Impacto en la salud pública en Colombia. *Universidad y Salud*, 18(1), 190–202. <https://doi.org/10.22267/rus.161801.30>
- Ochman, H., Lawrence, J. G., & Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. In *NATURE* (Vol. 405). www.nature.com
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Semana mundial de concienciación sobre el uso de los antimicrobianos. 18 – 24 De noviembre De 2020, 1. <https://www.who.int/es/campaigns/world-antibiotic-awareness-week/2020>
- Prado-vivar, M. B., Ortiz, L., Reyes, J., Villacis, E., Fornasini, M., Baldeon, M. E., & Cardenas, P. A. (2019). Journal of Global Antimicrobial Resistance Molecular typing of a large nosocomial outbreak of KPC-producing bacteria in the biggest tertiary-care hospital of Quito, Ecuador. *Integrative Medicine Research*, 19, 328–332. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.05.014>
- Reyes, J., Cárdenas, P., Tamayo, R., Villavicencio, F., Aguilar, A., Melano, R., & Gabriel, T. (2020). and Mobile Genetic Elements from Outbreaks in a Hospital in Ecuador. 00(00), 1–8. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0433>
- Rivera, M., Rodríguez, C., Flores, R., Serquén, L., & Arce, Z. (2015). Betalactamasas de espectro extendido tipo TEM y CTX-M en Klebsiella spp y Escherichia coli aisladas de superficies de ambientes hospitalarios. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(4), 752. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2015.324.1768>
- Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. 35, 790–819. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x>
- Sugumar, M., Kumar, K. M., Manoharan, A., Anbarasu, A., & Ramaiah, S. (2014). Detection of OXA-1 b -Lactamase Gene of Klebsiella pneumoniae from Blood Stream Infections (BSI) by Conventional PCR and In-Silico Analysis to Understand the Mechanism of OXA Mediated Resistance. 9(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091800>

26. Tamayo, V., Guevara, P., Cadena, S., Paz, E., Ruiz, V., & Zambrano, A. (2022). Genes involucrados con resistencia antimicrobiana en hospitales del Ecuador. *Revista Médica Científica CAMBIOS*, 1–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.36015/cambios.v21.n2.2022>
27. Wang, D., Wang, H., Qi, Y., Liang, Y., Zhang, J., & Yu, L. (2011). Novel variants of the qnrB gene, qnrB31 and qnrB32, in *Klebsiella pneumoniae* Printed in Great Britain. 1849–1852. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.034272-0>
28. Yaneth, M., Morales, G., & Armenta, C. (2017). Perfil de resistencia bacteriana en hospitales y clínicas en el departamento del Cesar (Colombia). *Med. Lab*, 23(7), 387–398.