

**GENOTIPIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES
GENÉTICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK
FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES
MAESTRIA EN BIOMEDICINA**

Trabajo de Fin de Grado Titulado:

**“GENOTIPIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES
GENÉTICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.”**

Realizado por:

Fernando Xavier Villavicencio Zambrano

Director del proyecto:

Dr. Lino Arisqueta, Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:

Magister en Biomedicina

Quito, 20 de septiembre de 2021

**GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

**GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, FERNANDO XAVIER VILLAVIENCIO ZAMBRANO, con cédula de identidad # 1718026964, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

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



FIRMA

1718026964

**GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“GENOTIPIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE DETERMINANTES
GENÉTICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.”**

Realizado por:

FERNANDO XAVIER VILLAVICENCIO ZAMBRANO

como Requisito para la Obtención del Título de: **MAGISTER EN BIOMEDICINA**

ha sido dirigido por el profesor

LINO ARISQUETA

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Lino Arisqueta', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke extending to the left.

FIRMA

**GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

LOS PROFESORES INFORMANTES

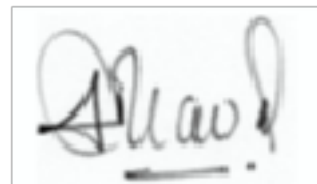
Los Profesores Informantes:

Después de revisar el trabajo presentado,

lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador



FIRMA



FIRMA

Quito, 20 de septiembre de 2021

**GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

DEDICATORIA

El presente trabajo de grado va dedicado a Dios, quien me ha guiado y cuidado este tiempo, dándome fuerzas para continuar.

A mi amada Tita que con el apoyo incondicional, presión, amor y confianza permitió que logre culminar este peldaño.

A mi hermosa familia pilar y catapulta que me ha impulsado a lo largo de este tiempo difícil y a lo largo de mi vida.

A todas las personas especiales que me acompañaron en esta etapa.

**GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

AGRADECIMIENTO

A mi familia y amigos, a mi tutor Lino por su apoyo y colaboración en el desarrollo de
este trabajo.

2021

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

20/09/2021 19:25:55

To be submitted:

Para ser sometido a:

Genotipificación y caracterización de determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana en *Salmonella* Infantis *blaKPC* aisladas en Ecuador.

Villavicencio Fernando^{1,2,*}, Diego Morales², Lino Arisqueta^{1,3}

¹Universidad Internacional SEK, Maestría en Biomedicina, Facultad de ciencias de la Salud.

²Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr Leopoldo Izquieta Pérez”

³ Universidad Internacional SEK, Grupo de Investigación en Enfermedades Emergentes, Epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud

***Autor de correspondencia:**

Fernando Villavicencio, fvillavicencio@inspi.gob.ec/fervillavicencioz@gmail.com

Running title: Determinantes genéticos de *Salmonella* Infantis *blaKPC*.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Resumen:

La resistencia de las bacterias a los antimicrobianos se considera actualmente una amenaza para la salud pública. Los carbapenémicos son antimicrobianos de uso intrahospitalario, y la resistencia de las enterobacterias a este antimicrobiano se ha extendido de forma alarmante en los últimos años, especialmente en aquellas que causan infecciones asociadas a la atención de la salud. Existen varios determinantes genéticos asociados con la resistencia a carbapenémicos, uno de ellos es el gen *blaKPC* cuya diseminación es mediada por plásmidos que promueven la transferencia horizontal de genes entre diferentes bacterias sin barrera de género o especie. Esta transferencia genética es consecuencia de procesos de conjugación mediados por los plásmidos. *Salmonella enterica* es una enterobacteria y constituye una diversidad compleja de serovariedades que incluyen bacterias con asociaciones patógenas dependientes o independientes de hospedador, zoonóticas u oportunistas. Al ser una enterobacteria, su fisiología facilita su adaptación al medio hospitalario, cuando un paciente portador es ingresado. *Salmonella* entonces puede convertirse en un patógeno clínicamente relevante con importantes mecanismos de resistencia a los antibióticos. Este estudio buscó caracterizar los determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana en *Salmonella enterica* serovar *Infantis* portadoras de *blaKPC* aislados a partir de infecciones invasivas en un hospital en Ecuador utilizando el análisis de secuenciación de genoma completo.

Palabras clave:

Salmonella *Infantis*, *blaKPC*, Determinantes genéticos, resistencia bacteriana, carbapenemasa

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Abstract

Antimicrobial resistance of is currently considered a public health threat. Carbapenems are antimicrobials for hospital use, and the resistance of Enterobacteriaceae to these antimicrobials has spread alarmingly in recent years, especially in those that cause healthcare-associated infections. There are several genetic determinants associated with resistance to carbapenems, one of them is *blaKPC* gene, whose dissemination is mediated by plasmids that promote horizontal gene transfer between different bacteria without a gender or species barrier. This gene transfer is the consequence of conjugation processes mediated by plasmids. *Salmonella* enterica is an Enterobacteriaceae and constitutes a complex diversity of serovars including bacteria with host-dependent or independent, zoonotic, or opportunistic pathogenic associations. Being an enterobacterium, its physiology facilitates its adaptation to the hospital environment, when a carrier patient is admitted. *Salmonella* can then become a clinically relevant pathogen with important mechanisms of resistance to antibiotics. This study sought to characterize the genetic determinants of antimicrobial resistance in *blaKPC*-bearing *Salmonella* enterica serovar Infantis isolated from invasive infections in a hospital in Ecuador using whole genome sequencing analysis.

Key words

Salmonella Infantis, *blaKPC*, Genetic Determiners, Bacterial resistance, Carbapenemase

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

1. Introducción

El uso desproporcionado, empírico o no controlado de los antimicrobianos como agentes terapéuticos o como agentes preventivos de infecciones, en el ambiente hospitalario, a nivel comunitario, en medicina humana o veterinaria y en industrias de producción animal, han convertido la resistencia antimicrobiana en un problema de salud pública. Este es un conflicto de difícil solución política y socioeconómica y sin duda su debate es una prioridad mundial. Varios estudios han demostrado que entre el 30 – 50% de las prescripciones de antibióticos no cumplen con los criterios médicos apropiados (CDC, 2019), dado que se administra el antibiótico incorrecto, o se lo administra cuando no está indicado. Esto ha llevado a un aumento considerable del número de infecciones por microorganismos multiresistentes duplicando el estadio de los pacientes en hospitales y aumentando los costos médicos y de tratamiento, así como su mortalidad asociada (Dadgostar, 2019). Ésta última se estima en 700.000 pacientes en el mundo en el 2015 y se prevé que para el 2050 llegue a ser de 10'000.000 muertes por año (OMS, 2021a).

La resistencia a los antimicrobianos puede presentarse de forma natural o intrínseca, siendo una característica propia de cada grupo de bacterias. La envoltura celular de las bacterias Gram negativas que opera como barrera impermeable evitando la entrada de antibióticos es un ejemplo de esto. Este tipo de mecanismos de resistencia generalmente se encuentran ligados al genoma bacteriano (Arzanlou et al., 2017; Murray et al., 2015). También puede darse de forma adquirida, ligada a la adquisición de material genético foráneo, por lo general de otro microorganismo, que se ha transferido horizontalmente a la bacteria provocando la aparición de mecanismos de resistencia como: la modificación o inactivación de antibióticos, la alteración del sitio de acción de un antibiótico, la sobreexpresión de los genes relacionados con la expulsión del antibiótico y/o la pérdida de permeabilidad al antibiótico (Arzanlou et al., 2017). Estos mecanismos de transferencia horizontal se encuentran principalmente asociados a plásmidos, integrones, bacteriófagos, ADN extracelular y transposones que, a través de la conjugación, proporcionan a la bacteria receptora una función anteriormente inexistente (Coll et al., 2005; Olaechea et al., 2010).

Existen antibióticos que deben reservarse como último recurso ante infecciones causadas por microorganismos con resistencia a múltiples fármacos, dentro de los cuales tenemos los betalactámicos. Éstos, que actualmente son ampliamente empleados en la clínica para controlar la proliferación de Gram negativos, se dividen en las familias de cefalosporinas,

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

monobactámicos, penicilinas y carbapenémicos. Estos últimos son los antimicrobianos de más amplio espectro de esta familia, ya que son eficaces ante distintos tipos de bacterias, incluso las que ya poseen resistencia a las demás familias de betalactámicos (Astocondor-Salazar, 2018; Gómez et al., 2015). Los carbapenémicos tienen como base un anillo heterocíclico de carbono y nitrógeno. La industria farmacéutica ha desarrollado y evaluado variantes de estos fármacos diferenciados entre sí por los radicales y cadenas laterales complementarias que brindan su actividad antimicrobiana específica. Los betalactámicos son antibióticos de acción bactericida lenta que inducen la lisis celular por inhibición de la síntesis de la pared celular bacteriana, ya que su mecanismo de acción bloquea la transpeptidación (mediada por proteínas de unión a penicilinas, PBP) que establece enlaces entre unidades de peptidoglicano, a la vez que activa la autolisina bacteriana endógena (Gómez et al., 2015; Tejeda-Rosales et al., 2020).

Existen enzimas que son capaces de destruir el anillo β -lactámico, denominadas β -lactamasas producidas por bacterias con peptidoglucano y por hongos, cuyo fin es defenderse de estos antibióticos. Su mecanismo de acción es romper un puente de amida del anillo β -lactámico impidiendo la unión a las PBP de la bacteria. Las β -lactamasas se encuentran divididas según su peso molecular punto isoelectrico y sitio activo; las encontramos de clase A, B, C y D. Las de clase A, C y D son serina proteasas que comparten alta homología y las de clase B son metaloenzimas dependientes de zinc como se muestra en la **Tabla 1** (Gómez et al., 2015).

Tabla 1 Clasificación de las carbapenemasas según Ambler & Bush

Clase Molecular (Ambler)	Grupo Funcional (Bush)	Sustrato	Inhibición por	Tipo de Enzima
A	2f	Carbapenémicos, Oxoamino-B-lactámicos, Cefamicinas	Ácido clavulánico, Resistente a Aztreonam	SME-1, IMI-1, KPC-2
B (B1)	3a	Carbapenémicos	EDTA	IMP-1, VIM-1, CcrA, INN-1
B (B2)	3b	Carbapenémicos	EDTA	CphA, Shf-1
B (B3)	3c	Carbapenémicos	EDTA	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
C	1	Cefalosporinas	-	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
C	1e	Cefalosporinas	-	CG1, CMY-37
D	2df	Cloxacilina, Carbapenémicos	Ácido clavulánico (v) Aztreonam Sensible	OXA-23, OXA-48

Las carbapenemasas son un tipo de β -lactamasas que hidrolizan β -lactámicos y carbapenémicos generando resistencia bacteriana a la mayor parte de familias de antibacterianos (Astocondor-

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Salazar, 2018). Existen varias especies bacterianas que sintetizan carbapenemasas, entre ellas las pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae donde se ha aislado este tipo de enzimas con mayor frecuencia. Este mecanismo de resistencia se ha extendido de forma alarmante en los últimos años, especialmente en aquellos microorganismos que causan infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS) (Dortet et al., 2017; Nordmann et al., 2011; van Duin & Doi, 2017). Estas IAAS, por lo general se encuentran asociadas con hospitalizaciones prolongadas, disfunción multiorgánica y pacientes inmunocomprometidos causando un aumento de la morbimortalidad hospitalaria; la cual puede ser controlada con prevención logrando la disminución de los costos de atención médica (Burgmann et al., 2010; Kollef et al., 1997; Olaechea et al., 2010).

En Ecuador, la aparición y expansión del gen *blaKPC*, responsable de uno de los cuatro tipos de carbapenemasas de tipo A (*blaKPC*, *blaNMC*, *blaIMI*, *blaSPM*), se ha descrito desde hace más de una década (Iñiguez et al., 2012), principalmente en *Klebsiella pneumoniae*, siendo el mecanismo de resistencia contra carbapenemes más frecuente que ha permanecido en vigilancia en el país (Prado-Vivar et al., 2019; Reyes et al., 2020; Zurita et al., 2013).

Salmonella pertenece a la familia de las Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram-negativo anaerobio facultativo, fermentador de glucosa, oxidasa negativo, catalasa positivo, y móvil en la mayoría de los casos. Produce una de las principales Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), la salmonelosis, que dada su amplia distribución constituye uno de los principales objetivos de investigación en salud pública. La mayor parte de infecciones producidas por este microorganismo se recuperan sin necesidad de tratamiento, pero en casos graves la infección puede llegar a causar la muerte del paciente. Puede tener una amplia gama de reservorios ya sea en animales y sus excremento o en sus derivados cárnicos, siendo transmitido por ingestión de alimentos infectados o contaminados por heces (Caldera Gutiérrez & Robles Cortes, 2017; OMS, 2021b; Pardo Barón, 2020).

Para su clasificación, el Género *Salmonella* se encuentra categorizado en 2500 serotipos, según el esquema *Kauffman White*, el más empleado en el mundo. Según este método se valora el tipo de lipopolisacáridos o antígenos somáticos, proteínas flagelares y antígenos capsulares de superficie. A pesar de sus reservorios y medios de transmisión, y el ser considerada una bacteria zoonótica asociada a la producción (ETAs), posee propiedades de adaptación muy fuertes que le permiten subsistir en el medio hospitalario pudiendo llegar a convertirse en un patógeno

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

clínicamente relevante con importantes mecanismos de resistencia a los antibióticos (Caldera Gutiérrez & Robles Cortes, 2017; Mejia et al., 2021; Méndez et al., 2011).

Salmonella se encuentra generalmente asociada a enfermedades gastrointestinales. Durante los años 70 y 80 *Salmonella enterica* mostró una disminución de la susceptibilidad a los antibióticos de primera línea como ampicilina, ciprofloxacina y trimetoprim/sulfametoxazol, por lo cual se ha debido escalar al uso de cefalosporinas y carbapenémicos. En reportes actuales en Ecuador se describe la presencia de *Salmonella* Infantis portadora de genes que codifican una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) y otros genes de resistencia. Estos fenotipos se catalogan como multi-drogo resistentes (MDR) por la presencia de plásmidos asociados con varios genes de resistencia que ha incorporado esta bacteria (Calero-Cáceres et al., 2020; Mejia et al., 2021; Villagómez Estrada et al., 2017; Vinuesa-Burgos et al., 2016).

Hasta ahora a nivel mundial existen reportes de *Salmonella* serotipos Cubana, Typhimurium, Schwarzengrund y Javiana con una carbapenemasa *blaKPC*. Sin embargo, no se ha informado hasta la fecha, un hallazgo de *Salmonella entérica subesp. entérica* serotipo Infantis con una carbapenemasa de tipo *blaKPC* dentro de su estructura, lo que convierte a este trabajo en el primer reporte al respecto. Se ha identificado, serotipificado y secuenciado el genoma completo del aislado de *Salmonella* y analizado los mecanismos de transmisión de la resistencia a carbapenemes por *blaKPC*, mediante ensayo de conjugación con *E. coli* J53 como aceptora identificando los plásmidos responsables de la misma.

Hipotesis

Salmonella infantis *KPC* positiva es portadora de múltiples determinantes genéticos que otorgan multi-drogo reistencia, plasmada en ventajas evolutivas y adaptativas, que pueden ser analizados mediante su caracterización genómica

Objetivos

Objetivo General:

Caracterizar los determinantes genéticos de resistencia antimicrobiana en *Salmonella entérica* serotipo Infantis *blaKPC* positivos.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Objetivos Específicos:

- Analizar los determinantes genéticos de MDR presentes en aislamientos de *Salmonella* Infantis *blaKPC* positivo
- Identificar el grupo de incompatibilidad de plásmidos asociado con el gen *blaKPC* encontrado
- Analizar los factores epidemiológicos de los determinantes genéticos bacterianos mediante wgMLST

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

2. Materiales y métodos

2.1. Materiales y equipos

Este proyecto de investigación se dio lugar gracias a una colaboración del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y la Universidad Internacional SEK (UISEK), por lo que los reactivos, fungibles y no fungibles fueron cedidos por la UISEK y los equipos que se emplearon pertenecen al INSPI y se utilizaron en sus instalaciones.

Tabla 2 Reactivos

<i>Nombre</i>	<i>Código de Marca</i>	<i>Marca</i>
<i>Azida de Sodio</i>	<i>N/A</i>	<i>Merck</i>
<i>Antisuero O 6,7</i>	<i>229491</i>	<i>Fisher</i>
<i>Antisuero O 14</i>	<i>226611</i>	<i>Fisher</i>
<i>Antisuero H r</i>	<i>222751</i>	<i>Fisher</i>
<i>Antisuero H 1.5</i>	<i>222651</i>	<i>Fisher</i>
<i>Tarjeta GN ID</i>	<i>27341</i>	<i>Biomerieux</i>
<i>Tarjeta GN AST403</i>	<i>423645</i>	<i>Biomerieux</i>
<i>Antibiótico Meropenem</i>	<i>119478-56-7</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>NaCl</i>	<i>7647-14-5</i>	<i>Sigma-Aldrich</i>
<i>Buffer TE 1X</i>	<i>V6232</i>	<i>Promega</i>
<i>GoTaq Green Master Mix</i>	<i>M7123</i>	<i>Promega</i>
<i>Kit de Purificación de amplicones</i>	<i>A1120</i>	<i>Promega</i>
<i>Kit de Extracción de ADN Wizard</i>	<i>A2361</i>	<i>Promega</i>

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN SALMONELLA INFANTIS blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.

Tabla 3 Medios de Cultivo

<i>Medio de Cultivo</i>	<i>Composición por litro</i>
<i>Agar MacConkey</i>	<i>Digestión de gelatina (17 g / L), peptonas (3 g / L), lactosa (10 g / L), sales biliares (1,5 g / L) y cloruro de sodio (5 g / L).</i>
<i>Agar Sangre</i>	<i>Digerido enzimático de caseína 15g; digerido enzimático de tejido animal 4g; extracto de levadura 2g; cloruro de sodio 5g; agar 14g; sangre 3mL; pH 7,0 ± 0,2.</i>
<i>Agar Citrato Simons</i>	<i>Citrato de sodio (2 g / L); cloruro de sodio (5 g / L); fosfato dipotasico (1 g / L); fosfato monoamoniaco (1 g / L); sulfato de magnesio (0.2 g / L); azul de bromo timol (0.08 g / L); agar (15 g / L); pH 6.9±0,2.</i>
<i>Agar TSI</i>	<i>Digerido pancreático de caseína (10,0 g / L); Digerido péptico de tejido animal (10,0 g / L); Cloruro sódico (5,0 g / L); Lactosa (10,0 g / L); sacarosa (10,0 g / L); Dextrosa (1,0 g / L); Sulfato ferroso de amonio (0,2 g / L); Tiosulfato sódico (0,2 g / L); Rojo fenol (0,025 g / L); Agar (13,0 g / L) pH 7.3±0,2.</i>
<i>Agar Lisina</i>	<i>Extracto de levadura (3 g/L); Digesto pancreático de gelatina (5 g/L); Dextrosa (1 g/L); L-lisina HCL (10 g/L); Citrato de Amonio Ferrico (0.50 g/L); Tiosulfato de sodio (0.04 g/L); Púrpura de Bromocresol (0.02 g/L); Agar Bacteriológico (13.50 g/L); pH 6.5 +/- 0.2</i>
<i>Agar SIM</i>	<i>Digerido pancreático de caseína (20g/L); digerido péptico de tejido animal (6.1g/L); sulfato ferroso de amonio (0.2 g/L); tiosulfato sódico (0.2 g/L); agar (3.5 g/L)</i>
<i>Agar Urea</i>	<i>Peptona (1 g/L); Cloruro de sodio (5 g/L); glucosa (1g/L); fosfato de di sodio (1.2 g/L); citrato amonio férrico (0.5 g/L); fosfato de potasio dihidrogenado (0.8 g/L); rojo fenol (0.012 g/L); agar (15 g/L)</i>
<i>Caldo MRVP</i>	<i>Pluripeptona (7g/L); glucosa (5 g/L); fosfato dipotasico (5g/L); pH 6,9 ± 0,2.</i>
<i>Caldo infusión cerebro-corazón (BHI)</i>	<i>Cerebro de ternero infusión 7,7 g; corazón de buey infusión 9,8 g; peptona de proteosa 10 g; dextrosa 2g; cloruro de sodio 5g; fosfato disódico 2,5 g; agar 14g pH 7,4 ± 0,2.</i>
<i>Agar Müller-Hinton</i>	<i>Extracto de carne bovina 3g; hidrolizado ácido de caseína 17,5g; almidón 1,5g; agar 14g pH final 7,3 □ 0,1</i>
<i>Agar Nutritivo</i>	<i>Digerido peptónico 5g; cloruro de sodio 5g; extracto de carne 1,5g; extracto de levadura 1,5g; agar 14g pH Final 7,4 □ 0,2</i>

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN SALMONELLA INFANTIS blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.

Tabla 4 Discos de Antibiótico e inhibidores

<i>Discos</i>	<i>Concentración por disco</i>	<i>Marca</i>
<i>Ampicilina</i>	<i>10 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Ceftriaxona</i>	<i>30 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Ceftazidima</i>	<i>30 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Ciprofloxacina</i>	<i>5 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Trimetropim/Sulfametoxazole</i>	<i>23.75 ug / 1.25 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Ampicilina-Sulbactam</i>	<i>10 ug/ 10 u/g</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Meropenem</i>	<i>10 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Imipenem</i>	<i>10 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Cefepime</i>	<i>30 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Colistina</i>	<i>10 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Ertapenem</i>	<i>5 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Aztreonam</i>	<i>30 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Ácido nalidixico</i>	<i>30 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>Ácido fenil Borónico</i>	<i>5 ug</i>	<i>Oxoid</i>
<i>EDTA</i>	<i>5 ug</i>	<i>Oxoid</i>

Tabla 5 Primers usados en estudio

<i>Primers usados</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Tamaño</i>	<i>Referencia</i>
<i>Primer blaKPCf</i>	<i>CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG</i>	<i>798 pb</i>	<i>Poriel, et al 2011</i>
<i>Primer blaKPCr</i>	<i>CTTGTCATCCTTGTTAGGCG</i>		
<i>Primer UNIKPCf</i>	<i>ATGTCACGTATCGCCGTCT</i>	<i>893 pb</i>	<i>Huang, et al 2014</i>
<i>Primer UNIKPCr</i>	<i>TTTTCAGAGCCTTACTGCCC</i>		
<i>Primer OXA-48f</i>	<i>GCGTGGTTAAGGATGAACAC</i>	<i>438 pb</i>	<i>Poriel, et al 2011</i>
<i>Primer OXA-48r</i>	<i>CATCAAGTTCAACCCAACCG</i>		
<i>Primer blaIMPf</i>	<i>GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC</i>	<i>232 pb</i>	<i>Poriel, et al 2011</i>
<i>Primer blaIMPr</i>	<i>GGTTTAAAYAAAACAACCACC</i>		
<i>Primer blaVIMf</i>	<i>GATGGTGTGGTTCGCATA</i>	<i>390 pb</i>	<i>Poriel, et al 2011</i>
<i>Primer blaVIMr</i>	<i>CGAATGCGCAGCACCAG</i>		
<i>Primer blaNDMf</i>	<i>GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC</i>	<i>621 pb</i>	<i>Poriel, et al 2011</i>
<i>Primer blaNDMr</i>	<i>CGGAATGGCTCATCACGATC</i>		

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN SALMONELLA INFANTIS blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.

Tabla 6 Equipos

<i>Nombre</i>	<i>Marca</i>	<i>Modelo</i>
<i>Incubadora</i>	<i>VWR-BLINDER</i>	<i>14-08754</i>
<i>Turbidimetro</i>	<i>Oxoid</i>	<i>0.5-McFarland</i>
<i>Equipo automatizado</i>	<i>Biomerieux</i>	<i>Vitek 2 Compact</i>
<i>Centrifuga</i>	<i>MLW</i>	<i>T54</i>
<i>Cabina de bioseguridad B2</i>	<i>Labconco</i>	<i>3440001</i>
<i>Termociclador</i>	<i>BioRad</i>	<i>C-1000</i>
<i>Juego de micropipetas</i>	<i>Eppendorff</i>	<i>Varios volúmenes 0.5-1000uL</i>
<i>Fotodocumentador</i>	<i>BioRad</i>	<i>Universal HoodII</i>
<i>Autoclave</i>	<i>All-American</i>	<i>25X</i>
<i>NovaSeq 6000 PE 150</i>	<i>Illumina</i>	<i>Miseq</i>

Tabla 7 Herramientas bioinformáticas usadas

<i>Herramienta</i>	<i>Versión</i>	<i>Aplicación</i>	<i>Referencia</i>
<i>Galaxy</i>	<i>21.05.1</i>	<i>Análisis computacionales bioinformáticos a través de la web.</i>	<i>(Afgan et al., 2018)</i>
<i>FastQC</i>	<i>0.11.8</i>	<i>Comprobaciones de control de calidad en datos de secuencia sin procesar que provienen de tuberías de secuenciación de alto rendimiento.</i>	<i>(Andrews, n.d.)</i>
<i>Trimmomatic</i>	<i>0.38.0</i>	<i>Recorte para datos paridos en un extremo y de emparejado simple provenientes de trabajo con illumina.</i>	<i>(Bolger et al., n.d.)</i>
<i>Spades</i>	<i>3.12.0</i>	<i>Ensamblador del genoma</i>	<i>(Bankevich et al., 2012)</i>
<i>Prokka</i>	<i>1.14.5</i>	<i>Anotación rápida de genomas bacterianos, arqueales y virales,</i>	<i>(Cuccuru et al., 2014; Seemann, 2014)</i>
<i>Kaiju</i>	<i>1.8</i>	<i>Clasificación taxonómica sensible de lecturas de secuenciación de alto rendimiento</i>	<i>(Menzel et al., 2016)</i>
<i>Krona</i>	<i>N/A</i>	<i>Visualización interactiva en el navegador de la abundancia de taxones provenientes de Kaiju.</i>	<i>(Ondov et al., 2011)</i>
<i>GenomePeek</i>	<i>N/A</i>	<i>Análisis rápido de archivos de secuenciación de un solo genoma y metagenoma de genes conservados, alineados con bases de datos de referencia altamente específicas.</i>	<i>(McNair & Edwards, 2015)</i>
<i>SeqSero</i>	<i>1.0</i>	<i>Serotipificación de Salmonella mediante secuenciación del genoma completo</i>	<i>(Zhang et al., 2015)</i>
<i>MLST</i>	<i>2.0</i>	<i>Tipificación de secuencias multilocus de bacterias basada en secuenciadas de genoma completo</i>	<i>(Larsen et al., 2012)</i>
<i>ABRicate</i>	<i>1.0.1</i>	<i>Cribado masivo de contigs e identificación de genes de resistencia a antibióticos.</i>	<i>(Seemann, 2016)</i>
<i>PlasmidFinder</i>	<i>2.0.1</i>	<i>Identificación de plásmidos en aislados de bacterias secuenciados totales o parciales.</i>	<i>(Carattoli et al., 2014; Clausen et al., 2018)</i>

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

2.2. Métodos.

2.2.1. Recuperación de aislamiento bacteriano

La reconstitución de los aislamientos de la colección del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos se realizó mediante el siguiente procedimiento:

Los viales criopreservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ se dejaron descongelar a temperatura ambiente, bajo condiciones de esterilidad y se sembraron sobre agar MacConkey y agar sangre (composición en **Tabla 3**).

Después de una incubación de 24 horas a una temperatura controlada de $37^{\circ}\text{C} \pm 2$, se procedió a evaluar las características macroscópicas de las colonias crecidas en agar MacConkey y en agar sangre y la pureza del cultivo y las características microscópicas mediante tinción Gram.

2.2.2. Identificación bacteriana

Ha continuación se describen las pruebas bioquímicas realizadas para la identificación fenotípica de las bacterias, el uso del sistema automatizado como complemento y la serotipificación como metodología *gold standard*.

2.2.2.1. Pruebas bioquímicas

2.2.2.1.1. Prueba de hierro y tres azúcares (TSI)

Esta prueba evalúa la capacidad de fermentación de sacarosa, glucosa y lactosa del aislamiento bacteriano. Para ello las cepas se siembran en Agar TSI y tras 24 horas se observa el cambio de color de rojo a amarillo por acidificación provocada por la fermentación de azúcares; de rojo a negro por la producción de H_2S debido a la reducción de sales de hierro (indica también la capacidad de fermentar glucosa); la ruptura o desplazamiento del medio indica la producción de gas.

2.2.2.1.2. Prueba de lisina y hierro(LIA)

Se determinó la actividad de la lisina descarboxilasa y el cambio del pH del medio por la presencia del bromocresol. Para ello las cepas se siembran en agar LIA y tras 24 horas se observa el cambio de color a amarillo cuando el pH es inferior a 5.2, y se mantiene o se vuelve púrpura cuando el pH esta sobre 6.8, y la ruptura o desplazamiento del medio indica la producción de gas.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

2.2.2.1.3. Medio sulfuro indol movilidad (SIM)

Esta prueba determinó la movilidad del aislamiento por presencia de flagelos y verificó la presencia de la enzima triptofanasa que realiza el cambio de coloración. Para ello las cepas se siembran en agar SIM y tras 24 horas se observa el enturbiamiento del medio por el crecimiento bacteriano difundido en el medio semi-sólido, el cambio de color de amarillo a rojo por la combinación del indol y el reactivo Kovak y producción de H₂S por la reacción de tiosulfato de sodio y la ruptura o desplazamiento del medio que indica la producción de gas.

2.2.2.1.4. Prueba de ureasa

Esta prueba determinó la capacidad de degradar la urea formando amoníaco. Para ello las cepas se siembran en agar urea y tras 24 horas se observa el cambio de color de amarillo a rojo cereza cuando el pH es alcalino 8.1 por efecto del amoníaco, y la ruptura o desplazamiento del medio que indica la producción de gas.

2.2.2.1.5. Prueba del citrato

Se determinó que el fenotipo bacteriano usa el citrato como fuente de carbono, y amoníaco como fuente de nitrógeno. Para ello las cepas se siembran en agar citrato y tras 24 horas se observa el cambio de color de verde a azul cuando el pH es alcalino por la liberación de las sales amónicas del medio, y la ruptura o desplazamiento del medio que indica la producción de gas.

2.2.2.1.6. Prueba rojo de metilo y acetilmetilcarbinol (MR-VP)

Se determinó por colorimetría el uso de glucosa medido por la variación del pH del medio y se determinó a la vez la fermentación butilén glicólica con KOH y α - naftol. Para ello las cepas se siembran en caldo MRVP y tras 24 horas de crecimiento y con unos minutos de reacción frente a 5 gotas de rojo de metilo se observa el cambio de color a rojo que indica la presencia de ácidos. En caso contrario, se mantiene amarilla. Para la prueba de VP se colocan 2 gotas de reactivo verificando la aparición de un color rosado en el caso de detectar la acetoina.

2.2.2.2. Identificación mediante Vitek 2

Después de la caracterización bioquímica de los aislados, se confirmó la identificación a nivel de género y especie, mediante el uso de las tarjetas GN ID del sistema automatizado Vitek 2 Compact siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, empleando un inóculo puro

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

de 24h de cultivo, se preparó una suspensión bacteriana en la solución salina indicada por el fabricante y se analizó durante 6h en el equipo Vitek 2 Compact.

2.2.2.3. Serotipificación mediante el método Kauffmann – White.

La identificación de especie se realizó según el esquema de suero aglutinante en porta objetos siguiendo el algoritmo descrito por Kauffmann-White. Se dispersaron 2 gotas de antisuero en un portaobjetos de vidrio y se inoculó mediante un asa bacteriológica una colonia de aislamiento. Mediante agitaciones suaves de manera circular, se obtuvo una solución homogénea que, al contrastarla sobre una superficie oscura con luz indirecta, permitió verificar la aglutinación presente; realizando este proceso con los antígenos somáticos y flagelares para determinar la especie y serogrupo.

2.2.3. Susceptibilidad bacteriana

La susceptibilidad bacteriana a los antibióticos se analizó mediante dos técnicas distintas, la difusión en disco que nos permite detectar sinergismos entre antibióticos e inhibidores identificando así mecanismos concretos que en los ensayos de microdilución no se pueden detectar, y la microdilución en caldo que nos permite establecer la concentración mínima inhibitoria (MIC) y por tanto la presencia o ausencia de resistencia contra cada antibiótico analizado.

2.2.3.1. Difusión en disco

Los perfiles de susceptibilidad fueron obtenidos mediante difusión en disco en agar Müller-Hinton con una suspensión bacteriana del aislamiento que llegó hasta una concentración de 0.5 según escala McFarland evaluada con ayuda de un densitómetro.

Se procedió con la siembra de esta suspensión bacteriana en una placa de agar Müller-Hinton con un hisopo estéril embebido en la suspensión en tres direcciones hasta cubrir completamente las cajas. Luego se procedió a colocar de manera estratégica los discos del antibiograma (**Imagen 1**) que contenían Imipenem, meropenem, ertapenem, amoxicilina, ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam, cefoxitin, en la primera caja y ampicilina, ciprofloxacina, trimetropim/sulfametoxazole, ácido nalidixico, y azitromicina en la segunda caja siguiendo el algoritmo del Centro de referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.

Con la finalidad de determinar fenotípicamente la presencia de carbapenemasas en el inóculo bacteriano se colocó un disco de ácido fenil borónico, inhibidor de betalactamasas, junto con un carbapenémico. El efecto inhibitorio del ácido fenilborónico provoca una expansión del halo de inhibición de crecimiento bacteriano, exponiendo la actividad de la carbapenemasa frente al antibiótico. De igual manera, un disco con EDTA, quelante de metales divalentes, inhibe la acción de metalobetalactamasas provocando una expansión del halo de inhibición de crecimiento bacteriano y revelando la presencia de estas metaloenzimas.

Las placas se incubaron a 37°C ±2 por 24 horas para proceder con la evaluación de los resultados.

2.2.3.2. Concentración mínima inhibitoria con sistema automatizado de microdilución en caldo

Con la finalidad de obtener la CIM de cada antibiótico, se procedió a realizar un análisis de susceptibilidad mediante el equipo Vitek2Compact® usando las tarjetas GN-AST 403 según el procedimiento descrito por el fabricante.

Los resultados de ambas metodologías, difusión en disco y sistema automatizado Vitek 2 Compact de microdilución en caldo, fueron contrastados y evaluados en función de los puntos de corte y la normativa de *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) edición vigente 2021.

2.2.4. Conjugación bacteriana

Los fenotipos de *Salmonella* Infantis recuperados fueron sometidos a un ensayo de conjugación con *Escherichia coli* J53 como célula receptora, mediante la técnica de apareamiento en caldo siguiendo el procedimiento descrito a continuación.

2.2.4.1. Preparación de medios de cultivo y soluciones

Se procedió a disolver 1 g de azida de sodio (NaZ) en 10 ml de agua estéril para obtener una solución madre a una concentración de 100 mg / mL, y se procedió a realizar el paso por un filtro de 0.5 nm para tener una solución estéril.

Para el ensayo de conjugación se preparó un medio BHI como medio líquido de enriquecimiento y un medio solido selectivo con base en agar nutritivo (**Tabla 3**) que incluía NaZ y meropenem a unas concentraciones finales de 50 ug/mL y 1 ug/mL respectivamente. Este medio permitió

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

la selección de *E. coli* J53 (naturalmente resistentes a NaZ) que hubieran incorporado el plásmido de resistencia a los carbapenémicos de *Salmonella*.

2.2.4.2. Suspensión bacteriana y conjugación

Se procedió a realizar una suspensión de los aislamientos de *Salmonella* Infantis y *E. coli* J53 en dos tubos distintos con 5mL medio de enriquecimiento BHI y se dejó incubar por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$.

Posterior a esto se transfirió 2.5 mL de *E. coli* J53 en el tubo que contenía 5mL de suspensión de *Salmonella* Infantis para lograr una proporción de bacteria receptora a bacteria donadora de 2:1 respectivamente, y se incubó por 24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ para que se produjera la conjugación bacteriana.

Una vez transcurrido este tiempo se tomó 1mL de mezcla bacteriana y se dispensó en una caja de medio selectivo (Agar nutritivo + NAZ + Meropenem) descrito anteriormente y se realizó la siembra respectiva por agotamiento con una varilla triangular en condiciones estériles. Se dejó secar a temperatura ambiente con la caja destapada por 5 minutos, para posteriormente tapar, voltear e incubar la placa a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 24 horas.

Una vez concluido este procedimiento se verificó el crecimiento bacteriano generado en el medio de cultivo selectivo y se realizó una nueva identificación bacteriana con baterías bioquímicas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1 de métodos.

2.2.5. Extracción de ADN genómico y screening de gen *blaKPC*.

Para verificar el tipo de carbapenemasa se realizó un tamizaje mediante reacción en cadena de la polimerasa de punto final multiplex. Para ello se preparó una suspensión bacteriana de *Salmonella* Infantis y el trasnconjugante de *E. coli* J53 en buffer TE 1X, empleando 5 colonias de cada uno de los aislamientos.

Se realizó el procedimiento de extracción de ADN con el Kit *Wizard Genomic Miniprep Kit*, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante, el cual usa una serie de ciclos de cambio de temperatura y centrifugación que lisa las bacterias, precipita proteínas y degrada ARN, purificando el ADN genómico de las muestras.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Previamente a la realización de las amplificaciones correspondientes se procedió con la cuantificación y análisis de pureza del material genético extraído por medio del uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND1000 pipeteando 1 uL del extracto de ADN y colocándolo en el lector; realizando repeticiones para confirmar la medida. La pureza se determinó mediante el cociente Abs260/Abs280. Cuando este cociente fue superior a 1.6 se consideró que ADN estaba suficientemente purificado.

Con la finalidad de identificar los posibles genes de resistencia albergados en los aislamientos se realizó una amplificación del material genético con los cebadores específicos descritos en la **Tabla 5** para los genes *blaKPC*, *blaOXA-48*, *blaIMP*, *blaNDM*, y *blaVIM*, en una reacción multiplex con un volumen de reacción de 25uL, con 0.96X de GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA, Winsconsin, USA), según protocolo estandarizado en el CRN-RAM de INSPI.

A la vez, se realizó la amplificación del gen *blaKPC* con el uso de los cebadores universales que albergan por completo la secuencia del gen UNIKPC (**Tabla 5**) para determinar el tipo de KPC presente en el aislamiento. El producto de PCR se secuenció mediante el método de Sanger y posteriormente se realizó un análisis de alineamiento básico en BLAST.

2.2.6. Secuenciación de genoma completo y análisis bioinformático

El material genómico de *Salmonella* Infantis así como el del transcojugado de *E. coli* se envió a secuenciar en BioSequence (Quito, Ecuador), según el método descrito a continuación:

Se realizó la cuantificación de ADN de doble cadena de las muestras con ayuda del fluorímetro Quantus (Promega) con la finalidad de conocer específicamente la concentración de doble cadena en la muestra. Se normalizó la muestra y se procedió según el protocolo de librería Nextera Illumina iniciando con la fragmentación enzimática del ADN genómico y realizando lavados para filtrar los fragmentos del tamaño de lectura apropiado, ni muy grandes ni muy pequeños.

Posteriormente, se realizó la incorporación de los índices de identificación en los extremos de los fragmentos de cada muestra, y se realizó nuevamente la cualificación, normalización y *pooling* de las librerías que fueron ingresadas en la plataforma MiSeq System de Illumina para la secuenciación propiamente dicha.

Una vez culminado el procesamiento se recibieron las secuencias en formato *fastq* generadas por la plataforma Base Space de Illumina donde se encontraban albergadas para proceder con

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

el análisis bioinformático de las mismas empleando distintas aplicaciones (**Tabla 7** del aparatado de materiales).

Se evaluó la calidad de secuencias usando FastQC, y posterior a ello se realizó la remoción de los adaptadores y cebadores añadidos en la preparación de la librería usando Trimomatic.

Una vez realizado este proceso se procedió al ensamblaje de secuencias contiguas para: estructurar el genoma bacteriano usando SPAdes y Prokka para realizar las anotaciones respectivas junto con la clasificación taxonómica a través de Kaiju, GenomePeek y caracterización específica de serotipo en las plataformas SeqSero; MLST 2.0 para definir la secuencia tipo bacteriana detectada; ABRicate para la búsqueda de genes adquiridos o mutaciones cromosómicas que intervienen en resistencia antimicrobiana; y PlasmidFinder para determinar que plásmidos transmiten la resistencia observada en el aislado de Salmonella y en el transcojugante *E. coli* J53.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

3. Resultados

3.1. Identificación bacteriana fenotípica y susceptibilidad a antibióticos

Una vez recuperado el aislamiento y refrescado de su criopreservación, se procedió a realizar la identificación fenotípica. Se inició con tinción Gram, encontrando bacilos Gram negativos, y luego se procedió con pruebas bioquímicas y la tarjeta GN-ID del sistema Vitek2 Compact. La **Tabla 8** muestra los resultados obtenidos, donde se muestra el perfil particular de un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo, no esporulado, móvil, fermentativo y que usa citrato como fuente de carbono.

Tabla 8 Pruebas de identificación fenotípica convencional, batería bioquímica

<i>Prueba</i>	<i>Resultado</i>
<i>Tinción Gram</i>	<i>Gram negativo</i>
<i>TSI</i>	<i>K/A + H₂S</i>
<i>LIA</i>	<i>Positivo</i>
<i>Citrato</i>	<i>Positivo</i>
<i>Úrea</i>	<i>Negativo</i>
<i>Motilidad</i>	<i>Positivo</i>
<i>Indol</i>	<i>Negativo</i>
<i>VP</i>	<i>Negativo</i>
<i>Rojo de metilo</i>	<i>Positivo</i>

Una vez confirmadas las características fenotípicas propias de *Salmonella*, se realizó la serotipificación de las cepas aisladas mediante la utilización de diferentes antisueros comerciales para determinar la positividad de aglutinación frente a los mismos. Los sueros inmunizados con antígenos somáticos 6, 7 y 14 provocaron una aglutinación intensa mientras que los sueros inmunizados con antígenos flagelares r y 1.5 provocaron una aglutinación débil. Esto nos indica que los aislados corresponden *Salmonella entérica* subespecie *Infantis*.

El perfil de susceptibilidad, mostrado en la **Tabla 9**, indica resistencia a aminopenicilinas, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, monobactámicos, carbapenemes, quinolonas y sulfonamidas lo que caracteriza a este fenotipo bacteriano como Extensivamente Resistente (XDR por sus siglas en inglés). Esto deja como única opción terapéutica posible a la polimixina

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

(colistin) que es la última molécula antibiótica creada para la contención de este tipo de microorganismos.

El perfil de susceptibilidad mencionado sugiere la presencia de una carbapenemasa, dada la resistencia combinada encontrada a los carbapenémicos (meropenem, imipenem y ertapenem). Además, la resistencia al aztreonam es una característica típica de las carbapenemasas grupo A de Ambler.

Para la confirmación de esta suposición se realizaron las pruebas de sinergia con ácido fenil borónico y EDTA. El ácido fenil borónico provocó la expansión del halo de inhibición confirmando la presencia de una betalactamasa, mientras que el EDTA no provocó ningún efecto, descartando que se tratara de una metaloenzima del grupo B de Ambler. Dados estos resultados y el particular perfil de susceptibilidad, se concluyó que se trataba de una carbapenemasa perteneciente al grupo A de la clasificación molecular de Ambler, y grupo 2f de los grupos funcionales de la clasificación Bush y Jacoby.

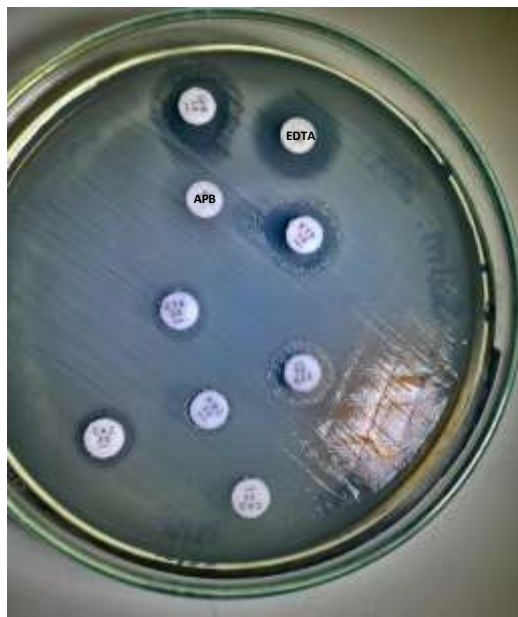


Imagen 1 Detección fenotípica de Sinergias de carbapenémicos con APB y EDTA

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN SALMONELLA INFANTIS blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.

Tabla 9 Perfil de susceptibilidad de *Salmonella enterica subesp. Infantis*

Antibiótico	Resultado DD (mm)	Punto de Corte DD			Resultado MIC (ug/mL)	Punto de Corte MIC			Interpretación
		S	I	R		S	I	R	
AMP (10ug/mL)	6	≥17	14-16	≤13	>32	≤8	16	≥32	R
CRO (30ug/mL)	7	≥23	20-22	≤19	>64	≤1	2	≥4	R
CAZ (30ug/mL)	8	≥21	18-20	≤17	≥64	≤4	8	≥16	R
CIP (5ug/mL)	21	≥26	22-25	≤21	1	≤0.25	0.5	≥1	R
SXT (1.25/23.75ug/mL)	6	≥16	11-15	≤10	>4	≤2/38	-	≥4/76	R
SAM (10/10ug/mL)	-	≥15	12-14	≤11	≥32	≤8/4	16/8	≥32/16	R
MEM (10ug/mL)	17	≥23	20-22	≤19	≥16	≤1	2	≥4	R
IPM (10ug/mL)	19	≥23	20-22	≤19	≥16	≤1	2	≥4	R
FEP (30ug/mL)	-	-	-	-	16	≤2	4-8	≥16	R
COL (10ug/mL)	-	-	-	-	≤0.5	-	≤2	≥4	I
ETP (10ug/mL)	15	≥22	19-21	≤18	≥8	≤0.5	1	≥2	R
ATM (30ug/mL)	6	≥21	18-20	≤17	≥64	-	-	-	R
NAL (30ug/mL)	6	≥19	14-18	≤13	-	-	-	-	R
AMC (20/10ug/mL)	6	≥18	14-17	≤13	-	-	-	-	R
FOX (30ug/mL)	11	≥18	15-17	≤14	-	-	-	-	R
AK (30ug/mL)	-	-	-	-	≤1	≤16	32	≥64	S
CZT(30/10ug/MI)	-	-	-	-	≥32	≤2/4	4/4	≥32/16	R
CZA (30/20ug/mL)	-	-	-	-	0.5	≤8/4	-	≥16/4	S
*TGC (ug/mL)	-	-	-	-	2	≤1	-	≥2	R
TPZ (100/10ug/mL)	-	-	-	-	≥128	≤16/4	32/4-64/4	≥128/4	R

Difusión de disco (DD); Concentración mínima inhibitoria (MIC); Ampicilina (AMP); Ceftriaxona (CRO); Ceftazidima (CAZ); Ciprofloxacina (CIP); Trimetropim/Sulfametoxazole (SXT); Ampicilina/Sulbactam (SAM); Meropenem (MEM); Imipenem (IMP); Cefepime (FEP); Colistin (COL); Ertapenem (ETP); Aztreonam (ATM); Ácido nalidixico; (NAL); Amoxicilin/Ácido clavulanico (AMC); Cefoxitin (FOX); Amicacina (AK); Ceftolozane/tazobactam (CZT); Ceftazidima/avibactam (CZA); Tigeciclina (TGC); Piperacilina-Tazobactam (TPZ); Sensible (S); Intermedio (I); Resistente (R)

*Punto de corte de referencia tomado de EUCAST

3.2. Conjugación bacteriana y tamizaje molecular

Con el fin de identificar la posible transferencia plasmídica que generó este tipo de microorganismos XDR se realizó el ensayo de conjugación entre los fenotipos de *Salmonella* Infantis recuperados como células donadoras, y *Escherichia coli* J53 como célula receptora ya

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

que presenta resistencia a la azida de sodio y esto permite su selectividad en medios de cultivo con este compuesto.

Luego de realizar el procedimiento descrito por Miller 2006 (**apartado 2.2.4 de materiales y métodos**), se observó el crecimiento de colonias en el medio selectivo que contenía azida de sodio y carbapenémico en su composición. Ante esto se realizó una resiembra del aislamiento en agar MacConkey con los mismos porcentajes de ambos inhibidores (**Imagen 2**), para la identificación positiva de *Escherichia coli* J53 mediante pruebas bioquímicas.



Imagen 2 Crecimiento de trasnconjugantes *E. coli* J53 en medio con azida de sodio y carbapenémico.

Al realizar un antibiograma con dicho microorganismo, la cepa transconjugante de *Escherichia coli* J53, se observó (**Tabla 10**) que había incorporado satisfactoriamente el plásmido que confiere la resistencia a ceftazidima, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam carbapenémicos y aztreonam.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Tabla 10 Análisis de susceptibilidad de *E. coli* J53 tras el ensayo de conjugación bacteriana

<i>Antibiótico</i>	<i>Célula donadora</i>		<i>Célula receptora</i>		<i>Transconjugado</i>	
	<i>MIC</i>	<i>Interp</i>	<i>MIC</i>	<i>Interp</i>	<i>MIC</i>	<i>Interp.</i>
<i>CAZ (30ug/mL)</i>	≥64	R	≤0.12	S	16	R
<i>CIP (5ug/mL)</i>	1	R	≤0.06	S	≤0.06	S
<i>SAM (10/10ug/mL)</i>	≥32	R	≥2	S	≥32	R
<i>MEM (10ug/mL)</i>	≥16	R	≤0.25	S	≥16	R
<i>IPM (10ug/mL)</i>	≥16	R	≤0.25	S	8	R
<i>FEP (30ug/mL)</i>	16	R	≤0.12	S	2	S
<i>ETP (10ug/mL)</i>	≥8	R	≤0.12	S	1	I
<i>ATM (30ug/mL)</i>	≥64	R	≤1	S	≥64	R
<i>AK (30ug/mL)</i>	≤1	S	≤1	S	≤1	S
<i>CZT(30/10ug/ml)</i>	≥32	R	≤0.25	S	1	S
<i>CZA (30/20ug/mL)</i>	0.5	S	≤0.12	S	≤0.12	S
<i>TGC (ug/mL)*</i>	2	R	≤0.5	S	≤0.5	S
<i>TPZ (100/10ug/mL)</i>	≥128	R	≥4	S	≥128	R

Concentración mínima inhibitoria (MIC); Cefotaxidima (CAZ); Ciprofloxacina (CIP); Ampicilina/Sulbactam (SAM); Meropenem (MEM); Imipenem (IMP); Cefepime (FEP); Ertapenem (ETP); Aztreonam (ATM); Amicacina (AK); Ceftolozane/tazobactam (CZT); Cefotaxidima/avibactam (CZA); Piperacilina-Tazobactam (TPZ); Tigeciclina (TGC); Sensible (S); Intermedio (I); Resistente (R)

Para poder identificar el tipo de carbapenemasa presente en *Salmonella* Infantis se realizó un tamizaje molecular de carbapenemasas mediante PCR multiplex de punto final, con los *primers* descritos en la **tabla 5**. La **Imagen 3**, muestra los productos de la PCR realizada. Tal y como puede observarse, hubo una amplificación de un fragmento de aproximadamente 798 bp que correspondía al gen *blaKPC* (carriles 2 y 3). No se observó la amplificación de ningún otro fragmento.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

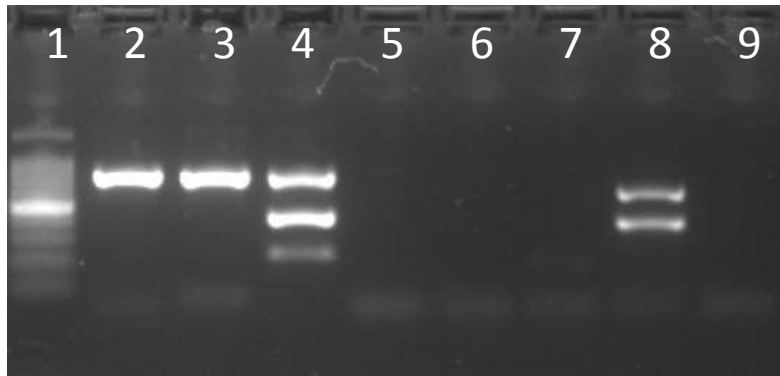


Imagen 3 PCR multiplex para detección de carbapenemasas en aislados de *Salmonella Infantis*.

Carril 1: marcadores de peso molecular; carriles 4 y 8: controles positivos (PCR de cepas bacterianas caracterizadas blaKPC (+), oxa48 (+) y blaIMP (+) en el carril 4 y ndm (+) y vim (+) en el carril 8); carriles 5 y 9: controles negativos (cepas ATCC sin estos genes de resistencia); carriles 2 y 3: productos de PCR multiplex para blaKPC, blaOXA-48 y blaIMP; carriles 6 y 7: productos de PCR multiplex para blaNDM y blaVIM.

Con la finalidad de determinar el tipo de KPC detectada se realizó una PCR con *primers* universales de carbapenemasas tipo KPC y el producto se envió a secuenciar a Macrogen (Korea). Se realizó el emparejamiento de los resultados sentido y antisentido empleando el análisis de máxima parsimonia con la herramienta ClustalW en Geneious R9, obteniendo una secuencia consenso de 850 pb (ver **Anexo 1**).

Posterior a ello, y con ayuda de la plataforma Megablast en Geneious R9 la secuencia consenso se comparó con las bases de datos del NCBI identificando que se trataba de una serin-carbapenemasa *blaKPC* tipo 2 con un score de 100%, como se muestra en el **Anexo 2**

3.3. Análisis bioinformático de genoma completo

3.3.1. Análisis de control de calidad de secuencias

Una vez recibidos los archivos de las secuencias en formato *fastq*, se emplearon varias herramientas de la plataforma de código abierto Galaxy. En primer lugar, se eliminaron los adaptadores añadidos en la librería usando Trimomatic y se procedió a evaluar la calidad de los datos de las secuencias usando FastQC.

Mediante la herramienta FastQC se detectaron 313.616 secuencias de una longitud de 35 – 151 pares de bases en ambas lecturas de *Salmonella* y 238.233 secuencias de una longitud de 35 – 151 pares de bases en ambas lecturas del transconjugado *E. coli*. El análisis arrojó una calidad

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

media mayor a 32, como se muestra en la **Imagen 2**. El genoma secuenciado se encuentra en el rango superior correspondiente a secuencias de calidad óptima.

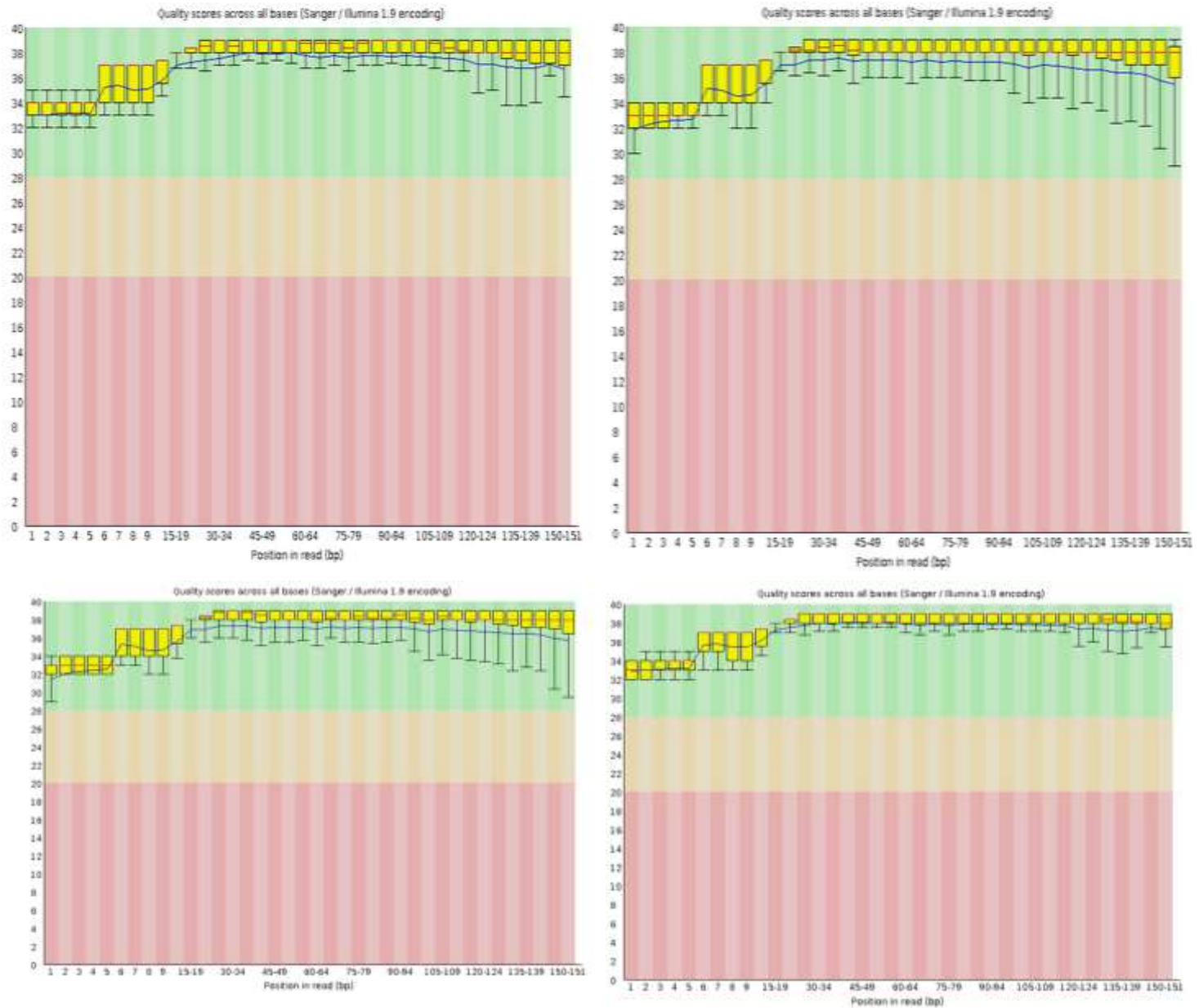


Imagen 4 Análisis de la calidad de las secuencias obtenidas a partir del aislado de *Salmonella* *Infantis* y transcojugante *Escherichia* *Coli* *J53*, empleando la herramienta bioinformática *fastQC*.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

3.3.2. Identificación taxonómica de especie bacteriana

Una vez comprobada la calidad de los datos se realizó el ensamblaje *de novo* con el uso de SPAdes. De esta herramienta se obtuvieron las secuencias de los fragmentos (*contigs*) en formato FASTA con las que se trabajó en las plataformas Kaiju, GenomePeek y SeqSero. A través de éstas se logró realizar la identificación taxonómica descrita a continuación.

3.3.2.1. Clasificación taxonómica por proteínas

Mediante la plataforma Kaiju se realizó la clasificación taxonómica por proteínas al comparar las secuencias de la muestra con las descritas en el NCBI tal y como lo describen Menzel, et al (2016). El genoma identificado correspondió a una bacteria y se representó mediante Krona en una gráfica circular multicapa (**Imagen 5**). Tal y como puede observarse, el programa ofreció varias identificaciones con probabilidades distintas. *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serovar Infantis, la bacteria identificada mediante ensayos bioquímicos y de serotipificación en nuestros aislados, arrojó una probabilidad del 14%. El resto de subespecies de *Salmonella* sin identificar arrojaron una probabilidad conjunta del 58% y los serovares Bareilly, Newport, Enteridis y Typhimurrium tuvieron una probabilidad mucho menor entre el 2 y el 8%. Estos

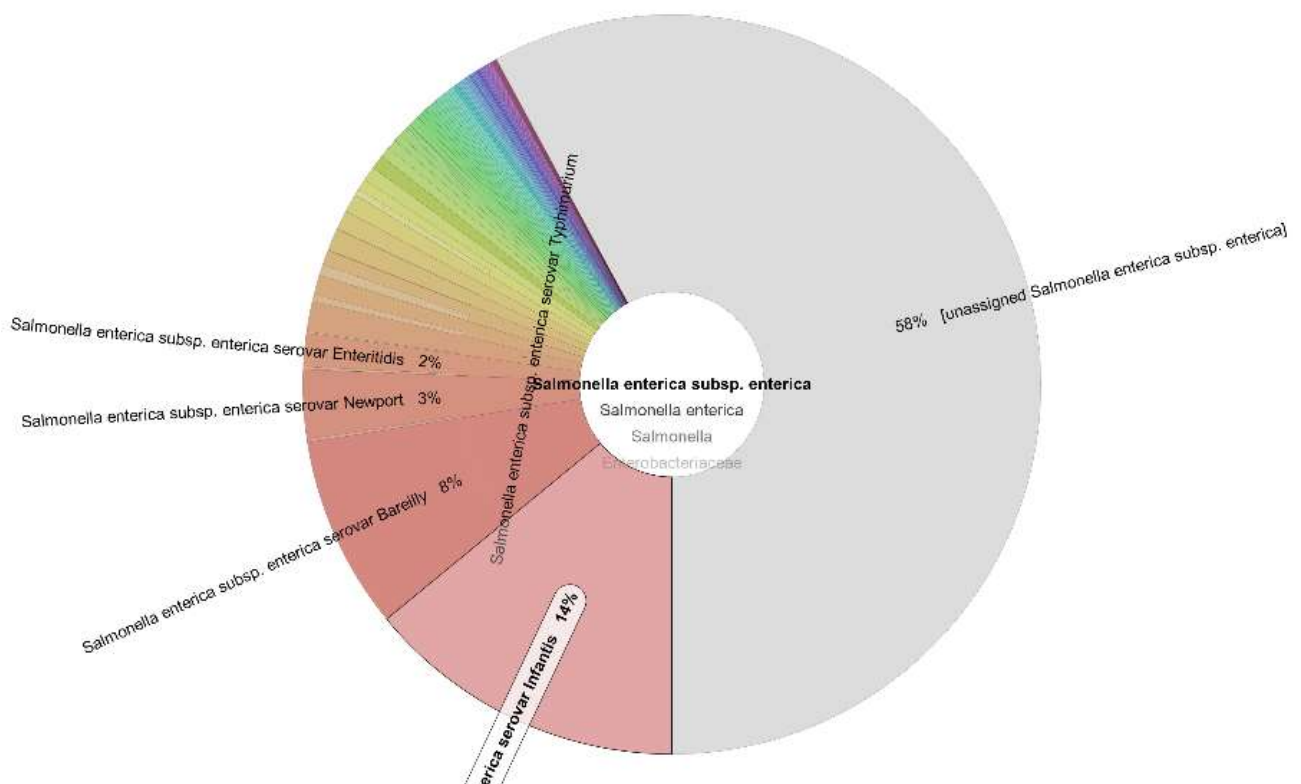


Imagen 5. Identificación bacteriana con base en las proteínas empleando la herramienta bioinformática Kaiju – Krona.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

resultados sugieren que nuestro aislado corresponde a *Salmonella entérica* subespecie *entérica* serovar Infantis.

3.3.2.2. Clasificación taxonómica por nucleótidos

Con la finalidad de comparar el análisis taxonómico obtenido en base a las proteínas con la identificación genómica, se procedió a esta última mediante la herramienta GenomePeek la cual analiza las secuencias nucleotídicas de 4 genes distintos conservados en bacterias: 16s, *recA*, *rpoB* y *groEL*. Como se observa en la **Tabla 11**, se logró una identificación, con el 100% de identidad, con los genes *recA* y *rpoB*.

Tabla 11 Identificación microbiana con GenomePeek

Microorganismo	16S	<i>recA</i>	<i>rpoB</i>	<i>GroEL</i>
<i>Salmonella enterica</i>	99.60%	100%	100%	93.20%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0.30%	-	-	-
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	0.10%	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	6.80%

3.3.3. Tipificación de secuencia multilocus (MLST)

De igual manera se procedió a usar MLST 2.0 con la finalidad de obtener un perfil de secuencias multilocus asociado al aislamiento obtenido mediante la lectura de los genes *housekeeping* *aroC*, *dnaN*, *hemD*, *hisD*, *purE*, *sucA* y *thrA* que están conservados en esta especie de microorganismo. Las variantes alélicas para los genes analizados fueron: *aroC*-17, *dnaN*-18, *hemD*-22, *hisD*-17, *purE*-5, *sucA*-21 y *thrA*-19, lo que corresponde a la secuencia tipo ST-32 de *Salmonella*.

3.3.4. Determinación de serotipo de *Salmonella enterica*

Una vez obtenidos estos datos se procedió con el análisis de confirmación de serotipo bacteriano con ayuda de la plataforma SeqSero 1.0, que organiza el genoma basado en el esquema Kauffmann White de serotipificación. De esta manera se confirmó el serotipo del patógeno estudiado, como se muestra en la **Tabla 12**, es decir, *Salmonella entérica* serotipo Infantis.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Tabla 12 Resultado de tipificación bacteriana por SeqSero

<i>Gen identificado</i>	<i>Resultado</i>
<i>Antígeno O</i>	<i>O-7</i>
<i>Antígeno H1 (fliC)</i>	<i>R</i>
<i>Antígeno H2 (fljB)</i>	<i>1,5</i>
<i>Perfil antigenico</i>	<i>7:r:1,5</i>
<i>Serotipo</i>	<i>Infantis</i>

3.3.5. Análisis de genes de resistencia

Con el uso de la herramienta ABRicate, se realizó la búsqueda de los principales genes de resistencia a los antimicrobianos, comparando la secuencia de nuestro aislado con las bases de datos NCBI, CARD, ARG-ANNOT, Resfinder, MEGARES, EcOH, PlasmidFinder, Ecoli_VF y VFDB. Los genes de resistencia encontrados se muestran en la **Tabla 12**.

Dentro de los principales genes asociados a resistencia se encuentra CTX-M-65 que es una beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) y confiere resistencia a cefalosporinas de tercera generación que son clínicamente muy importantes y empleadas en el tratamiento frente a salmonelosis que en ocasiones se vuelve una infección invasiva. También encontramos *blaKPC-2* que es una carbapenemasa tipo KPC-2 y que genera resistencia a gran parte de las familias de antibióticos penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas y carbapenémicos.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN SALMONELLA INFANTIS blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.

Tabla 13 Detección de genes de resistencia con ABRicate (Base de datos Resfinder)

<i>Sentido</i>	<i>% de cobertura</i>	<i>% de identidad</i>	<i>Numero de acceso</i>	<i>Gen de resistencia</i>	<i>Antibióticos afectados</i>
5'-3'	100	97.49	NC_003197	aac(6')-Iaa	Amicacina; Tobramicina
3'-5'	100	100	AY034847	blaKPC-2	Amoxicilina; Amoxicilina+Acido clavulanico Ampicilina; Ampicilina+Acido clavulanico; Aztreonam; Cefepime; Cefotaxime; Cefoxitin; Ceftazidime; Ertapenem; Imipenem; Meropenem; Piperacilina; Piperacilina+Tazobactam; Ticarcillin; Ticarcilina+Acido clavulanico Estreptomina
5'-3'	99.59	99.38	X02340	ant(3'')-Ia	Estreptomina
5'-3'	100	99.89	EU780013	sul1	Sulfamethoxazole
5'-3'	97.8	100	AF534183	tet(A)	Doxiciclina; Tetraciclina
5'-3'	100	99.79	DQ388123	dfrA14	Trimethoprima
3'-5'	99.92	98.19	AF118107	floR	Chloramfenicol; Florfenicol
3'-5'	100	100	V01499	aph(4)-Ia	--
3'-5'	99.87	99.87	X01385	aac(3)-IVa	Gentamicina; Tobramicina
5'-3'	100	100	EF418608	blaCTX-M-65	Amoxicilina; Ampicilina; Aztreonam; Cefepima; Cefotaxima; Ceftazidima; Ceftriaxona; Piperacilina; Ticarcilina
3'-5'	100	100	X62115	aph(3')-Ia	--

3.3.6. Determinación de tipo de plásmidos encontrados en Salmonella Infantis

Con la finalidad de identificar y tipificar los posibles plásmidos que acarrean estos mecanismos de resistencia se procedió con el uso de la herramienta PlasmidFinder 2.0 mediante la que se identificaron los plásmidos descritos en la **Tabla 14** con una identidad mayor al 99%. Los plásmidos encontrados en *E. coli* fueron IncM1 y IncX4, cuyas características se discuten más abajo.

Tabla 14 Plásmidos detectados por PlasmidFinder 2.0 en Salmonella Infantis y el transconjugado *E. coli* J53.

<i>Microorganismo</i>	<i>Plásmidos detectados</i>
<i>Salmonella Infantis</i>	IncFIB(pN55391), IncM1, IncX4.
Transconjugado <i>E. coli</i> J53	IncM1, IncX4

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

4. DISCUSIÓN

Salmonella Infantis ha ganado importancia en los últimos años para los sistemas de vigilancia a nivel mundial ya que se ha convertido en un portador y posible diseminador de genes de resistencia a múltiples fármacos tanto en la sanidad animal, la cadena de producción alimentaria, así como en las infecciones asociadas a la atención en salud. Pese a que posee menos factores de virulencia que otros serotipos como Typhimurium, tiene la capacidad de incorporar genes de resistencia, lo que representa una amenaza en los casos de salmonelosis humana reportados (Possebon et al., 2020).

Actualmente, en los laboratorios de microbiología clínica se aplican técnicas manuales (cultivo microbiológico, pruebas bioquímicas, medios cromogénicos o inmunocromáticos) y por sistemas automatizados, semiautomatizados y miniaturizados para la identificación de *Salmonella*. No obstante, estas metodologías no logran siempre confirmar la especie bacteriana a la que corresponde el aislamiento de estudio. Para superar estos problemas el empleo de herramientas como el análisis bioinformático de genoma completo ha ido evolucionando en los últimos años. La serotipificación de *Salmonella spp.* es considerado aún como el *Gold Standard* pero conlleva elevados costos de implementación, como menciona Ibrahim (2018): es una técnica laboriosa con un tiempo de respuesta de 1 a 3 semanas, dependiendo de la dificultad de identificación, porque algunos serotipos expresan antígenos que con tan solo una mutación puntual no provocan aglutinación (Ibrahim & Morin, 2018; Li et al., 2017). Los análisis de serotipo con nuevas tecnologías de análisis genómico como SeqSero facilitan su implementación y la reducción de costos operativos para la caracterización de *Salmonella spp.*, ya que usan los mismos algoritmos que la técnica *Gold Standard* para su clasificación. Si bien los análisis genómicos requieren de alta inversión en equipamiento y conocimientos técnicos específicos, nos proporcionan información biológica relevante para alimentar la base epidemiológica del territorio de estudio. En el presente estudio se realizó la serotipificación de nuestro aislado mediante el *Gold Standard* y mediante la herramienta SeqSero de análisis genómico y con ambos métodos se logró el mismo resultado: *Salmonella entérica* subesp. *entérica* serovar Infantis. (Ibrahim & Morin, 2018; Zhang et al., 2015).

En cuanto al perfil de susceptibilidad a antibióticos obtenido para el aislamiento analizado, éste presentó un patrón propio de microorganismos XDR's. Se observó, de acuerdo con los puntos de corte establecidos en CLSI 2021, resistencia a los carbapenémicos meropenem, imipenem y ertapenem, y a cefalosporinas de 3ra y 4ta generación e inhibidores de β - lactamasas y

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

monobactamicos (Munoz-Price et al., 2013). Esto indicaba la presencia de una carbapenemasa, que se confirmó por los ensayos de sinergia y los análisis genotípicos posteriores tal y como se indica en el apartado de resultados. Estos estudios genotípicos también nos permitieron indentificar esta carbapenemasa como una *blaKPC*-2.

Los estudios de genoma completo nos proporcionan información completa del genoma de un microorganismo y detectan la ubicación ya sea en plásmidos o en el genoma de los determinantes de la RAM (WHO, 2020). Además, esta técnica permite identificar genes y mecanismos de resistencia que en los estudios fenotípicos de sensibilidad (antibiogramas) serían opacados por mecanismos de resistencia más potentes. Este es el caso de *blaKPC*-2, un enzima que modifica la mayor parte de familias de antibióticos confiriendo resistencia frente a los mismos. Por ejemplo, la CTX-M65, una betalactamasa de espectro extendido (BLEE) confiere resistencia contra cefalosporinas y su efecto se ve opacado a nivel fenotípico por la presencia de *blaKPC*-2 que confiere resistencia contra este mismo grupo y otros grupos de antibióticos.

Vinueza – Burgos en el 2019 y Mejía en el 2020, describieron el hallazgo de fenotipos de *Salmonella* Infantis productores de β - lactamasas de Espectro Extendido (BLEE) de tipo CTX-M-65 en Ecuador, enfatizando que estos patrones de resistencia pueden tener implicaciones para el manejo de estos microorganismos multirresistentes. Por otro lado, a nivel mundial se han encontrado los siguientes fenotipos de *Salmonella* entérica *blaKPC* positivos: serotipo Cubana (USA, 1998), proveniente de heces humanas presentando no susceptibilidad a β – lactámicos, inhibidores de β – lactamasa, cefalosporinas y monobactames (Miriagou et al., 2003); serotipo Typhimurium (Colombia, 2013), proveniente de hemocultivo presentando resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas, monobactames, gentamicina, no susceptibilidad a ciprofloxacina y susceptibilidad a SXT (Rodríguez et al., 2014); serotipo Schwarzengrund (Argentina, 2013), proveniente de catéter urinario presentando resistencia a los β -lactámicos, monobactames, no susceptibilidad a carbapenémicos, y fluoroquinolonas, susceptibilidad a gentamicina, amikacina, cloranfenicol, trimetoprima más sulfametoxazol, tigeciclina y fosfomicina (Jure et al., 2014); serotipo Javiana (Paraguay, 2017), proveniente de heces presentando resistencia a carbapenémicos, cefalosporinas, monobactames, gentamicina, no susceptibilidad a ciprofloxacina y susceptibilidad a SXT (Melgarejo *et al*, 2017). Sin embargo, no se ha informado hasta la fecha, de una *Salmonella* entérica serotipo Infantis con este tipo de resistencia, lo que convierte a este trabajo en el primer reporte al respecto.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

La tipificación multilocus de secuencias del aislamiento de estudio permitió identificarlo como *Salmonella* Infantis secuencia tipo ST-32. Éste es uno de los más persistentes y del cual existen varios reportes en Suiza, Australia, Brasil y Ecuador donde se asocia con la cadena de producción alimentaria, concretamente en ganglios linfáticos de cerdos, huevos y carcasas de pollo. A su vez, estos estudios mencionan que existe relación de esta secuencia tipo con casos de gastroenteritis humana en diferentes regiones geográficas, lo cual es de gran preocupación, y da una idea de que las cadenas productivas de alimentos derivados de aves y cerdos pueden permitir la diseminación de este patógeno en mayor o menor grado (Possebon et al., 2020; Sodagari et al., 2019). Hindermann, (2017) asocia esta secuencia tipo con la transferencia de betalactamasa de espectro extendido CTX-M-65. Nuestro aislado, además de la *blaKPC-2*, posee también este gen de resistencia.

Uno de los mecanismos más usuales para la transferencia horizontal de genes de resistencia entre géneros de bacterias distintos son los plásmidos. Como menciona el estudio de Fernández et al (2018), la transferencia horizontal mediante plásmidos puede estar asociada a reservorios animales donde puede provocarse la transferencia bi-direccional de estos entre bacterias como demostró el ensayo de conjugación en nuestro estudio. En éste se logró el crecimiento del microorganismo receptor del gen de resistencia a carbapenémicos (*E. coli* J53), el cual presentó un patrón de susceptibilidad a carbapenémicos igual al que fue encontrado en la célula donadora. De igual manera, se determinó resistencia a cefalosporinas de 3ra generación, penicilinas y monobactámicos. Los resultados del ensayo reflejan la capacidad conjugativa de los plásmidos encontrados en *Salmonella* Infantis, incluyendo el responsable de la resistencia a carbapenemes tal y como lo mencionan los estudios de (Dong et al., 2018; Falco et al., 2017; Hardiman et al., 2016; Munoz-Price et al., 2013; Rada et al., 2019), donde se demostró la transferencia directa de la carbapenemasa tipo *blaKPC* partiendo de *Klebsiella pneumoniae*, inducida mediante presión antibiótica selectiva (Fernández et al., 2018).

En este estudio se identificaron dos plásmidos que fueron transferidos en el ensayo de conjugación bacteriana: IncM1 que, según reportes, se asocia con genes de resistencia a los antimicrobianos de tipo BLEE (CTX-M-3, SHV-5), carbapenemasas de clase A (incluido *blaKPC*), B y D, AmpC y resistencia a aminoglucósidos y quinolonas (Carattoli et al., 2015; Cunha et al., 2017); y el plásmido IncX4 que ha sido reportado como portador de otros genes importantes como *mcr-1* que produce la resistencia a colistina (Manageiro et al., 2019; Sun et al., 2017; Wang et al., 2017).

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Este tipo de aislamientos son muy raros, pero proporcionan evidencia de como un mal uso de los antimicrobianos puede provocar la diseminación de este tipo de genes de resistencia que lograrán crear microorganismos no susceptibles a todos o a la mayor parte de los agentes y categorías de antimicrobianos (MDR's, XDR's o PDR's). Empleando análisis de genoma completo podemos fomentar una detección temprana de estos aislamientos con la finalidad de implementar medidas apropiadas para evitar su diseminación.

5. CONCLUSIONES

- **Este es el primer reporte de *Salmonella* Infantis *blaKPC* positiva proveniente de un aislado clínico en el mundo**
- Las herramientas de WGS facilitan la identificación de determinantes genéticos en microorganismos MDR's y XDR's e incluso identifican los genes opacados por mecanismos de resistencia de un espectro más amplio. Esto podría mejorar los sistemas de vigilancia epidemiológica de las posibles fuentes de transferencia de mecanismos de resistencia para su contención y tratamiento efectivo.
 - Se determinó la presencia de 11 genes de resistencia asociados al fenotipo *Salmonella* Infantis incluidos *blaKPC* y *CTX-M-65*, que han sido reportados en otras muestras de origen animal y humano y en serotipos de *Salmonella* distintos.
 - Se identificaron dos plásmidos conjugables *IncM1*, que se encuentran asociados a la portabilidad de mecanismos de resistencia principalmente a betalactamasas y carbapenemasas y *IncX4* asociado a la portabilidad de mecanismos de resistencia a colistina.
 - Se determinó que el aislado de *Salmonella* Infantis detectado pertenece a la Secuencia Tipo *ST-32*, una de las más prevalentes en el serotipo, reportada principalmente en infecciones transmitidas por alimentos a humanos y detectadas en la cadena productiva alimentaria.

6. RECOMENDACIONES

- Concienciar sobre el uso de este tipo de tecnología como una herramienta eficaz rápida y complementaria al diagnóstico microbiológico. Los análisis de última generación pueden ser comparados entre distintos laboratorios a nivel mundial mediante análisis

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

metagenómicos lo que podría discriminar la posible transferencia de microorganismos entre animales y humanos, y entre distintas locaciones.

- Estandarizar un *pipeline* de lectura que permita realizar estos análisis de una manera más ágil con la finalidad de mejorar la vigilancia epidemiológica de microorganismos con mecanismos de resistencia asociados.

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van Den Beek, M., Bouvier, D., Ech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A., & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W537–W544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Andrews, S. (n.d.). *FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data*.
- Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. In *Essays in Biochemistry* (Vol. 61, Issue 1, pp. 49–59). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/EBC20160063>
- 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>
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotkin, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, *19*(5), 455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (n.d.). *Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. *Bioinformatics*, *30*(15), 2114–2120. 2014. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Burgmann, H., Hiesmayr, J. M., Savey, A., Bauer, P., Metnitz, B., & Metnitz, P. G. H. (2010). Impact of nosocomial infections on clinical outcome and resource consumption in critically ill patients. *Intensive Care Medicine*, *36*(9), 1597–1601. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-1941-2>

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN SALMONELLA INFANTIS blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.

Caldera Gutiérrez, F. J., & Robles Cortes, D. A. (2017). *Caracterización fenotípica de bacilos*

Gram negativos resistentes a carbapenemase procedentes de la red Nicaragüense para la vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos, Nicaragua, Enero del 2014-Diciembre del 2016.

Calero-Cáceres, W., Villacís, J., Ishida, M., Burnett, E., & Vinueza-Burgos, C. (2020).

Whole-Genome Sequencing of *Salmonella enterica* Serovar Infantis and Kentucky Isolates Obtained from Layer Poultry Farms in Ecuador. *Microbiology Resource Announcements*, 9(13). <https://doi.org/10.1128/mra.00091-20>

Carattoli, A., Seiffert, S. N., Schwendener, S., Perreten, V., & Endimiani, A. (2015).

Differentiation of IncL and IncM plasmids associated with the spread of clinically relevant antimicrobial resistance. *PLoS ONE*, 10(5).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123063>

Carattoli, A., Zankari, E., Garcíá-Fernández, A., Larsen, M. V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup,

F. M., & Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(7), 3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>

CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. *U.S. Department of*

Health and Human Services. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>

Clausen, P. T. L. C., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2018). Rapid and precise alignment of raw

reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics*, 19(1).

<https://doi.org/10.1186/s12859-018-2336-6>

Coll, P., Coque, T. M., Domínguez, M. A., Vázquez, J., & Vila, J. (2005). *Metodos*

moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología (E. Cercenado & R. Cantón (eds.); SEMIC). SEMIC.

Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P.,

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

- Zanetti, G., & Fotia, G. (2014). Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. *Bioinformatics*, 30(13), 1928–1929.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu135>
- Cunha, M. P. V., Davies, Y. M., Cerdeira, L., Dropa, M., Lincopan, N., & Knöbl, T. (2017). Complete DNA sequence of an incm1 plasmid bearing the novel qnre1 plasmid-mediated quinolone resistance variant and blaCTX-M-8 from klebsiella pneumoniae sequence type 147. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 61, Issue 9). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/AAC.00592-17>
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial resistance: implications and costs. In *Infection and Drug Resistance* (Vol. 12, pp. 3903–3910). Dove Medical Press Ltd.
<https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Dong, N., Lin, D., Zhang, R., Chan, E. W.-C., & Chen, S. (2018). Carriage of blaKPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent Klebsiella pneumoniae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(12), 3317–3321. <https://doi.org/10.1093/jac/dky358>
- Dortet, L., Cuzon, G., Ponties, V., & Nordmann, P. (2017). Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Eurosurveillance*, 22(6), 30461.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.6.30461>
- Falco, A., Barrios, Y., Torres, L., Sandrea, L., & Takiff, H. (2017). Epidemiología molecular de aislados clínicos de Klebsiella pneumoniae productores de carbapenemasas tipo KPC provenientes de dos hospitales públicos en los estados Carabobo y Zulia, Venezuela. *Investigación Clínica*, 58(1), 003–021.
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0535-51332017000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Fernández, J., Guerra, B., & Rodicio, M. (2018). Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella* enterica Serovars from Humans, Animals and Food. *Veterinary*

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Sciences, 5(2), 40. <https://doi.org/10.3390/vetsci5020040>

Gómez, J., García-Vázquez, E., & Hernández-Torres, A. (2015). Los betalactámicos en la práctica clínica. *Rev Esp Quimioter*, 28(1), 1–9.

Hardiman, C. A., Weingarten, R. A., Conlan, S., Khil, P., Dekker, J. P., Mathers, A. J., Sheppard, A. E., Segre, J. A., & Frank, K. M. (2016). Horizontal transfer of carbapenemase-encoding plasmids and comparison with hospital epidemiology data. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(8), 4910–4919.

<https://doi.org/10.1128/AAC.00014-16>

Ibrahim, G. M., & Morin, P. M. (2018). *Salmonella* Serotyping Using Whole Genome Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 9(DEC), 2993.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02993>

Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A. M., & Maldonado, L. (2012).

Klebsiella pneumoniae productora de carbapenemasa tipo KPC-2: primer reporte en el Ecuador. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas (Quito)*, 37(1–2), 40–43.

https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/CIENCIAS_MEDICAS/article/view/1087

Jure, M. A., Duprilot, M., Musa, H. E., López, C., De Castillo, M. C., Weill, F. X., Arlet, G., & Decré, D. (2014). Emergence of KPC-2-producing *Salmonella enterica* serotype Schwarzengrund in Argentina. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 58, Issue 10, pp. 6335–6336). American Society for Microbiology.

<https://doi.org/10.1128/AAC.03322-14>

Kollef, M. H., Sharpless, L., Vlasnik, J., Pasque, C., Murphy, D., & Fraser, V. J. (1997). The impact of nosocomial infections on patient outcomes following cardiac surgery. *Chest*, 112(3), 666–675. <https://doi.org/10.1378/chest.112.3.666>

Larsen, M. V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R. L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D. W., Aarestrup, F. M., & Lund, O. (2012). Multilocus

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

- sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1355–1361. <https://doi.org/10.1128/JCM.06094-11>
- Li, P., Liu, Q., Luo, H., Liang, K., Yi, J., Luo, Y., Hu, Y., Han, Y., & Kong, Q. (2017). O-serotype conversion in *Salmonella typhimurium* induces protective immune responses against invasive non-typhoidal *Salmonella* infections. *Frontiers in Immunology*, 8(DEC), 1647. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01647>
- Manageiro, V., Clemente, L., Romão, R., Silva, C., Vieira, L., Ferreira, E., & Caniça, M. (2019). IncX4 plasmid carrying the new mcr-1.9 gene variant in a CTX-M-8producing *Escherichia coli* isolate recovered from swine. *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00367>
- McNair, K., & Edwards, R. A. (2015). GenomePeek-an online tool for prokaryotic genome and metagenome analysis. *PeerJ*, 2015(6), e1025. <https://doi.org/10.7717/peerj.1025>
- Mejia, L., Vela, G., & Zapata, S. (2021). High Occurrence of Multiresistant *Salmonella* Infantis in Retail Meat in Ecuador. *Foodborne Pathogens and Disease*, 18(1), 41–48. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2808>
- Méndez, I., Méndez, I. A., Badillo, C. A., Parra, G. O., & Faccini, Á. A. (2011). Caracterización microbiológica de *Salmonella* en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia. Julio a octubre de 2010. *Médicas UIS*, 24(1). <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistamedicasuis/article/view/2559>
- Menzel, P., Ng, K. L., & Krogh, A. (2016). Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nature Communications*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms11257>
- Miriagou, V., Tzouvelekis, L. S., Rossiter, S., Tzelepi, E., Angulo, F. J., & Whichard, J. M. (2003). Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(4), 1297–

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

1300. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1297-1300.2003>

Munoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., Cornaglia, G., Garau, J., Gniadkowski, M., Hayden, M. K., Kumarasamy, K., Livermore, D. M., Maya, J. J., Nordmann, P., Patel, J. B., Paterson, D. L., Pitout, J., Villegas, M. V., Wang, H., ... Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*, *13*(9), 785–796. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7)

Murray, J. L., Kwon, T., Marcotte, E. M., & Whiteley, M. (2015). Intrinsic antimicrobial resistance determinants in the superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, *6*(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01603-15>

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(10), 1791–1798. <https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>

Olaechea, P. M., Insausti, J., Blanco, A., & Luque, P. (2010). Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales ARTICLE IN PRESS. *Med Intensiva*, *34*(4), 256–267. <https://doi.org/10.1016/j.medin.2009.11.013>

OMS. (2021a). *Importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública*. Vigilancia de La Resistencia Uso de Los Antimicrobianos Vigilancia Del Uso de Los Antimicrobianos Prevención de Las Infecciones Actividades Documentación Importancia de La Resistencia a Los Antimicrobianos Para La Salud Pública. https://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/es/

OMS. (2021b). *Salmonella (no tifoidea)*. [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinformatics*, *12*. <https://doi.org/10.1186/1471->

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

2105-12-385

- Pardo Barón, S. Y. (2020). *Enfermedades Transmitidas Por Alimentos (ETA) De Origen Microbiano Asociadas A Carne, Productos Cárnicos Comestibles Y Derivados Cárnicos En Colombia*. <http://repository.unad.edu.co/handle/10596/36204>
- Possebon, F. S., Tiba Casas, M. R., Nero, L. A., Yamatogi, R. S., Araújo, J. P., & Pinto, J. P. de A. N. (2020). Prevalence, antibiotic resistance, PFGE and MLST characterization of *Salmonella* in swine mesenteric lymph nodes. *Preventive Veterinary Medicine*, 179, 105024. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105024>
- 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>
- Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., Villegas, M. V., Rada, A. M., Hernández-Gómez, C., Restrepo, E., & Villegas, M. V. (2019). Distribución y caracterización molecular de betalactamasas en bacterias Gram negativas en Colombia, 2001-2016. *Biomédica*, 39, 199–220. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v39i3.4351>
- Reyes, J., Cárdenas, P., Tamayo, R., Villavicencio, F., Aguilar, A., Melano, R. G., & Trueba, G. (2020). Characterization of *bla*_{KPC-2} -Harboring *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Mobile Genetic Elements from Outbreaks in a Hospital in Ecuador. *Microbial Drug Resistance*, mdr.2019.0433. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0433>
- Rodríguez, E., Bautista, A., & Barrero, L. (2014). First report of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolate with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. In *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Vol. 58, Issue 2, pp. 1263–1264). <https://doi.org/10.1128/AAC.02423-13>

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14),

2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>

Seemann, T. (2016). *ABRicate: mass screening of contigs for antibiotic resistance genes*.

<https://github.com/tseemann/abricate>

Sodagari, H. R., Mohammed, A. B., Wang, P., O’Dea, M., Abraham, S., Robertson, I., &

Habib, I. (2019). Non-typhoidal *Salmonella* contamination in egg shells and contents

from retail in Western Australia: Serovar diversity, multilocus sequence types, and

phenotypic and genomic characterizations of antimicrobial resistance. *International*

Journal of Food Microbiology, 308, 108305.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108305>

Sun, J., Fang, L. X., Wu, Z., Deng, H., Yang, R. S., Li, X. P., Li, S. M., Liao, X. P., Feng, Y.,

& Liu, Y. H. (2017). Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique

Pattern in the *mcr-1* Acquisition. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.

<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00095-x>

Tejeda-Rosales, E., Sánchez-Tejeda, G., Sánchez-Tejeda, J. F., Sánchez-Ruiz, J. F., &

González-Ochoa, G. (2020). Análisis taxonómico mediante química computacional de

betalactamasas. *Rev Mex Med Forense*, 5, 9–12.

van Duin, D., & Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing

Enterobacteriaceae. In *Virulence* (Vol. 8, Issue 4, pp. 460–469). Taylor and Francis Inc.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>

Villagómez Estrada, S., Logacho Pilataxi, M., & Vinueza Burgos, C. (2017). Presencia y

Resistencia a los Antimicrobianos de serovariedades de *Salmonella enterica* aisladas en

una empresa avícola integrada del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias*

Biológicas, 38(1), 11–24. <https://doi.org/10.26807/remcb.v38i1.17>

Vinueza-Burgos, C., Cevallos, M., Ron-Garrido, L., Bertrand, S., & De Zutter, L. (2016).

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Prevalence and Diversity of *Salmonella* Serotypes in Ecuadorian Broilers at Slaughter

Age. *PLOS ONE*, 11(7), e0159567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159567>

Wang, Q., Sun, J., Li, J., Ding, Y., Li, X. P., Lin, J., Hassan, B., & Feng, Y. (2017).

Expanding landscapes of the diversified *mcr-1*-bearing plasmid reservoirs. *Microbiome*, 5(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0288-0>

WHO. (2020, September 22). *GLASS whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240011007>

Zhang, S., Yin, Y., Jones, M. B., Zhang, Z., Kaiser, B. L. D., Dinsmore, B. A., Fitzgerald, C.,

Fields, P. I., & Deng, X. (2015). *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(5), 1685–1692. <https://doi.org/10.1128/JCM.00323-15>

Zurita, J., Alcocer, I., Ortega-Paredes, D., Barba, P., Yauri, F., Iñiguez E, D., & Mora, M.

(2013). Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. In *Integrative Medicine Research* (Vol. 1, pp. 229–230).

<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2013.06.001>

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación de las carbapenemasas según Ambler & Bush	12
Tabla 2 Reactivos.....	16
Tabla 3 Medios de Cultivo	17
Tabla 4 Discos de Antibiótico e inhibidores	18
Tabla 5 Primers usados en estudio	18
Tabla 6 Equipos	19
Tabla 7 Herramientas bioinformáticas usadas	19
Tabla 8 Pruebas de identificación fenotípica convencional, batería bioquímica	27
Tabla 9 Perfil de susceptibilidad de <i>Salmonella enterica</i> subesp. <i>Infantis</i>	29
Tabla 10 Análisis de susceptibilidad de <i>E. coli</i> J53 tras el ensayo de conjugación bacteriana	31
Tabla 11 Identificación microbiana con GenomePeek	35
Tabla 12 Resultado de tipificación bacteriana por SeqSero	36
Tabla 13 Detección de genes de resistencia con ABRicate (Base de datos Resfinder)	37
Tabla 14 Plásmidos detectados por PlasmidFinder 2.0 en <i>Salmonella Infantis</i> y el transconjugado <i>E. coli</i> J53. .	37

**GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES
GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS
blaKPC AISLADAS EN ECUADOR.**

Índice de figuras

Imagen 1 Detección fenotípica de Sinergias de carbapenémicos con APB y EDTA.....	28
Imagen 2 Crecimiento de tranconjugantes E. coli J53 en medio con azida de sodio y carbapenémico.....	30
Imagen 3 PCR multiplex para detección de carbapenemasas en aislados de Salmonella Infantis.....	32
Imagen 4 Análisis de la calidad de las secuencias obtenidas a partir del aislado de Salmonella Infantis y transcojugante Escherichia Coli J53, empleando la herramienta bioinformática fastQC.....	33

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Anexos

Anexo1

Secuencia consenso de *blaKPC* obtenida en herramienta ClustalW de Geneious R9

>UniKPC_consensus_sequence Alignment of 2 sequences: 181010-022_C23_SAL-A_UKPCF.ab1, 181010-022_I23_SAL-A_UKPCR.ab1 (reversed)

CGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTGACCAACCT
CGTCGCGGAACCATTTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGA
TACCGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCCTGTGCAGCTCATTCAA
GGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGCAGGCCGGCTTGCTGGACACACCCAT
CCGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCGTTGGTCACCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCAT
GACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCCGCTGCAATACAGTGATAACGCCGCCCAATTTGTTGCT
GAAGGAGTTGGGCGGCCCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATAACACGTTCCG
TCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCCATCCCAGGCGATGCGCGGATAACCTCATCGCC
GCGCGCCGTGACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGCAGCGGC
AGCAGTTTGTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGGCGGTGCCG
GCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGACTATGC
CGTCGTCTGGCCCACTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGGGCGCCTAACAAGGA
TGACAAGCACAGCGAGGCCGTCATCGCCGCTGCGGCTAGACTCGCGCTCGAGGGATTGG

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

Anexo 2

Alineamiento consenso de *blaKPC-2* con plataforma Megablast en Geneious R9

>MT269836 *Klebsiella pneumoniae* strain BSI058 plasmid pBSI058-KPC2

Length = 114712

E-value = 0,

Score = 850,

Bitscore = 1570.77,

Identities = 850/850 (100%), Positives = 850/850 (100%),

Gaps = 0/850 (0%)

Frame = +1

```
UniKPC consensus sequence 1 CGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTG 60
CGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTG
MT269836 96223 CGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGCTGGCTTTTCTGCCACCGCGCTG 96164

UniKPC consensus sequence 61 ACCAACCTCGTCGCGGAACCATTTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGT 1
20
ACCAAACCTCGTCGCGGAACCATTTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGT
MT269836 96163 ACCAACCTCGTCGCGGAACCATTTCGCTAAACTCGAACAGGACTTTGGCGGCTCCATCGGT 96104

UniKPC consensus sequence 121 GTGTACGCGATGGATAACGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTC
180
GTGTACGCGATGGATAACGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTC
MT269836 96103 GTGTACGCGATGGATAACGGCTCAGGCGCAACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTC 96044

UniKPC consensus sequence 181 CCACTGTGCAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAG 2
40
CCACTGTGCAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAG
MT269836 96043 CCACTGTGCAGCTCATTCAAGGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAG 95984

UniKPC consensus sequence 241 CAGGCCGGCTTGCTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCA
300
CAGGCCGGCTTGCTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCA
MT269836 95983 CAGGCCGGCTTGCTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCCGTGGTCA 95924

UniKPC consensus sequence 301 CCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCGCC
360
CCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCGCC
MT269836 95923 CCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTCCGCGGCCGCC 95864

UniKPC consensus sequence 361 GTGCAATACAGTGATAACGCCGCCCAATTTGTTGCTGAAGGAGTTGGGCGGCCCGGCC
420
GTGCAATACAGTGATAACGCCGCCCAATTTGTTGCTGAAGGAGTTGGGCGGCCCGGCC
MT269836 95863 GTGCAATACAGTGATAACGCCGCCCAATTTGTTGCTGAAGGAGTTGGGCGGCCCGGCC 95804

UniKPC consensus sequence 421 GGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGCTCTGGACCGCTGGGAG 4
80
GGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGCTCTGGACCGCTGGGAG
MT269836 95803 GGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGCTCTGGACCGCTGGGAG 95744

UniKPC consensus sequence 481 CTGGAGCTGAACTCCGCCATCCAGGCGATGCGCGGATACCTCATCGCCGCGCGCCGTG
540
CTGGAGCTGAACTCCGCCATCCAGGCGATGCGCGGATACCTCATCGCCGCGCGCCGTG
MT269836 95743 CTGGAGCTGAACTCCGCCATCCAGGCGATGCGCGGATACCTCATCGCCGCGCGCCGTG 95684

UniKPC consensus sequence 541 ACGGAAAGCTTACAAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGAGCGGCAGCAG
600
ACGGAAAGCTTACAAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGAGCGGCAGCAG
MT269836 95683 ACGGAAAGCTTACAAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGAGCGGCAGCAG 95624

UniKPC consensus sequence 601 TTTGTTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGCGGTGCCG
660
TTTGTTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGCGGTGCCG
MT269836 95623 TTTGTTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGCAACCACCGCATCCGCGCGCGGTGCCG 95564

UniKPC consensus sequence 661 GCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGAC
720
GCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGAC
MT269836 95563 GCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAGTGTATGGCACGGCAAATGAC 9550
4
```

GENOTIPIFICACION Y CARACTERIZACION DE DETERMINANTES GENETICOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *SALMONELLA* INFANTIS *blaKPC* AISLADAS EN ECUADOR.

UniKPC consensus sequence 721 TATGCCGTCGTCTGGCCCACTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGGGCG 7
80
TATGCCGTCGTCTGGCCCACTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGGGCG
MT269836 95503 TATGCCGTCGTCTGGCCCACTGGGCGCGCACCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGGGCG 95444

UniKPC consensus sequence 781 CCTAACAAGGATGACAAGCACAGCGAGGCCGTCATCGCCGCTGCGGCTAGACTCGCGCTC
840
CCTAACAAGGATGACAAGCACAGCGAGGCCGTCATCGCCGCTGCGGCTAGACTCGCGCTC
MT269836 95443 CCTAACAAGGATGACAAGCACAGCGAGGCCGTCATCGCCGCTGCGGCTAGACTCGCGCTC 95384

UniKPC consensus sequence 841 GAGGGATTGG 850
GAGGGATTGG
MT269836 95383 GAGGGATTGG 95374

Klebsiella pneumoniae strain BSI058 plasmid pBSI058-KPC2

1 10 20 30 40 50
| | | | |
CGTCTAGTTCTGCTGTCTTGTCTCTCATGGCCGCTGGCTGGCTTTTCTGC
CACCGCGCTGACCAACCTCGTCGCGGAACCATTCGCTAAACTCGAACAGG
ACTTTGGCGGCTCCATCGGTGTGTACGCGATGGATACCGGCTCAGGCGCA
ACTGTAAGTTACCGCGCTGAGGAGCGCTTCCCACTGTGCAGCTCATTCAA
GGGCTTTCTTGCTGCCGCTGTGCTGGCTCGCAGCCAGCAGCAGGCCGGCT
TGCTGGACACACCCATCCGTTACGGCAAAAATGCGCTGGTTCGGTGGTCA
CCCATCTCGGAAAAATATCTGACAACAGGCATGACGGTGGCGGAGCTGTC
CGCGGCCCGCGTGCAATACAGTGATAACGCCGCCCAATTTGTTGCTGA
AGGAGTTGGGCGGCCCGGCCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGC
GATAACACGTTCCGCTCTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCCAT
CCCAGGCGATGCGCGGATACTCATCGCCGCGCGCCGTGACGGAAAGCT
TACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGCGCCGCAGCGGCAGCAG
TTTGTGATTGGCTAAAGGGAAACACGACCGGAACCACCGCATCCGCGC
GGCGGTGCCGGCAGACTGGGCAGTCGGAGACAAAACCGGAACCTGCGGAG
TGTATGGCACGGCAAATGACTATGCCGTCGTCTGGCCCACTGGGCGCGCA
CCTATTGTGTTGGCCGTCTACACCCGGGCGCCTAACAAGGATGACAAGCA
CAGCGAGGCCGTCATCGCCGCTGCGGCTAGACTCGCGCTCGAGGGATTGG