



## **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

### **Trabajo de fin de Carrera titulado:**

Secuenciación del genoma completo (WGS) mediante tecnología Nanopore en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar en un hospital de referencia de Quito-Ecuador

### **Realizado por:**

Milton Paúl Márquez Cadena

### **Director del proyecto:**

José Rubén Ramírez Iglesias

### **Director externo del proyecto:**

Daniel Garzón Chávez

**Como requisito para la obtención del título de:**

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

QUITO, 22 de Marzo del 2024

## DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Milton Paúl Márquez Cadena, ecuatoriano, con Cédula de ciudadanía N° 1719885319, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

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



-----  
Milton Paúl Márquez Cadena

C.I.: 1719885319

## **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

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

-----

José Rubén Ramírez Iglesias

C.I.: 3050666993

**LOS PROFESORES INFORMANTES:**

Andrés Herrera

Alexander Maldonado

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa oral ante el tribunal examinador.

---

Ing. Andrés Herrera



Ing. Alexander Maldonado

Quito, 22 de Marzo de 2024

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Milton Paúl Márquez Cadena', written over a horizontal line.

-----

Milton Paúl Márquez Cadena

C.I.: 1719885319

Artículo de tesis

# Secuenciación del genoma completo (WGS) mediante tecnología Nanopore en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* extrapulmonar en un hospital de referencia de Quito-Ecuador

Milton Paúl Márquez Cadena <sup>1</sup>, José Rubén Ramírez Iglesias <sup>1</sup>, Daniel Garzon-Chavez <sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; milton.marquez@uisek.edu.ec

<sup>2</sup> Instituto de Microbiología, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito, Quito, Ecuador; dgarzonc@usfq.edu.ec

\* Autor de Correspondencia: milton.marquez@uisek.edu.ec; Tel.: 593979257900

**Resumen:** La tuberculosis (TB) es una enfermedad provocada por *Mycobacterium tuberculosis*, la cual tiene una incidencia de 43 por cada 100.000 habitantes en Ecuador. La forma más común en que se presenta es de tipo intrapulmonar, la cual afecta al pulmón y árbol bronquial. Sin embargo, también existe la forma extrapulmonar (TBE) que afecta a diferentes órganos del cuerpo. Los casos de TBE representan un 20% de las infecciones y presentan problemas en el diagnóstico por la variedad de síntomas clínicos que produce, el carácter invasivo de la obtención de la muestra y la elección de la prueba de detección adecuada. Actualmente, se desconoce con exactitud qué características genéticas de las cepas asociadas a TBE le confieren la capacidad de diseminarse comparándose con TB intrapulmonar (TBI). Se realizó la secuenciación de 7 aislamientos provenientes de muestras extrapulmonares recolectadas en un hospital de referencia en Quito, Ecuador, con el fin de analizar sus características genéticas y con ello clasificar sus linajes, sublinajes, perfiles de resistencia y genes asociados a la diseminación de la bacteria. Se encontró la presencia de 4 distintos sublinajes: L4.1.2, L4.1.1, L4.3.3 y L4.3.2. Los perfiles de resistencia de las muestras indicaron que todas presentan sensibilidad a fármacos. La llamada de variantes permitió encontrar 567 genes asociados a variantes, de los cuales 24 estuvieron presentes en más de la mitad de las muestras. Finalmente se encontraron 4 genes (mce3A, devS, esxL y PPE35) con mutaciones no silenciosas que pertenecen a la región RD1 o que pertenecieron a la categoría de virulencia según Mycobrowser, estas variaciones mostraron el mismo cambio de aminoácido en las muestras. Como conclusión, mediante las lecturas y el llamado de variantes se pudo asociar las muestras a un sublinaje en particular y analizar las variaciones que estuvieron presentes en muestras de TBE para obtener genes relacionados con la diseminación de *Mycobacterium tuberculosis*.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, secuenciación de genoma completo, linajes y sublinajes, genes de resistencia, llamado de variantes, tuberculosis extrapulmonar.

**Abstract:** Tuberculosis (TB) is a disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*, which has an incidence of 43 per 100,000 inhabitants in Ecuador. The most common form is intrapulmonary, which affects the lung and bronchial tree. However, there is also the extrapulmonary form (TBE) which affects different organs of the body. TBE cases account for 20% of infections and present problems in diagnosis because of the variety of clinical symptoms it produces, the invasiveness of specimen collection and the choice of the appropriate screening test. Currently, it is not known exactly what genetic characteristics of the strains associated with TBE give it the ability to spread compared to intrapulmonary TB (TBI). Sequencing of 7 isolates from extrapulmonary samples collected in a reference hospital in Quito, Ecuador, was performed to analyze their genetic characteristics and thus classify their lineages, sublineages, resistance profiles and genes associated with the dissemination of the bacterium. The presence of 4 different sublineages was found: L4.1.2, L4.1.1, L4.3.3 and L4.3.2. Resistance profiles of the samples indicated that all showed drug sensitivity. Variant calling found 567 variant-associated genes, of which 24 were present in more than half of the samples. Finally, 4 genes (mce3A, devS, esxL and PPE35) were found with non-silent mutations that belong to the RD1 region or belonged to the virulence category according to Mycobrowser, these variations showed the same amino acid change in the samples. In conclusion, by means of reads and variant calling it was possible to associate the samples to a particular sublineage and to analyze the variants that were present in TBE samples to obtain genes related to the dissemination of *Mycobacterium tuberculosis*.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; whole genome sequencing, lineages and sublineages, resistance genes, variant calling, extrapulmonary tuberculosis.