



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“Caracterización genómica de resistencia antimicrobiana mediante secuenciación del genoma completo de Enterobacterias procedentes del biobanco del año 2023 del Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

Realizado por:

Matilde Tatiana Guevara Bahamonde

Director del proyecto:

José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, septiembre 2024

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **Matilde Tatiana Guevara Bahamonde**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° 1719106161, declaro bajo juramento que el Proyecto de Desarrollo titulado:

Caracterización genómica de resistencia antimicrobiana mediante secuenciación del genoma completo de Enterobacterias procedentes del biobanco del año 2023 del Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

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

Matilde Tatiana Guevara Bahamonde

C.I.: 1719106161

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

Los Profesores Informantes:

Gianina Suarez

Gabriela Castillo

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

Gabriela Castillo

Gianina Suarez

Quito, septiembre 2024



Artículo de tesis

Caracterización genómica de resistencia antimicrobiana mediante secuenciación del genoma completo de Enterobacterias procedentes del biobanco del año 2023 del Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador.

Tatiana Guevara-Bahamonde¹, José Rubén Ramírez Iglesias², Juan Carlos Navarro³, Giovanni Núñez⁴

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

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

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

⁴ Maestría en Biomedicina, Facultad de Ciencias de la Salud, UISEK; milton.nunez@hgdc.gob.ec

* Autor de Correspondencia: tatiana.guevara@uisek.edu.ec

Resumen: La resistencia bacteriana hace referencia a la capacidad que tienen determinadas cepas bacterianas para tolerar la acción de los antibióticos destinados a evitar su proliferación lo que dificulta su tratamiento y aumenta el riesgo de infecciones graves y potencialmente mortales. Infecciones causadas por bacterias multiresistentes dificulta el tratamiento ya que llega a ser costoso debido a la necesidad de usar antibióticos de última línea y más prolongados. Además, la presencia de elementos móviles como plásmidos podrían llegar a propagarse de una persona a otra, o entre personas y animales, exacerbando el problema a nivel poblacional y global. De las enterobacterias más aisladas en el ámbito hospitalario, el género *Klebsiella spp.*, es la más preocupante, ya que posee la capacidad de adquirir y diseminar múltiples mecanismos de resistencia complicando el tratamiento y control; es un patógeno oportunista que causa una variedad de enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones del tracto urinario, bacteriemia, neumonía y abscesos hepáticos. En el Ecuador existe una limitada información de genes implicados en la resistencia bacteriana. En este estudio, se analizaron 27 aislamientos bacterianos, principalmente *Klebsiella spp.*, organizados en cuatro "Barcodes". Se llevó a cabo una secuenciación de genoma completo utilizando el dispositivo MinION de Oxford Nanopore Technologies, generando un total de 3,106 lecturas con un rendimiento de 15.4 millones de bases y una calidad promedio (QScore) de 8.55. Se identificaron diversos genes de resistencia, incluyendo aquellos asociados a resistencia a aminoglucósidos (*rrsH*, *aadA*, *rrsD*, *rrsB*), fluoroquinolonas (*parE*, *QnrB5*, *QnrB1*, *QnrB19*, *QnrS3*, *gyrA*), y bombas de eflujo (*acrA*, *YojI*, *mdtB*). Además, mediante análisis metagenómico identificó la presencia de un plásmido asociados con la diseminación de resistencia a betalactámicos *pIncX-SHV*. Este estudio subraya el valor de la secuenciación de genoma completo para proporcionar una comprensión exhaustiva de los mecanismos de resistencia y enfatiza la necesidad de establecer y mantener biobancos microbianos para facilitar estudios retrospectivos y prospectivos en la lucha contra la resistencia antimicrobiana.

Palabras clave: Resistencia Bacteriana, Nanopore Oxford, Taxonomía, Plásmidos, Bombas de Eflujo, Biobanco, Plásmido.

Abstract: Bacterial resistance refers to the ability of certain bacterial strains to tolerate the action of antibiotics designed to prevent their proliferation, making treatment more difficult and increasing the risk of severe and potentially fatal infections. Infections caused by multidrug-resistant bacteria complicate treatment as they become costly due to the need for last-resort and prolonged antibiotics. Additionally, the presence of mobile elements like plasmids can spread from person to person or between people and animals, exacerbating the problem on a population and global scale. Among the enterobacteria most commonly isolated in hospital settings, the genus *Klebsiella spp.* is particularly concerning as it has the capacity to acquire and disseminate multiple resistance mechanisms, complicating treatment and control; it is an opportunistic pathogen causing a range of infectious diseases, including urinary tract infections, bacteremia, pneumonia, and liver abscesses. In Ecuador, there is limited information on genes involved in bacterial resistance. In this study, 27 bacterial isolates, primarily *Klebsiella spp.*, were analyzed and organized into four "Barcodes." Whole-genome sequencing was performed using the Oxford Nanopore Technologies MinION device, generating a total of 3,106 reads with a yield of 15.4 million bases and an average quality score (QScore) of 8.55. Various resistance genes were identified, including those associated with aminoglycosides (*rrsH*, *aadA*, *rrsD*, *rrsB*), fluoroquinolones (*parE*, *QnrB5*, *QnrB1*, *QnrB19*, *QnrS3*, *gyrA*), and efflux pumps (*acrA*, *YojI*, *mdtB*). Additionally, metagenomic analysis identified the presence of a plasmid associated with the dissemination of β -lactam resistance, *pIncX-SHV*. This study underscores the value of whole-genome sequencing in providing a comprehensive understanding of resistance mechanisms and highlights the need to establish and maintain microbial biobanks to facilitate retrospective and prospective studies in the fight against antimicrobial resistance.

Keywords: Bacterial Resistance, Taxonomy, Plasmids, Efflux Pumps, Biobank, Plasmid.

1. Introducción

La resistencia bacteriana hace referencia a la capacidad que tienen determinadas cepas bacterianas para tolerar la acción de los antibióticos destinados a evitar su proliferación lo que dificulta su tratamiento y aumenta el riesgo de infecciones graves y potencialmente mortales (Camacho Silvas, 2023). La creciente resistencia a los antimicrobianos representa una amenaza para la salud pública global, es un fenómeno impulsado principalmente por el uso indiscriminado de antibióticos y el manejo inadecuado de sus residuos (Vázquez-Cabrera et al., 2023).

En el año 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) alertó por primera vez sobre cómo el empleo de agentes antimicrobianos en animales, humanos y actividades agrícolas genera una presión selectiva que favorece el desarrollo de microorganismos resistentes debido al mal uso, incumplimiento de los tratamientos y prescripciones no siempre adecuadas (Vázquez-Cabrera et al., 2023). En el 2017, con el fin de orientar la investigación y desarrollo de nuevos antimicrobianos, nuevos métodos diagnósticos y vigilancia activa para evitar diseminación de resistencias, presenta un listado dividiéndolo en tres categorías de prioridad: crítica, alta o media. El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y atención con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. En este grupo se incluyen: las Enterobacterias como *Klebsiella* y *E. coli* multirresistentes productoras de carbapenemasa (*WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024*, 2024).

La resistencia bacteriana es uno de los mayores desafíos de Salud Pública mundial, ya que cada cuatro horas los laboratorios del CDC detectan un germen resistente y cada día mueren 2.000 personas por esta causa. Proyecciones recientes indican que para el año 2050 se produzcan más muertes por resistencia bacteriana que las ocasionadas actualmente por el cáncer. Además, la resistencia bacteriana tiene un impacto económico negativo sobre la economía mundial ya que anualmente se destinan 100 billones de dólares aproximadamente para tratar infecciones causadas por bacterias multirresistente (Silvas, 2023).

El estudio y entendimiento de los mecanismos de resistencia es esencial para evitar fallos en el tratamiento de infecciones. Identificar molecularmente estas resistencias permite analizar las características bacterianas, distinguir entre mecanismos adquiridos o adaptativos y rastrear las vías de diseminación. Esta información es fundamental para desarrollar estrategias de control eficaces y justificar la vigilancia continua de bacterias multirresistentes. Comprender cómo se produce la resistencia, su epidemiología y los genes implicados en la multiresistencia facilitan la formulación de estrategias efectivas para el control de infecciones y el uso adecuado de antibióticos en entornos hospitalarios (*WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024*, 2024).

Dentro de los genes implicados en la resistencia a los diferentes antibióticos se describen carbapenemasas: blaKPC, blaVIM, blaNDM, blaIMP, blaOXA; betalactamasas de espectro extendido blaCTX-M, blaSHV y blaTEM; así como genes implicados en la resistencia a aminoglucosidos (genes implicados: aac(3)-IIa; aac(6')-29a; aac(3)-Id; aph(3')-VI), fluoroquinolonas (genes implicados: aac(6')-Ib-cr; qnrB1; oqxA/B) y polimixinas (Cercenado, 2015). En el Ecuador, datos de vigilancia epidemiológica continua por parte del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) han mostrado un aumento preocupante en la resistencia bacteriana a los antibióticos. En el año 2021, en el país fue notificado el primer hallazgo de producción de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* multirresistente en un hospital de la región Costa, en el año 2022 fueron reportados 11 casos de producción de carbapenemasas de igual manera en la región Costa y en el transcurso del año 2023 se notifica el primer hallazgo en la región Sierra de *Klebsiella pneumoniae* productora de doble carbapenemasa de tipo bla KPC-2 y bla NDM-1, con un perfil extremadamente resistente (XDR) (Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos, 2023). Los genes que codifican para las enzimas carbapenemasas están asociados con elementos móviles que pueden extenderse horizontalmente dentro y entre especies bacterianas (Mathers, 2011).

Según Trujillo y colaboradores, en su recopilación de información realizada entre 2009 y 2022, se identificaron 77 estudios enfocados en determinar los factores genéticos implicados en la resistencia bacteriana. Estos estudios revelaron que en Ecuador, las principales bacterias multirresistentes en el ámbito hospitalario son *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*. Además identificaron que estas bacterias presentan genes específicos relacionados con la producción de carbapenemasas, como blaKPC, blaNDM y blaOXA-48. No se describen otros mecanismos de resistencia en esta recopilación de información.

La creciente multiresistencia a los antimicrobianos representa una seria amenaza para la salud pública a nivel global. En la actualidad, la secuenciación de genoma completo ofrece una visión integral del perfil de resistencia bacteriana (Boochandani et al., 2019). La tecnología de nanoporos ha emergido recientemente como una atractiva alternativa para la secuenciación de genomas procariotas completos a bajo costo en comparación con otras

plataformas de secuenciación. Las ventajas de esta tecnología incluyen la secuenciación directa, selectiva de ADN/ARN, lectura en tiempo real, análisis de fragmentos más largos y una preparación rápida de las librerías genómicas (Jain et al., 2018). Integrar técnicas microbiológicas tradicionales con análisis genéticos moleculares como la secuenciación de genoma completo, logra una comprensión más profunda de las características bacterianas (Ivanova et al., 2023). Este enfoque combinado permite verificar o refutar las propiedades fenotípicas observadas mediante métodos convencionales, ofreciendo así una perspectiva más completa sobre los microorganismos estudiados (Huang et al., 2023).

En este contexto, es importante poder contar con biobancos que funcionan como sistemas organizados que recopilan y almacenan grandes cantidades de muestras biológicas como tejidos, líneas celulares, microorganismos e información a largo plazo (National Library of Medicine, 2023), asegurando su óptima calidad y cumpliendo con normas éticas y legales que garantizan los derechos de los pacientes de quienes provienen las muestra (Doménech García & Cal Purriños, 2014). Por lo tanto, los biobancos permiten realizar estudios en retrospectiva ayudando a comprender y enfrentar desafíos de salud actuales y futuros como lo es la resistencia antimicrobiana, brindando información que oriente las estrategias de control y contención de la propagación de mecanismos de resistencia a antimicrobianos (Aslam et al., 2021).

En este estudio, nos propusimos realizar secuenciación de genoma completo mediante tecnología de nanoporos para descifrar el panorama genético asociado a fenotipos de multirresistencia en aislamientos clínicos de Enterobacterias procedentes del biobanco del año 2023 del Hospital General Docente de Calderón de Quito-Ecuador, buscando aportar nuevos conocimientos sobre los determinantes moleculares implicados a este urgente problema de salud pública.

Se espera que la secuenciación de genoma completo mediante tecnología de nanoporos revele una diversidad de genes de resistencia en las enterobacterias aisladas, incluyendo genes de carbapenemasas (blaKPC, blaNDM), betalactamasas de espectro extendido (blaCTX-M, blaSHV, blaTEM), que son comúnmente reportados en Ecuador. Además, se anticipa que esta técnica permitirá identificar mecanismos de resistencia no detectados por métodos fenotípicos convencionales.

2. Materiales y Métodos

Previo a los ensayos experimentales, el protocolo de investigación fue sometido a evaluación por parte del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos del Hospital General Docente de Calderón (CEISH-HGDC). Dado el carácter observacional de este estudio, en el que no se realizó intervención alguna sobre las muestras clínicas y aislamientos bacterianos más allá de su caracterización genómica mediante secuenciación de sus genomas completos, y en apego a los lineamientos éticos estipulados para investigaciones con muestras clínicas, el comité posterior a la revisión del protocolo codificado como CISH-HGDC-2023_009, notificó que *“es una investigación exenta de evaluación por parte del CEISH, de acuerdo con la establecido en la normativa legal vigente”*. La resolución se encuentra en el Anexo 1: Figura A1.

Se trata de un estudio observacional, descriptivo y retrospectivo en el que se utilizó una colección de 27 aislamientos bacterianos procedentes del biobanco institucional del Hospital General Docente de Calderón en la ciudad de Quito-Ecuador, lo cuales se obtuvieron a partir de diversas muestras clínicas de pacientes atendidos durante el año 2023 tomándose como criterio de selección cepas de Enterobacterias productoras de carbapenemasas caracterizadas fenotípicamente por el personal técnico de dicha casa de salud y como criterio de exclusión aquellas cepas que se desconoce el género al que pertenece o su mecanismo resistencia. Dada su condición de multirresistencia, estos aislamientos fueron excelentes candidatos para investigar a profundidad las bases genómicas que subyacen a este fenómeno de gran relevancia clínica y problemática creciente en el ámbito de la salud pública.

Este estudio se llevó a cabo en 3 fases: La primera fase consistió en la resucitación y obtención de biomasa bacteriana la cual se realizó en las instalaciones del laboratorio de microbiología del Hospital Docente Calderón, mientras que la segunda fase que consistió en la extracción, cuantificación de DNA bacteriano, preparación de librerías genómicas y secuenciación por nanoporos fué realizado en el laboratorio de investigación de la Facultad de Ciencias de la Salud “Matilde Hidalgo” de Universidad Internacional SEK, Campus Miguel de Cervantes, Carcelén, Quito-Ecuador. La tercera etapa consistió en el análisis bioinformático.

2.1 Resucitación y Obtención de biomasa bacteriana

La colección de 27 aislamientos de enterobacterias perteneciente al biobanco institucional se mantenían criopreservados a -20°C en crioviales con caldo Tripticasa Soya (TSB) suplementado con glicerol al 5%. Con el fin de reactivar los aislamientos, evaluar su viabilidad y pureza, los crioviales fueron descongelados y el contenido inoculado mediante estriación en agar Tripticasa Soya (TSA). Las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas en condiciones aeróbicas. Posteriormente, se seleccionaron colonias aisladas y puras de cada aislamiento y se transfirieron a medio líquido Luria Bertani (LB), incubando nuevamente a 35°C por 24 horas.

Tras el periodo de incubación, las cepas bacterias se centrifugaron a 2506 RCF durante 10 minutos para obtener los pellets celulares. Estos pellets se conservaron a -80°C para su posterior utilización en la extracción de ADN bacteriano

2.2 Extracción y purificación de DNA bacteriano

Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA CORPORATION, Madison, EE.UU.), siguiendo estrictamente el protocolo el cual consiste lisis celular, precipitación de proteínas, precipitación de DNA y rehidratación. El ADN purificado con este sistema es adecuado para una variedad de aplicaciones como amplificación y secuenciación (Promega, 2023).

Posteriormente se cuantificó el ADN extraído mediante fluorómetro Qubit el cual mide únicamente el ADNbc intacto descartando posibles interferencias por la presencia de ADN degradado.

Al realizar una primera medición este superó el límite máximo de la curva de calibración, por lo que se decidió realizar una dilución con un factor de 4 para determinar la concentración de ADN en cada muestra.

2.4 Preparación de librerías y secuenciación

En primer lugar, los aislamientos fueron organizados en 4 grupos e identificados con códigos de barras únicos del 9 al 12 con el fin de optimizar el proceso de secuenciación y análisis bioinformático. Para esta agrupación fueron tomados en cuenta datos fenotípicos provistos por el laboratorio de microbiología del Hospital Docente de Calderón, como tipo de muestra del cual fue recuperado, género bacteriano y mecanismo de resistencia inferidos. Los datos de tipo de muestra se utilizaron únicamente con fines didácticos ya que no serán relevantes para el análisis de los resultados.

Para la preparación de librerías genómicas se utilizó el kit Rapid sequencing gDNA - barcoding SQK-RBK004 el cual permite la multiplexión de hasta 12 “barcodes” por cada celda de flujo, se basa en la utilización de transposasas, las cuales corta aleatoriamente el DNA y unen simultáneamente barcodes a los extremos escindidos, para posteriormente agregar adaptadores de secuenciación a los extremos etiquetados (Radukic et al., 2020). Este kit requiere de una concentración máxima de 400 ng de ADN en 7.5 uL por “Barcode”, dado que las muestras superaron esta concentración, se aplicaron diferentes factores de dilución previas entre 3 a 10.

La secuenciación se llevó a cabo utilizando la celda de flujo R9 que contiene 2048 nanoporos (Radukic et al., 2020), esta al ser verificada usando MinKNOW (software del dispositivo MinION) indicó que 900 poros se encontraban disponibles, siendo 800 poros la cantidad mínima para llevar cabo la secuenciación (Oxford Nanopore Technologies, 2024). El proceso de secuenciación se realizó durante un periodo de 48 horas consecutivas, con ello tratar de lograr alta profundidad y cobertura para un ensamblaje de alta calidad.

Análisis de los datos

Los archivos FASTQ generados del llamado de bases del software MinKNOW, se cargaron en la plataforma en línea Epi2me en el flujo de trabajo “FASTQ Antimicrobial Resistance” (AMR, ID: 446911). El análisis de mapeo “FASTQ Antimicrobial Resistance” AMR detecta genes de resistencia antimicrobiana en dos etapas: 1) Identificación de especies mediante WIMP (What's in my Plot) clasificando secuencias de nanoporos de calidad (QScore establecido >8) en tiempo real, utilizando la taxonomía de la base de datos RefSeq del NCBI para identificar bacterias, virus, hongos y arqueas. 2) Identificación de resistencia antimicrobiana mediante AMR CARD alineando la lectura de entrada con minimap2 contra todas las secuencias de referencia disponible en la base de datos CARD, la cual contiene secuencias de proteínas, clases de fármacos y ontologías de resistencia. (EPI2ME, 2024).

Dado el número limitado de genes de resistencias encontrados tras el análisis con la plataforma Epi2me, se decidió realizar adicionalmente un ensamblaje metagenómico concatenando toda la información de los “barcodes” 9, 10, 11, 12 en uno. Para ello se estableció el siguiente flujo de trabajo utilizando la plataforma Galaxy Australia, Australian BioCommons, versión 24.1. Inicialmente, los archivos FASTQ se cargaron en la plataforma, ayudados de la herramienta Concatenate multiple (Galaxy Version 0.2) se concatenó la información, posteriormente se realizó un proceso de trimado mediante Porechop (Versión Galaxy 0.2.4+galaxy0) para optimizar la calidad de las secuencias. Para asignar etiquetas taxonómicas a las lecturas de secuenciación se aplicó la herramienta Kraken2 (Versión Galaxy 2.1.1+galaxy1) cuyos resultados fueron procesados con Convert Kraken (Versión Galaxy 1.2+galaxy0) y visualizados gráficamente con Krona Pie Chart (Versión Galaxy 2.7.1+galaxy0). A continuación se realizó un ensamblaje de novo utilizando la herramienta Megahit (Versión Galaxy 1.2.9+galaxy1), para posteriormente ejecutar anotación funcional para genes antimicrobianos de resistencia con Abriicate (Versión Galaxy 1.0.1).

3. Resultados

3.1 Librerías Genómicas

En este estudio, se analizaron 27 aislados bacterianos, organizados en cuatro grupos o "Barcodes", cada uno con un número variable de cepas. La Tabla 1 detalla cómo estuvo conformado cada grupo. Es importante señalar que, aunque se utilizó el tipo de muestra (sangre, orina, e hisopado rectal) para facilitar la clasificación de los códigos de barra, esta información no tiene relevancia en los resultados del estudio y se empleó únicamente con fines organizativos para las bibliotecas genómicas. Entre los aislados analizados, *Klebsiella pneumoniae* es la bacteria predominante en 3 de los 4 “Barcode”, mientras que el mecanismo de resistencia más común fue KPC.

Tabla 1: Conformación de grupos para análisis de secuenciación del genoma completo

CODIGO ORIGINAL DE LA CEPA	"BARCODE"	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	RESISTENCIA FENOTÍPICA	TIPO DE MUESTRA DE PROCEDENCIA
2023-KPN-16	9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	SANGRE
2023-KPN-4	10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA
2023-KPN-7		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA
2023-KPN-10		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA
2023-KPN-11		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA
2023-KPN-5	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-6		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-8		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-12		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-13		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-15		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KOX-17		<i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-19		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-20		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-1		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MBL	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-9		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-14		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	HISOPADO RECTAL
2023-KPN-18		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	HISOPADO RECTAL
2023-OXA-3		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	HISOPADO RECTAL
2023-ECL-1		12	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC
2023-ECL-2	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC	HISOPADO RECTAL
2023-ECL-7	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC	HISOPADO RECTAL
2023-ECL-9	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC	HISOPADO RECTAL
2023-ECL-10	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC	HISOPADO RECTAL
2023-ECL-12	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC	HISOPADO RECTAL
2023-ECL-13	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC	HISOPADO RECTAL
2023-ECL-14	<i>Enterobacter cloacae</i>		KPC	HISOPADO RECTAL

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa; MBL: Metalobetalactamasa; Oxa: Oxacilinas

3.2 Cuantificación de ADN por “Barcode”

En la Tabla 2 se muestra la Concentración de ADN obtenido para cada aislamiento bacteriano. La concentración de ADN Total hace referencia a la concentración corregida por el factor de dilución (4) realizada previa a la cuantificación. Además, se muestran los detalles técnicos y procedimientos realizados con el fin de conseguir la concentración de ADN idónea para continuar la preparación de la librería genómica.

Tabla 2: Contracción de ADN por cada “Barcode”

"BARCODE"	CODIGO DE LA CEPA	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	RESISTENCIA FENOTÍPICA	TIPO DE MUESTRA DE PROCEDENCIA	CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/uL) TOTAL	FACTOR DE DILUCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL ng/uL	CANTIDAD FINAL DE ADN POR GRUPO
9	2023-KPN-16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	SANGRE	388	--	388,0	388,6 ng/uL (colocando)
10	2023-KPN-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA	363,2	5	72,6	312,7 ng/4uL (colocando 1uL de cada muestra)
	2023-KPN-7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA	268	3	89,3	
	2023-KPN-10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA	244,8	3	81,6	
	2023-KPN-11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	ORINA	345,6	5	69,1	
11	2023-KPN-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	144	3	48,0	626,9 ng/14uL (colocando 1uL de cada DNA). Posteriormente factor de dilución 2: 335,8 ng/7,5uL
	2023-KPN-6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	112	3	37,3	
	2023-KPN-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	128,8	5	25,8	
	2023-KPN-12	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	192,8	5	38,6	
	2023-KPN-13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	369,6	10	37,0	
	2023-KPN-15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	376	10	37,6	
	2023-KOX-17	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	364,8	5	73,0	
	2023-KPN-19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	47,68	2	23,8	
	2023-KPN-20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	176	3	58,7	
	2023-KPN-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	MBL	HISOPADO RECTAL	292	5	58,4	
	2023-KPN-9	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NDM	HISOPADO RECTAL	230,4	5	46,1	
	2023-KPN-14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	HISOPADO RECTAL	380	5	76,0	
	2023-KPN-18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	HISOPADO RECTAL	258,4	5	51,7	
	2023-OXA-3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OXA-48	HISOPADO RECTAL	30,08	2	15,0	
12	2023-ECL-1	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	299,2	5	59,8	398,2 ng/8uL (colocando 1uL de cada DNA). Al tomar 7,5 uL de esta solución, se tendría 373,3 ng/7,5uL
	2023-ECL-2	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	303,2	5	60,6	
	2023-ECL-7	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	123,2	3	41,1	
	2023-ECL-9	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	306,4	5	61,3	
	2023-ECL-10	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	416	10	41,6	
	2023-ECL-12	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	99,2	2	49,6	
	2023-ECL-13	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	50,32	2	25,2	
	2023-ECL-14	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	HISOPADO RECTAL	295,2	5	59,0	

Debido a las altas concentraciones de ADN iniciales, se realizó un proceso de ajuste en dos etapas. Primero, se efectuaron diluciones preliminares para reducir la concentración (Factor de Dilución) y posteriormente, se tomó 1 µL aproximadamente de cada muestra diluida para conformar los grupos o "Barcodes", asegurando una cantidad máxima de 400 ng de ADN en un volumen final de 7,5 µL por grupo.

3.3 Métricas de calidad de la Secuenciación

Tras culminar las 48 horas de secuenciación en el equipo MinION, se obtuvo en general para los 4 “Barcode” analizados un total de 3.106 lecturas, con un rendimiento de 15,4 millones de bases. La longitud promedio de las secuencias fue de 4.956 pB y cuya calidad promedio de las lecturas (QScore) tuvo una puntuación de 8,55, superando el puntaje mínimo establecido de 8. .

En la Tabla 3 se observan los parámetros de calidad y rendimiento de la secuenciación para los 4 “barcode” analizados. El número de lecturas obtenidas es variada por cada “Barcode” siendo el más bajo 59 lecturas para el “Barcode” 12, y el más alto 175 lecturas para el “Barcode” 11. En cuanto al rendimiento de la secuenciación expresado en kilobases (Kb), fue mejor para el “barcode” 11 y más bajo para el “barcode” 12. Los “Barcode” 9 y 10 mostraron resultados intermedios, con el “Barcode” 9 teniendo la longitud promedio de secuencia más corta de 4.926 nucleótidos con un índice de calidad de 8,6, mientras que el “Barcode” 10 tuvo un rendimiento de 178,9 Kb el índice de calidad de 8,26.

Tabla 3: Parámetros de Calidad y Rendimiento de la Secuenciación

"BARCODE"	NÚMERO DE CEPAS POR "BARCODE"	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA		PARAMETROS DE CALIDAD DE LA SECIENCIACIÓN ONT			
		MICROORGANISMO	MECANISMO DE RESISTENCIA	Nº LECTURAS	RENDIMIENTO (Kb)	LONGITUD PROMEDIO DE LAS SECUENCIAS	INDICE DE CALIDAD PROMEDIO
9	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	170	837,0	4926,0	8,6
10	4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	96	178,9	1863,0	8,3
11	14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC, MBL, OXA-48	175	1200,0	7128,0	9,2
12	8	<i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	59	158,5	2686,0	5,6

En esta tabla se detalla la cantidad de información generada, es decir, el número de lecturas y rendimiento de la secuenciación, así como la longitud promedio de las secuencias y calidad de los datos obtenidos.

3.4 Identidad Taxonómica

Previo a la asignación taxonómica el pipeline “FASTQ Antimicrobial Resistance” (AMR) de la plataforma Epi2me, filtra y corta las lecturas por debajo de QScore establecido (8.0) y asigna como lecturas clasificadas las que cumplen con el valor de Qscore obteniéndose los datos descritos en la Tabla 4. Se observa que para los “Barcode” 9, 11 y 12 obtuvieron una mayor cantidad de lecturas analizadas y clasificadas exitosamente (68%, 74% y 63% respectivamente). En contraste con el “Barcode” 10 que el 43% de lecturas tuvo una clasificación exitosa.

A partir de las Lecturas clasificadas se realizó la asignación taxonómica. Para el “Barcode” 9 de las 116 lecturas clasificadas, 65 fueron asignadas como *Klebsiella*. Para el “Barcode” 11 de las 130 lecturas clasificadas 72 fueron asignadas también como *klebsiella*. Mientras que para el “Barcode” 10 de 41 lecturas clasificadas 13 fueron asignadas como *Escherichia*. Para el “Barcode” 12 de 37 lecturas clasificadas 19 fueron asignadas como *Enterobacter*. Los Barcodes 9, 11 y 12 muestran una correlación entre la caracterización fenotípica realizada previamente por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Docente de Calderón y la caracterización genotípica realizada mediante secuenciación de genoma completo. Sin embargo, el “Barcode” 10 presenta una discrepancia ya que fenotípicamente se identificó como *Klebsiella*, mientras que genotípicamente se clasificó como *Escherichia*.

Tabla 4: Resultados del análisis taxonómico del pipeline AMR

"BARCODE"	NÚMERO DE CEPAS POR "BARCODE"	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	LECTURAS ANALIZADAS	LECTURAS CLASIFICADAS	LECTURAS ASIGNADAS AL GÉNERO
9	1	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	170	116 (68%)	65
10	4	<i>Klebsiella</i>	<i>Escherichia</i>	96	41 (43%)	13
11	14	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	175	130 (74%)	72
12	8	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	59	37 (63%)	19

Se puede apreciar el número de lecturas analizadas para cada “Barcode”, las lecturas que pudieron ser clasificadas por el flujo de trabajo AMR.

3.5 Determinantes de Resistencia Bacteriana

Posterior a la asignación taxonómica, el flujo de trabajo AMR reveló la presencia de los genes responsable de la resistencia antimicrobiana para cada “Barcode” analizado cuyos resultados se pueden observar en la Tabla 5.

Tabla 5: Determinantes genéticos encontrados por cada “Barcode”.

"BARCODE"	NÚMERO DE CEPAS POR "BARCODE"	MECANISMO DE RESISTENCIA FENOTÍPICA	DETERMINANTES DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA MEDIANTE SECUENCIACIÓN POR ONT																				
			Nº GENES DE RESISTENCIA	LECTURAS ANLIZADAS	PRECISIÓN PROMEDIO (%)	BOMBAS DE EFLUJO			AMINOGLUCOSIDOS				FLUOROQUINOLONAS										
						<i>acrA</i>	<i>YojI</i>	<i>mdtB</i>	<i>aadA</i>	<i>rrsB</i>	<i>rrsD</i>	<i>rrsH</i>	<i>parE</i>	<i>QnrB5</i>	<i>QnrB1</i>	<i>QnrB19</i>	<i>QnrS3</i>	<i>gyA</i>					
9	1	KPC	2	116	80																		
10	4	KPC	1	41	86																		
11	14	KPC, MBL, OXA-48	8	130	84																		
12	8	KPC	2	37	85																		

Se detalla los genes implicados en la resistencia bacteriana encontrada por cada “Barcode”

Para el “Barcode” 9 en un total de 116 lecturas analizadas y un promedio de precisión de 79.8% se evidenciaron la presencia de 2 genes de resistencia a antimicrobianos: 1 gen asociado a resistencia a aminoglucósidos (*rrsH*) y 1 gen de resistencia a fluoroquinolonas (*parE*). Para el “Barcode” 10 de un total de 41 lecturas analizadas y con un 86.4% de precisión se determinó 1 gen de resistencia a fluoroquinolonas (*QnrB5*). Mientras que para el “Barcode” 11 con 130 lecturas analizadas y 83% de precisión promedio se identificó el mayor número de determinantes genéticos de resistencia (8), 3 genes asociados a bombas de eflujo (*acrA*, *YojI*, *mdtB*), 2 genes de resistencia a aminoglucósidos (*aadA*, *rrsD*) y 3 genes de resistencia a fluoroquinolonas (*QnrB1*, *QnrB19*, *QnrS3*). Por último para el “Barcode” 12 con tan solo 37 lecturas analizadas y con 85% de precisión se encontró que 2 genes de resistencia 1 gen asociado a resistencia a aminoglucósidos (*rrsB*) y 1 gen de resistencia a fluoroquinolonas (*gyrA*).

Además podemos observar que se da una discrepancia entre el mecanismo de resistencia inferido fenotípicamente y los mecanismo de resistencia determinados mediante secuenciación de genoma completo, ya que fenotípicamente se indica la presencia de resistencia tipo KPC y el análisis genotípico realizado mediante secuenciación por nanoporos (ONT) no lograron detectar los genes asociados a esta resistencia para ninguno de los “Barcode” analizados.

3.5 Análisis Metagenómico

El análisis metagenómico, llevado a cabo al consolidar los datos provenientes de los "Barcode" 9, 10, 11 y 12 en un único archivo y tras el proceso de trimming utilizando la herramienta Porechop de Galaxy Australia, generó un conjunto de datos que se muestra en la Tabla 6. Se obtuvieron un total de 500 secuencias que comprenden 2,4 millones de bases de información genética. Se determinó además, que la longitud de las secuencias va desde 107 a 76572 nucleótidos, presentando un contenido de guanina-citosina del 55%.

Tabla 6: Estadísticas básicas obtenidas a partir de Análisis Metagenómico.

MEDIDA	VALOR
Nombre del Archivo	Concatenar múltiples conjuntos de datos sobre datos 4_datos3_y otros
Tipo de archivo	Llamadas de base convencionales
Clasificación	Nanopore
Secuencias Totales	500
Bases Totales	2,4 Mbps
Secuencias marcadas como de mala calidad	0
Longitud de la secuencia	107-76572
%GC	55

%GC: Porcentaje guanina-citosina.

En la Tabla 7 se muestra que el 64% de las secuencias analizadas se asignaron al género *Klebsiella spp.*, seguido por un 8% al género *Enterobacter spp.*. Estos resultados están en concordancia con la identificación fenotípica previa, que también reveló un predominio de cepas del género *Klebsiella spp.*, seguido por *Enterobacter spp.*. Además, el 3% de *Escherichia* detectado en este análisis metagenómico confirma el hallazgo mediante la plataforma EPI2ME..

Tabla 7: Asignación taxonómica y genes de resistencia del análisis metagenómico

"BARCODE"	NÚMERO DE CEPAS POR "BARCODE"	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA		ANÁLISIS METAGENEMICO		
		MICROORGANISMO	MECANISMO DE RESISTENCIA	MICROORGANISMO	RESISTENCIA	% COVERTURA
9	1	<i>Klebsiella</i>	KPC	<i>Klebsiella</i> 64%, <i>Enterobacter</i> 8%, <i>Escherichia</i> 3%	pIncX-SHV (Adhesión: JN247852)	94,4
10	4	<i>Klebsiella</i>	KPC			
11	14	<i>Klebsiella</i>	KPC, MBL, OXA-48			
12	8	<i>Enterobacter</i>	KPC			

Detalle los resultados obtenidos tras el análisis metagenómico en la Plataforma Galaxy Australia.

Como se detalla en la tabla 7, la anotación funcional reveló la presencia de un gene asociados a la resistencia antimicrobiana, el cual tras consultar el número de adhesión JN247852 en la base de datos de NCBI se determina que este gen correspondiente al plásmido pIncX-SHV de *Klebsiella pneumoniae*, conocido por su papel en la diseminación de resistencia a betalactámicos.

4. Discusiones

Para los "Barcode" 9, 11, 12 se corroboró que las cepas en estudio se trataban del género *Klebsiella spp.*, siendo este microorganismo un patógeno oportunista que causa una variedad de enfermedades infecciosas, incluyendo infecciones del tracto urinario, bacteriemia, neumonía y abscesos hepáticos (Wang et al., 2020), es uno de los principales agentes nosocomiales especialmente en pacientes inmunocomprometidos o con enfermedades subyacentes. Además posee la capacidad de adquirir y diseminar múltiples mecanismos de resistencia complicando el tratamiento y control de infecciones. En el Ecuador de acuerdo a datos del Ministerio de Salud Pública entre 2014 y 2018 es el segundo microorganismo mayormente aislado en los hospitales dentro del Sistema de Vigilancia Nacional RAM (Ministerio de Salud Pública, 2018) de igual manera en el Hospital Docente de Calderón para los años 2022 y 2023 *Klebsiella pneumoniae* es el segundo microorganismo más aislado seguido de *Escherichia coli*, esto de acuerdo a datos publicados en la Cartilla de Resistencia Antimicrobiana - HGDC.

La discrepancia que se presentó en el “Barcode” 10 entre la identificación fenotípica por parte del Laboratorio de microbiología del Hospital Docente de Calderón y la asignación taxonómica mediante secuenciación por ONT pudo deberse al bajo número de lecturas obtenidas para este grupo: de un total de 96 lecturas, solo 41 fueron clasificadas, y 13 fueron asignadas al género *Escherichia spp.* Esta baja cantidad de datos genómicos pudo haber conllevado a una clasificación no precisa, destacando la importancia de obtener una cobertura genómica adecuada para garantizar una identificación taxonómica confiable. Comparando los datos que obtuvimos en este estudio con otros trabajos, (Ruan et al., 2020) en el que realizan secuenciación de genoma completo por ONT lograron obtener 76.129 lecturas de secuencia con una longitud promedio de 9.806 pares de bases y un rendimiento 746,5 Mbp. Esta comparación resalta la considerable diferencia en la cantidad y calidad de los datos obtenidos para este “Barcode”.

Los procesos de extracción y cuantificación de ADN es un paso crítico, en la investigación genómica, ya que influyen directamente en la calidad y sensibilidad de procesos posteriores, como la secuenciación (Jain et al., 2018), (Liu et al., 2022). En este estudio, los resultados de cuantificación de ADN revelaron variaciones en las concentraciones iniciales entre las diferentes cepas bacterianas que van desde 30,08 ng/uL hasta 388 ng/uL, pudiendo atribuirse a diversos factores, como las diferencias en la eficiencia de extracción entre especies bacterianas, la fase de crecimiento de los cultivos al momento de la extracción (Suárez Contreras & Yañez Meneses, 2018)), o la integridad celular de las diferentes cepas. Para la conformación de los grupos o “Barcodes”, se requirió alcanzar una concentración homogénea final de 400 ng de ADN en un volumen de 7,5 µL por cada “Barcode” cumpliendo los requisitos especificados en el Kit de preparación de librerías genómicas SQK-RBK004, para lo cual fue necesario realizar varias diluciones manejando volúmenes muy pequeños que pudieron conllevar a errores sistemáticos por pipeteo, los cuales tienen el potencial de afectar el rendimiento de la secuenciación subsiguiente. Es por ello que, dada la importancia en la precisión en estas etapas, se recomienda realizar una segunda cuantificación de la concentración de ADN posterior a la ejecución de las diluciones, aportando a la obtención de resultados más fiables y reproducibles.

Los hallazgos de este estudio revelan un perfil preocupante de resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de enterobacterias, principalmente en *Klebsiella spp.* La identificación de múltiples genes de resistencia, incluyendo aquellos que codifican para bombas de eflujo (*acrA*, *YojI*, *mdtB*), resistencia a aminoglucósidos (*aadA*, *rrsH*, *rrsD*, *rrsB*) y fluoroquinolonas (*parE*, *QnrB5*, *QnrB1*, *QnrB19*, *QnrS*, *gyrA*), subraya la complejidad y desafío que representa la resistencia antimicrobiana en el entorno hospitalario del cual provienen las cepas.

Se determinó la presencia de genes codificantes para bombas de eflujo 11 como *acrA*, *YojI* y *mdtB*. Los cuales son transportadores de membrana involucrados en la expulsión activa de sustancias tóxicas como los compuestos antimicrobianos desde el interior de la célula hacia el medio externo (Macheti et al., 2011) reduciendo así su concentración intracelular y eficacia. El gen *acrA*, parte del complejo *AcrAB-TolC*, es especialmente relevante ya que confiere resistencia a antibióticos como fluoroquinolonas, β-lactámicos, tetraciclinas y macrólidos. En el caso de *Klebsiella* (antiguamente denominado *Enterobacter aerogenes*) está involucrado en la disminución de la permeabilidad de membrana hacia imipenem (Macheti et al., 2011) complicando el manejo de las infecciones. Las bacterias poseedoras de este gen podrían aumentar su expresión en situaciones de estrés como la presencia de etanol al 4 %, NaCl 0,5 M y fase estacionaria en medio Luria-Bertani (Ma et al., 1995). En el Ecuador no existen datos que describen la prevalencia de genes de resistencia asociados con bombas de eflujo en aislamientos de Enterobacterias, únicamente se han estudiado para *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Es importante destacar que aunque estos genes no se transmitan mediante elementos móviles, sino a través de herencia bacteriana es fundamental conocer su presencia en el país, ya que limita las opciones terapéuticas para tratar infecciones o fallos en los tratamientos causadas por bacterias que portan estos genes, lo que representa un desafío significativo para la salud pública.

Los aminoglucósidos son antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas bacterianas, cuya acción se ve comprometida por la presencia de genes de resistencia como los identificados en este estudio: *aadA*, *rrsH*, *rrsD* y *rrsB*. La detección del gen de resistencia *aadA* codifica la enzima AAC(6') que es una acetiltransferasa que modifica la estructura del aminoglucósido, inactivándolo. Esta enzima afecta directamente a los antibióticos gentamicina y tobramicina agregando un grupo acetilo en la posición 6' del anillo aminoglucósido impidiendo que se una a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano (Mingeot-Leclercq et al., 1999) También se determinaron los genes *rrsH*, *aadA*, *rrsD* y *rrsB* los cuales reducen la afinidad del antibiótico por su blanco modificando el ARN ribosómico bacteriano. La resistencia a aminoglucósidos limita significativamente las opciones terapéuticas, especialmente en pacientes con infecciones del torrente sanguíneo, neumonías asociadas a ventilador y otras infecciones nosocomiales severas. Además son de gran interés para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes ya que tiene efecto sinérgico con polimixinas como colistina. De acuerdo al estudio publicado por (Mejía Zambrano,

2022) la administración de amikacina para tratar infecciones por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente disminuye las tasas de mortalidad en pacientes hospitalizados, siendo la multirresistencia la mayor problemática mundial.

La resistencia a aminoglucósidos presenta una estrecha relación con la resistencia a antibióticos β -lactámicos. Esta asociación se debe principalmente a que los genes codificantes de enzimas modificadoras de aminoglucósidos a menudo se encuentran en los mismos plásmidos que albergan genes de β -lactamasas (González & Nieves, 2016). En el Ecuador, estudios con cepas de *Escherichia coli* productora de beta-lactamasa de espectro extendido (BLEE) causantes de infecciones sistémicas, ha revelado la presencia de genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos, presentando resistencia a cefalosporinas de todas las generaciones, quinolonas y aminoglucósidos. Esto ha impulsado el uso de antibióticos de amplio espectro como los carbapenémicos como última línea de defensa contra estas infecciones, sin embargo el uso de estos antibióticos podría ejercer una presión selectiva favoreciendo la aparición y propagación de mecanismos de resistencia más complejos como lo es la producción de enzimas carbapenemasas.

La identificación de genes de resistencia a fluoroquinolonas encontrada en todos los “Barcode” como parE, QnrB5, QnrB1, QnrB19, QnrS y gyrA es importante dada la relevancia clínica de esta familia de antibióticos sobre el tratamiento de infecciones. Estos son utilizados para tratar infecciones de vías urinarias, del tracto gastrointestinal, intraabdominales, de la piel y tejidos blandos, huesos y articulaciones (Shariati et al., 2022). El gen parE, junto con gyrA, codifica subunidades de la topoisomerasa IV y la ADN girasa, respectivamente, que son los blancos moleculares de las fluoroquinolonas. Mutaciones en estos genes pueden disminuir la afinidad del antibiótico por su sitio de acción, confirmando resistencia.

La resistencia a quinolonas mediada por plásmidos y codificada por los genes Qnr, actúa uniéndose y protegiendo a la girasa y a la topoisomerasa IV de la acción de las quinolonas. El primer reporte de gen se realizó en 1998 en una cepa clínica de *Klebsiella pneumoniae*, aislada de un cultivo de orina en Birmingham, Alabama (E.U.A.). Este tipo de genes van a codificar determinantes de resistencia que inducen aumentos de la concentración inhibitoria mínima (CIM), y no alcanzan los puntos de corte considerados como resistentes, facilitando la selección de mutantes con mayores niveles de resistencia a nivel cromosoma (García et al., 2018). Por lo tanto el hallazgo de los genes Qnr son preocupantes ya que fenotípicamente no se estaría detectando, generando presión selectiva de cepas resistentes. Esto podría explicar el aumento de resistencia de fluoroquinolonas que se ha dado en el año 2023 en el Hospital Docente de Calderón, ya que de acuerdo a datos de la Cartilla de susceptibilidad a antimicrobianos en el año 2022 ciprofloxacina en *Klebsiella pneumoniae* aislada de muestras de orina presentaba resistencia de 36%, mientras que para el año 2023 esta resistencia asciende al 43%.

En el análisis metagenómico se identificó la presencia del plásmido pIncX-SHV de *Klebsiella pneumoniae* conocido por su papel en la diseminación de resistencia a los betalactámicos. Este gen codifica para beta-lactamasas tipo SHV (sulfhidril- β -lactamasa), la cual media la resistencia constitutiva de *Klebsiella pneumoniae* a ampicilina, pero además, tiene la capacidad de inactivar a cefalosporinas. Este plásmido se transfiere horizontalmente, facilitando la propagación de la resistencia a antibióticos entre diferentes cepas y especies bacterianas. En el Hospital Docente de Calderón se reporta un aumento de la producción de beta-lactamasa de espectro extendido, ya que en el año 2022 el 25% de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* aislada de orina era productora de Beta-lactamasa, mientras que en el 2023 este valor asciende al 36%.

La identificación de perfiles de resistencia en *Klebsiella spp*, especialmente aquellos asociados con plásmidos como pIncX-SHV y Qnr debe ser comparada con los datos de otras instituciones o regiones geográficas para determinar si estos perfiles sugieren la circulación de clones de alto riesgo. En muchas regiones, *Klebsiella spp* resistente a carbapenémicos y productora de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) ha sido identificada como un patógeno de alta prioridad debido a su capacidad para causar brotes nosocomiales. Esto subraya la importancia de la vigilancia genómica y epidemiológica coordinada para controlar la propagación de estos patógenos resistentes y desarrollar estrategias efectivas de control y tratamiento.

La ventaja de realizar caracterización genotípica de resistencia bacteriana mediante secuenciación de genoma completo es fundamental, ya que a diferencia de las determinaciones fenotípicas, que dependen de características observables de resistencia, la secuenciación permite una identificación exhaustiva de todos los genes que podrían estar implicados en uno o más mecanismos de resistencia antimicrobiana. Esta capacidad es crucial porque algunos mecanismos de resistencia pueden no ser detectables mediante pruebas fenotípicas tradicionales, ya que la resistencia puede estar latente o no expresarse fenotípicamente. La caracterización genotípica ofrece entonces, una visión más completa, precisa y detallada de los perfiles de resistencia, facilitando así una mejor comprensión de la propagación y evolución de la resistencia antimicrobiana. Esto no solo mejora la capacidad para monitorear y controlar la resistencia, sino que también proporciona una base sólida para el desarrollo de estrategias de tratamiento más efectivas y específicas.

5. Conclusiones

Este estudio reveló la presencia de múltiples genes de resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de enterobacterias, predominantemente *Klebsiella spp*, mediante secuenciación de genoma completo por nanoporos. Se identificaron genes asociados con resistencia a aminoglucósidos, fluoroquinolonas y mecanismos de bombas de eflujo, lo que sugiere un perfil de multiresistencia preocupante. La presencia de estos determinantes genéticos, especialmente los genes *qnr*, las bombas de eflujo como *acrA* y el plásmido *pIncX-SHV*, indican un desafío en el tratamiento de infecciones causadas por estos patógenos. Sin embargo, es notable la discrepancia entre la caracterización fenotípica inicial que sugería la presencia de carbapenemasas tipo KPC y la ausencia de estos genes en el análisis genómico, lo que subraya la importancia de combinar métodos fenotípicos y genotípicos en la caracterización de la resistencia antimicrobiana.

A pesar de las limitaciones técnicas encontradas, como el bajo rendimiento de secuenciación y las discrepancias en la identificación taxonómica, este estudio proporciona información valiosa sobre la epidemiología molecular de la resistencia antimicrobiana en un contexto hospitalario ecuatoriano. La identificación del plásmido *pIncX-SHV* en *Klebsiella spp*. sugiere la presencia de elementos genéticos móviles capaces de diseminar la resistencia a betalactámicos. Estos hallazgos resaltan la necesidad de implementar estrategias de vigilancia genómica más robustas y sistemáticas para monitorear la evolución y propagación de la resistencia antimicrobiana en entornos clínicos, lo cual es crucial para informar políticas de control de infecciones y guiar decisiones terapéuticas en el manejo de infecciones causadas por enterobacterias multiresistentes.

6. Recomendaciones

Para mejorar la precisión y la exhaustividad en el análisis genómico de la resistencia antimicrobiana, se recomienda realizar una nueva secuenciación utilizando el kit. Este kit Rapid Barcoding Kit 24 V14 (SQK-RBK114.24) permite la multiplexión de hasta 24 códigos de barras, con una precisión de 99% lo que no solo incrementa la capacidad de análisis de múltiples muestras, sino que también mejora la resolución y la calidad de los datos obtenidos. Además, se sugiere utilizar una Flowcell R10.4.1, la cual tiene la capacidad de realizar dobles lecturas, proporcionando mayor sensibilidad y una precisión mejorada en la detección de secuencias, optimizando así la calidad general de los datos. Complementariamente, es aconsejable ampliar el uso de herramientas bioinformáticas más allá de la plataforma EPI2ME, que ofrezcan análisis más robustos y detallados. Estas herramientas adicionales pueden proporcionar una visión más completa y precisa del perfil genético de resistencia, apoyando el desarrollo de estrategias de control y tratamientos más efectivos.

7. Financiamiento/Fondos:

Esta investigación fue financiada por la Universidad Internacional SEK. El Hospital General Docente de Calderón: no realizó ningún aporte económico para el desarrollo del presente estudio.

8. Agradecimientos:

Al Hospital de Calderón por permitir la realización de esta investigación. A la Universidad Internacional SEK brindando el espacio y los recursos necesarios para llevar a cabo el estudio. Además, al coordinador del laboratorio clínico Dr Milton Nuñez por el apoyo y por permitir la realización de esta investigación. Asimismo, al equipo de microbiología Eduardo Montalvo y Maritza Paez por facilitar el acceso al biobanco de cepas, fundamental para el desarrollo de este trabajo.

9. Conflictos de Interés:

Los autores declaran no tener conflicto de interés

10. Referencias citadas:

1. Aslam, B., Khurshid, M., Arshad, M. I., Muzammil, S., Rasool, M., Yasmeen, N., Shah, T., Chaudhry, T. H., Rasool, M. H., Shahid, A., Xueshan, X., & Baloch, Z. (2021). Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 771510. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.771510>
2. Boolchandani, M., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2019). Sequencing-based methods and resources to study antimicrobial resistance. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0108-4>
3. Camacho Silvas, L. A. (2023). [Bacterial resistance, a current crisis.]. *Revista española de salud pública*, *97*, e202302013.
4. Cercenado, E. (2015). Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. *Rev Esp Quimioter*, *28*, 8–11. <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimi->
5. Doménech García, N., & Cal Purriños, N. (2014). Biobancos y su importancia en el ámbito clínico y científico en relación con la investigación biomédica en España. *Reumatología Clínica*, *10*(5), 304–308. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2014.02.011>
6. EPI2ME. (2024). *Workflows. Antimicrobial Resistance* (Versión v2023.04.26-1808843) [English; Windows]. Oxford Nanopore Technologies, Didco, UK. <https://epi2me.nanoporetech.com/workflow-docs-8?version=2023.04.26-1808834>
7. García, J., Martínez, D., Caña, L., González, D., Rodríguez, L., Rodulfo, H., Donato, M. D., & Guzmán, M. (2018). Genes qnr en Enterobacteriaceae aisladas en un hospital de Venezuela. *Revista chilena de infectología*, *35*(2), 147–154. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000200147>
8. González, A., & Nieves, B. (2016). Resistencia a aminoglucósidos y quinolonas en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas en dos unidades de cuidados intensivos del Hospital Universitario de Los Andes Mérida, Venezuela, entre 2007 y 2009. *Revista Médicas UIS*, *29*(2). <https://doi.org/10.18273/revmed.v29n2-2016002>
9. Ivanova, O., Blumenkrants, D., Krylova, E., Soltynskaya, I., Goncharova, A., Chaikin, E., Akhmetzyanova, A., & Panin, A. (2023). Founding of the culture collection of antibiotic-resistant strains of zoonotic bacteria in the Russian Federation. *Veterinary World*, 1451–1460. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.1451-1460>
10. Jain, M., Koren, S., Miga, K. H., Quick, J., Rand, A. C., Sasani, T. A., Tyson, J. R., Beggs, A. D., Dilthey, A. T., Fiddes, I. T., Malla, S., Marriott, H., Nieto, T., O'Grady, J., Olsen, H. E., Pedersen, B. S., Rhie, A., Richardson, H., Quinlan, A. R., ... Loose, M. (2018). Nanopore sequencing and assembly of a human genome with ultra-long reads. *Nature Biotechnology*, *36*(4), 338–345. <https://doi.org/10.1038/nbt.4060>
11. Liu, A. W., Villar-Briones, A., Luscombe, N. M., & Plessy, C. (2022). Automated phenol-chloroform extraction of high molecular weight genomic DNA for use in long-read single-molecule sequencing. *F1000Research*, *11*, 240. <https://doi.org/10.12688/f1000research.109251.1>
12. Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., & Hearst, J. (1995). Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*. *1995*, *16*(1), 45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02390.x>
13. Macheti, M., Errecalde, J., & Mestorino, N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multirresistencia. *Anál e t A Ve t 2011*; *31* (2): 40-53, *31*, 40–53.
14. Ministerio de Salud Pública. (2018). *REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS EN ECUADOR 2014-2018*. https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf
15. Nakayama, Y., Yamaguchi, H., Einaga, N., & Esumi, M. (2016). Pitfalls of DNA Quantification Using DNA-Binding Fluorescent Dyes and Suggested Solutions. *PLOS ONE*, *11*(3), e0150528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150528>
16. National Library of Medicine. (2023). *Medical Subject Headings (MeSH)* [Dataset]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/?term=biobanks>
17. Oxford Nanopore Technologies. (2024, marzo). Celda de flujo (R10.4.1) [Oxford Nanopore Technologies]. *Celda de*

Flujo (R10.4.1). <https://store.nanoporetech.com/flow-cell-r10-4-1.html>

18. Promega. (2023, octubre). *Wizard® Genomic DNA Purification Kit MANUAL TM050*. file:///C:/Users/tatty/Downloads/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20TM050.pdf
19. Radukic, M. T., Brandt, D., Haak, M., Müller, K. M., & Kalinowski, J. (2020). Nanopore sequencing of native adeno-associated virus (AAV) single-stranded DNA using a transposase-based rapid protocol. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 2(4), lqaa074. <https://doi.org/10.1093/nargab/lqaa074>
20. Ruan, Z., Wu, J., Chen, H., Draz, M. S., Xu, J., & He, F. (2020). Hybrid Genome Assembly and Annotation of a Pandrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain Using Nanopore and Illumina Sequencing. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 199–206. <https://doi.org/10.2147/IDR.S240404>
21. Sakyi, S. A., Effah, A., Naturinda, E., Senu, E., Opoku, S., Amoani, B., Agordzo, S. K., Mensah, O. S. O., Grant, J., Abban, E., Buckman, T. A., Kwarteng, A., Ephraim, R. K. D., & Danquah, K. O. (2023). Comparison of Modified Manual Acid-Phenol Chloroform Method and Commercial RNA Extraction Kits for Resource Limited Laboratories. *International Journal of Clinical Practice*, 2023(1), 9593796. <https://doi.org/10.1155/2023/9593796>
22. Shariati, A., Arshadi, M., Khosrojerdi, M. A., Abedinzadeh, M., Ganjalishahi, M., Maleki, A., Heidary, M., & Khoshnood, S. (2022). The resistance mechanisms of bacteria against ciprofloxacin and new approaches for enhancing the efficacy of this antibiotic. *Frontiers in Public Health*, 10, 1025633. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1025633>
23. Silvas, L. A. C. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Rev Esp Salud Pública*, 19(36815211). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10541255/#:~:text=La%20resistencia%20bacteriana%20es%20uno,d%20C3%ADa%20mueren%202.000%20personas%2019%20>
24. Suárez Contreras, L. Y., & Yañez Meneses, L. F. (2018). Extracción de ADN de bacterias conservadas en el banco de cepas de la Universidad Francisco de Paula Santander sede Campos Eliseos. *Respuestas*, 23(S1), 24–28. <https://doi.org/10.22463/0122820X.1496>
25. Vázquez-Cabrera, N., Espinosa-Márquez, A., & Cedillo-Ramírez, M. L. (2023). Evolución histórica de la Organización Mundial de la Salud y la resistencia a los antimicrobianos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, 1. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.51>
26. Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., & Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278. <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>
27. *WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024*. (2024). World Health Organization.
28. Zhao, Z., Cui, H., Song, W., Ru, X., Zhou, W., & Yu, X. (2020). A simple magnetic nanoparticles-based viral RNA extraction method for efficient detection of SARS-CoV-2. <https://doi.org/10.1101/2020.02.22.961268>

Anexo 1:



Ministerio de Salud Pública
Hospital General Docente de Calderón

Anexo 15. Carta de exención

Quito, 29 de noviembre de 2023

Señor
Investigador principal
Milton Giovanni Núñez Ortiz
Presente

De mi consideración,
El Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos del Hospital General Docente de Calderón (CEISH-HGDC), una vez que revisó el protocolo de investigación titulado **"Determinantes genéticos implicados en la resistencia antimicrobiana en la colección de aislados de la familia Enterobacteriaceae colectados durante los años 2021, 2022 y 2023 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador"**, codificado como CEISH-HGDC 2023-009, notifica a Usted que este proyecto es una investigación exenta de evaluación por parte del CEISH, de acuerdo con lo establecido en la normativa legal vigente.

Descripción de la Investigación:

- Tipo de estudio: Observacional Transversal
- Duración del estudio: cinco meses
- Instituciones participantes: Hospital General Docente de Calderón
- Investigadores del estudio:
Milton Núñez Ortiz; José Ramírez Iglesias; Juan Navarro; Verónica Chuquitarco Catagña; María Basantes Lasso; Tatiana Guevara Bahamonde; Maritza Páez Llerena; Eduardo Montalvo Varela.

Documentación de la investigación:

Nombre de Documentos	Número de páginas	Fecha
Protocolo de investigación	18	13/11/2023
Instrumento de recolección	6	13/11/2023
Declaración de responsabilidad	3	13/11/2023
Carta de No conflicto de intereses	1	13/11/2023
Carta de Interés Institucional	1	13/11/2023

Esta carta de exención tiene una vigencia de un año, contado desde la fecha de recepción de esta documentación. La investigación deberá ejecutarse de conformidad a lo descrito en el protocolo de investigación presentado al CEISH-HGDC. Cualquier modificación a la documentación antes descrita, deberá ser presentada a este Comité para su revisión y aprobación.

Atentamente



Cardenas O. Javier, PhD
Presidente Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos
Hospital General Docente de Calderón
Teléfono: 023952700, ext. 2303
Correo electrónico: [ceish@hgdc.gob.ec/](mailto:ceish@hgdc.gob.ec)

Dirección: Av. Capitán Giovanni Calles y Derbí, vía a Marianas
Código postal: 170201 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593-2-3952 700
www.hgdc.gob.ec



Figura A1: Resolución por parte del Comité de Bioética del Hospital Docente de Calderón CEISH-HGDC

DII-Septiembre 2024