



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**“Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”**

Realizado por:

**María Gabriela Basantes Lasso**

Director del proyecto:

**José Rubén Ramírez Iglesias**

Como requisito para la obtención del título de:

**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

*Quito, 5 de abril del 2024*

“Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

### DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, MARÍA GABRIELA BASANTES LASSO, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° 1718411950, declaro bajo juramento que el Proyecto de Investigación titulado: **Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador** es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

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



**María Gabriela Basantes Lasso**

C.C: 1718411950

“Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

### **DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

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

**José Rubén Ramírez Iglesias**

CC: 3050666993

“Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

**LOS PROFESORES INFORMANTES**

**GIANINA LIZETH SUÁREZ RODRÍGUEZ**

**ADRIANA GABRIELA CASTILLO LANDIN**

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



---

**Gianina Lizeth Suárez Rodríguez**

CC:1720210978



---

**Adriana Gabriela Castillo Landín**

CC:1718555871

*Quito, 5 de abril del 2024*

“Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

#### **DEDICATORIA**

A Dios por ser mi guía y protección en mi camino de vida;  
A mi querido hijo Martín, mi mayor fuente de amor e inspiración para ser cada día mi mejor versión; mil gracias por ser mi apoyo constante y fuerza inquebrantable para seguir siempre adelante;  
A mi madre, quien han sido siempre mi luz en la oscuridad, gracias por creer siempre en mí y ser mi mejor ejemplo de vida a seguir. Este triunfo va por ti;  
A mi padre, quien con su cariño, apoyo y preocupación constante ha sido mi gran motivación para culminar esta etapa;  
A mis hermanos y mi familia, mil gracias por su cariño y ayuda incondicional durante este arduo camino;  
A Lucrecita, por estar a mi lado siempre en cada etapa de mi vida. Los momentos quedarán ahí siempre guardados!  
A Verito, gracias por las risas y bonitos momentos compartidos durante el transcurso de nuestros estudios y tesis.  
Y a todas las demás personas especiales que estuvieron a mi lado caminando en este tiempo de estudio y superación. Gracias!

“Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador”

### **Agradecimientos**

A mi tutor de tesis, Dr. José Rubén Ramírez, mi profesor y guía de tesis, gracias por sus valiosas enseñanzas, apoyo y tiempo invertido en el desarrollo de la investigación.

A la Universidad Internacion UISEK por su ayuda con las instalaciones, reactivos e insumo utilizados.

Al Hospital General Docente de Calderón, por proveer las instalaciones y colección de aislados utilizados en este estudio.

## Análisis de perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón, Quito-Ecuador.

María Basantes <sup>1</sup>, José Rubén Ramírez <sup>2</sup>, Juan Carlos Navarro <sup>3</sup>, Giovanni Núñez <sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; maria.basantes@uisek.edu.ec\*

<sup>2</sup> Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; jose.ramirez@uisek.edu.ec

<sup>3</sup> Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; juancarlos.navarro@uisek.edu.ec

<sup>4</sup> Hospital General Docente Calderón, Laboratorio Clínico; milton.nuñez@hgdc.gob.ec

\* Autor de Correspondencia: maria.basantes@uisek.edu.ec.

**Resumen:** Un grupo de bacterias de importancia clínica son los bacilos gramnegativos (BGN) de la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales han dado lugar a varias infecciones en el ser humano. Los aislados del género *Klebsiella* y *Enterobacter* constituyen enterobacterias que generalmente están relacionadas con infecciones adquiridas en la comunidad y en el ámbito hospitalario. La propagación de la resistencia por la enzima KPC constituye el mecanismo de resistencia más común en el Ecuador cuya naturaleza multiresistente puede causar graves problemas de salud. El gen *bla*<sub>KPC</sub> que codifica resistencia a carbapenémicos y otros betalactámicos puede estar asociado a otros determinantes que causan resistencia a otros tipos de antibióticos. **Objetivo:** Analizar los perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón mediante la plataforma de secuenciación de tercera generación Oxford Nanopore, para detectar los genes asociados con la resistencia fenotípica en esta casa de salud. **Materiales y métodos:** Para este estudio se utilizaron 20 aislados bacterianos pertenecientes a la colección de microorganismos del hospital, las cuales previamente fueron caracterizadas fenotípicamente como productoras de enzimas KPC. Dentro de la metodología utilizada, se efectuó la extracción de ADN bacteriano, se preparó la librería genómica con el kit Rapid Barcoding RBK-004, y posteriormente se realizó el análisis de las secuencias en el secuenciador MinION. Para el análisis de los resultados se utilizó la Plataforma EpI2ME. **Resultados obtenidos:** Las variantes del gen *bla*<sub>KPC</sub>: *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>KPC-3</sub>, *bla*<sub>KPC-6</sub> y *bla*<sub>KPC-14</sub> confirieron resistencia enzimática a Betalactámicos; mientras que los alelos identificados como *qnrB* y *oqxA* codificaron la resistencia a las fluoroquinolonas.

**Palabras clave:** resistencia antimicrobiana; genes de resistencia; *Enterobacteriaceae*, antibióticos, hospital

**Summary:** A group of bacteria of clinical importance are the gram-negative bacilli (GNB) of the family *Enterobacteriaceae*, which have given rise to several infections in humans. Isolates of the genus *Klebsiella* and *Enterobacter* constitute enterobacteria that are generally related to infections acquired in the community and in the hospital setting. The spread of resistance by the KPC enzyme constitutes the most common resistance mechanism in Ecuador, whose multidrug-resistant nature can cause serious health problems. The *bla*<sub>KPC</sub> gene that encodes resistance to carbapenems and other betalactams may be associated with other determinants that cause resistance to other types of antibiotics. **Objective:** Analyze the molecular profiles of antimicrobial resistance in bacterial isolates of the *Enterobacteriaceae* family obtained during 2021 at the Calderón General Teaching Hospital using the Oxford Nanopore third-generation sequencing platform, to detect the genes associated with the phenotypic resistance in this health home. **Materials and methods:** For this study, 20 bacterial isolates belonging to the hospital's collection of microorganisms were used, which were previously phenotypically characterized as producers of KPC enzymes. Within the methodology used, bacterial DNA was extracted, the genomic library was prepared with the Rapid Barcoding RBK-004 kit, and the sequences were subsequently analyzed in the MinION sequencer. The EpI2ME Platform was used to analyze the results. Results obtained: The *bla*<sub>KPC</sub> gene variants: *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>KPC-3</sub>, *bla*<sub>KPC-6</sub> and *bla*<sub>KPC-14</sub> conferred enzymatic resistance to Beta-lactams; while the alleles identified as *qnrB* and *oqxA* encoded resistance to fluoroquinolones.

**Keywords:** antimicrobial resistance; resistance genes; *Enterobacteriaceae*, antibiotics, hospital

## 1. Introducción

La resistencia antimicrobiana (RAM) se define como la capacidad natural o adquirida que presenta una bacteria de resistir a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un agente antimicrobiano, a través de mutaciones en los genes cromosómicos o por transferencia de material extracromosómico (ADN plasmídico, transposones o integrones) que codifican ciertas enzimas (Celis-Bustos et al., 2017; Calderón & Aguilar, 2016; Bush & Jacoby, 2010). De esta manera, en la resistencia adquirida se produce una modificación de la carga genética bacteriana en cepas de una especie normalmente sensible (Oromí, 2000), dando origen a la adquisición de mecanismos de defensa ante la exposición prolongada a antimicrobianos mediante procesos bioquímicos que influyen en la dispersión de dicha resistencia a nivel hospitalario (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2018).

En consecuencia, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en el año 2011 declaró a la RAM como un problema de salud pública y una de las mayores amenazas a nivel mundial. En el año 2015, con el fin de detener su progresión y mitigar su impacto, se estableció un plan de acción que consistió en la reducción de la incidencia de la infectividad a lo largo del tiempo (Alós, 2015; Fariña, 2016; Organización Mundial de la Salud, 2020). Sin embargo, la Organización Panamericana de la Salud (2021) declaró que se han producido más de 700 mil muertes en el mundo y que se prevee que para el año 2050, existirán aproximadamente 10 millones de muertes a causa de infecciones causadas por bacterias resistentes a los antimicrobianos. En el caso del Ecuador, el país ya cuenta con el Plan Nacional para la prevención y control de la RAM (2019-2023) liderado por el Ministerio de Salud Pública (MSP) y el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública- INSPI (Ministerio de Salud, 2018). La red del sistema de vigilancia RAM del Ecuador está conformada por 44 laboratorios clínicos de hospitales que forman parte del Sistema Nacional de Salud (SNS), cuyo objetivo es la realización de pruebas fenotípicas de susceptibilidad antimicrobiana para generar información sobre los cambios de patrón de resistencia antimicrobiana (Ministerio de Salud Pública, 2018).

Un grupo de bacterias de importancia clínica son los bacilos gramnegativos (BGN) de la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales han dado lugar a varias infecciones en el ser humano (Pérez-Guerrero et al., 2014). En el caso de pacientes hospitalizados, estas bacterias producen infecciones nosocomiales con una amplia variedad de cuadros clínicos, como infecciones relacionadas al tracto respiratorio y urinario, heridas operatorias y bacteriemias primarias (Almirante, 2002). Sin embargo, los mecanismos de resistencia obtenidos por BGN pueden originar la aparición y diseminación de bacterias multiresistentes (Hernández-Gómez et al., 2014) cuya resistencia antimicrobiana no solo está determinada por mutaciones cromosómicas sino por transferencia horizontal de material genético mediante conjugación, transducción o transformación bacteriana (OMS, 2020; Calderón & Aguilar, 2016; Ochman et al., 2000). Actualmente, el incremento de la resistencia por enzimas bacterianas sigue siendo uno de los problemas más críticos en BGN y que se debe seguir afrontando en la salud pública (Fica, 2014). Acorde a Hernández-Gómez et al. (2014), los mecanismos de resistencia más importantes en BGN son la producción de enzimas betalactamasas específicamente betalactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas.

En el ámbito hospitalario, los factores que pueden agravar el problema de la RAM son el uso generalizado de antimicrobianos en pacientes inmuno-comprometidos y en unidades de cuidados intensivos hospitalarios (UCI), manejo progresivo de dispositivos médicos invasivos (ventiladores, catéteres, vías intravenosas periféricas y sondas uretrales) y la generación de infecciones cruzadas que podrán ocasionar el desarrollo de enfermedades causadas por bacterias resistentes asociadas a la atención en salud (Yanet et al., 2017). Existen otros factores como el lavado inadecuado de manos, la falta de medidas en el aislamiento del paciente, la ausencia de control en el

ingreso de personal a áreas críticas (UCI, cirugía, salas de hospitalización) y el uso continuo de guantes, mascarillas y batas, que también contribuyen al incremento de esta problemática (Martín et al., 2003). Por otro lado, es importante destacar que en la pandemia por COVID-19 desarrollada en el año 2020, existió un incremento de la RAM debido al uso excesivo o inadecuado de antibióticos para el tratamiento de las coinfecciones bacterianas (OPS, 2022); además del inconveniente para diferenciar entre la sintomatología del COVID-19 y las infecciones bacterianas durante los primeros inicios de la pandemia (Mustafa et al., 2021).

En consecuencia, los perjuicios de las infecciones causadas por bacterias multirresistentes pueden ser graves dentro del sistema de salud, ya que pueden ocasionar el incremento del fracaso terapéutico, desarrollo de enfermedades de mayor duración, elevada mortalidad, estancias hospitalarias más extensas y pérdida de protección en el caso de pacientes que se someten a procedimientos quirúrgicos. A su vez, las consecuencias indirectas están relacionadas en gran medida con la afectación en el progreso de la salud pública y con ello, el desequilibrio de la economía mundial debido a la menor productividad de la sociedad, a causa de enfermedades bacterianas recurrentes (OMS, 2016; Hernández-Gómez et al., 2014).

En el Ecuador predomina la resistencia por el gen *bla*<sub>KPC</sub> en la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, presentándose el primer reporte en la provincia del Cañar en el año 2010 (Iñiguez et al., 2012; Ministerio de Salud Pública, 2018). Esta bacteria se la considera junto a *E. coli* como los microorganismos de mayor diseminación causantes de un gran número de infecciones asociadas a la atención en salud (Ministerio de Salud Pública, 2018). En un estudio realizado por Romero et al. (2017) se describió al gen *bla*<sub>NDM</sub> en *K. pneumoniae* ST 147 con plásmido del grupo IncA/C, el cual fue identificado en un paciente HIV positivo en Esmeraldas, a quién se le había administrado una triple terapia de fosfomicina, meropenem y colistina; mientras que, en un hospital de tercer nivel en la ciudad de Quito se estableció que la variante del gen *bla*<sub>KPC</sub> de mayor frecuencia fue el tipo 5 (*bla*<sub>KPC-5</sub>) (Prado et al., 2019). Además, Tamayo et al. (2022) reportaron en su estudio que las bacterias *K. pneumoniae* y *E. coli* estaban relacionadas con la producción de carbapenemasas (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>). En cuanto a la enterobacteria *E. coli*, se han descrito genes que codifican betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Garrido et al. (2017) reportaron este tipo de gen en infecciones del tracto urinario (ITU) en pacientes pediátricos en un hospital de tercer nivel de Quito con tratamiento con nitrofurantoína y fosfomicina; mientras que Zurita et al. (2019) identificaron varios clones (ST131, ST10, ST23, ST14) que contenían los genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> y *bla*<sub>SHV</sub>. Por otro lado, en el año 2020, se identificó un plásmido que contenía el gen *bla*<sub>OXA-48</sub>, determinándose que correspondía al plásmido IncL/M (pOXA-48) (Villacís et al., 2020). Finalmente, Gómez et al. (2022) reportaron el caso de un paciente con neumonía asociada a COVID-19 que presentó una sobreinfección por cepas multirresistentes de *K. pneumoniae* con patrón de resistencia KPC, NDM y BLEE. Se concluyó que la sobreinfección bacteriana fue producida por una contaminación cruzada debido al empleo de dispositivos invasivos en la UCI.

De tal manera, es necesario que en el Ecuador se sigan realizando estudios moleculares que enfatizan la continua vigilancia epidemiológica mediante la utilización de herramientas moleculares como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación de nueva generación. En el caso de la PCR, esta requiere un conocimiento anterior de la secuencia a analizar y no detecta todas las variantes existentes de un gen (Comas et al., 2020; Garza-Ramos et al., 2009); sin embargo no existen reportes en los que se haya utilizado la secuenciación de tercera generación mediante la tecnología Oxford Nanopore (ONT), la cual se basa en el uso de nanoporos como herramienta para la identificación de bases nucleotídicas del ADN en cadenas sencillas (Oxford Nanopore Technologies, 2008). La ventaja de esta tecnología radica en la generación de datos de secuenciación de lectura larga en tiempo real, permitiendo la caracterización de forma masiva de genes de resistencia bacteriana (Comas et

al., 2020), obteniéndose una información detallada de la variabilidad genómica y la identificación de nuevas variantes de genes de resistencia en los diferentes aislados bacterianos, actualizando así el panorama de la RAM en este establecimiento de salud (García-Lozano et al., 2013).

Con base a lo anteriormente expuesto, siendo el Hospital General Docente de Calderón de Quito un referente nacional para el acopio de datos para la Red de Vigilancia RAM, es de suma importancia complementar la información provista por pruebas fenotípicas con la secuenciación de tercera generación mediante la plataforma Oxford Nanopore, la cual es considerada como un estándar de referencia dentro de la vigilancia epidemiológica, para caracterizar el genoma completo bacteriano e identificar todas las variaciones genéticas que influyen en los mecanismos moleculares de resistencia a antimicrobianos; así como relacionar su evolución y diseminación con el alto índice de brotes hospitalarios a causa de enfermedades infecciosas en el Ecuador (Calero et al., 2023). Adicionalmente, la caracterización molecular de aislados también aportará a la prevención de infecciones nosocomiales hospitalarias y a la consecuente selección del tratamiento antibiótico más apropiado para el paciente (García-Lozano et al., 2013).

También, es importante destacar la importancia del uso de ceparios en estudios de investigación molecular, puesto que al tratarse de microorganismos aislados, caracterizados e identificados a partir de muestras biológicas obtenidas en diferentes periodos de tiempo, constituyen una fuente de recursos genéticos importante para la conservación de la diversidad biológica bacteriana. La preservación de la colección permite garantizar la viabilidad en estado inactivo y puro bajo condiciones que aseguren la calidad y estabilidad de las cepas sin que exista variaciones fenotípicas o mutacionales con respecto a las condiciones iniciales (Gutierrez-Jiménez et al., 2015).

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de investigación fue analizar los perfiles de resistencia antimicrobiana en aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* obtenidos durante el año 2021 en el Hospital General Docente de Calderón mediante la plataforma de secuenciación de tercera generación Oxford Nanopore, para detectar los genes asociados con la resistencia fenotípica en esta casa de salud.

---

## **2. Materiales y Métodos**

### **2.1 Área de Estudio y aprobación del proyecto**

#### **2.1.1 Área de Estudio**

El Hospital General Docente de Calderón fue inaugurado en el año 2015 en la parroquia de Calderón (Carapungo) perteneciente al Distrito Metropolitano de Quito. Los servicios que ofrece el hospital son consulta externa, emergencia, laboratorio clínico, imagen y hospitalización con las especialidades de Pediatría, Gineco-Obstetricia, Especialidades Clínicas y Quirúrgica, Centro Obstétrico, Neonatología y Unidad de Cuidados Intensivos para adultos. La cobertura de los servicios de salud se extiende a las parroquias de Nanegal a Gualea, Calderón a Guayllabamba, Condado a Calacali, Puengasí a Itchimbía, la Concepción a Zámiza, Tumbaco a Tababela y Cayambe. Además, atiende a pacientes de otros cantones rurales de la provincia de Pichincha y referidos de toda la zona norte del país cubriendo un total de 980.261 habitantes beneficiados (Hospital General Docente de Calderón, 2021).

#### **2.1.2 Aprobación del proyecto**

El día 22 de noviembre del 2023 mediante Memorando Nro. MSP-CZ9HGDC-2023-6024-M se menciona que una vez revisado el protocolo de investigación del presente proyecto por parte de la dirección de Investigación del Hospital General Docente de Calderón, se notifica que el mismo es de interés institucional por los resultados

que se pueden generar en cuanto a identificación molecular de los géneros de bacterias y la determinación de los genes de resistencia antimicrobiana en los aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* de este establecimiento de salud.

Por otro lado, el día 29 de noviembre del 2023 mediante Memorando Nro. MSP-CZ9HGDC-2023-6143-M se menciona que una vez revisado el protocolo de investigación con codificación CEISH-HGDC 2023-009 por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos del Hospital General Docente de Calderón (CEISH-HGDC) se declara a través de la carta de exención emitida como una investigación sin riesgo, por lo cual está libre de evaluación. Cabe destacar que la colección de aislados bacterianos no son consideradas muestras humanas por lo que estarían fuera de un marco normativo y no requiere de completar un Formulario de Consentimiento Informado para su uso.

## **2.2 Fases de investigación**

La presente investigación fue dividida en dos fases de ejecución. En la primera fase se realizó la comprobación de la viabilidad de los aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* en el laboratorio de microbiología del Hospital General Docente de Calderón de Quito. La segunda fase consistió en el análisis de los perfiles moleculares de resistencia antimicrobiana de los aislados bacterianos en el laboratorio de investigación (contención BSL2+) de la Universidad Internacional SEK (Campus Miguel de Cervantes). Los criterios de inclusión tomados a consideración fueron: aislados bacterianos que presentaron viabilidad y fueron positivos a la presencia de enzimas de resistencia bacteriana mediante caracterización fenotípica previa. Para el cumplimiento de los criterios de exclusión, se rechazaron los aislados bacterianos que al realizar la prueba de repique en medios de cultivo no presentaron viabilidad.

## **2.3 Metodología**

### **2.3.1 Obtención de aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae***

El laboratorio de microbiología del Hospital General Docente de Calderón efectuó el suministro de 20 aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* almacenados en crioviales en el año 2021 previo a una caracterización fenotípica basada en métodos microbiológicos de rutina, a partir de la cual se determinó la especie de cada aislado y la presencia de enzimas que hidrolizan los antimicrobianos.

En este estudio no se tomó a consideración información relacionada con la historia clínica del paciente y al tratarse de aislados bacterianos recuperados de cultivos solicitados en la atención habitual del paciente no se requirió un consentimiento individual por escrito. En la *Tabla A1* de la sección anexos se detalla la información general de cada aislado bacteriano por código de investigación.

### **2.3.2 Primera fase de investigación**

#### **2.3.2.1 Determinación de viabilidad en aislados bacterianos**

La viabilidad de los aislados bacterianos se comprobó a través del repique de los mismos en Tripteína Soya Agar (TSA) seguido de una incubación a 37°C por 24 horas. Posteriormente se realizó el aislamiento de colonias puras para ser sembradas en 1.5 mL de caldo nutritivo de lisogenia (LB) e incubadas a 37°C por 24 horas. Los tubos con crecimiento bacteriano fueron centrifugados a 4000 g durante 5 minutos. El pellet celular obtenido fue separado del sobrenadante líquido y conservado a -20°C por cuatro días y finalmente almacenado a -70°C hasta su uso en la fase molecular.

### 2.3.3 Segunda fase de investigación

La fase molecular consistió en la extracción y cuantificación fluorométrica del ADN total de cada aislado bacteriano. Seguido, se prepararon librerías genómicas que fueron cargadas en las celdas de flujo del analizador MinION obteniéndose datos crudos de secuenciación de ADN (raw data) que fueron convertidos en lecturas denominadas base (basecalling) por el software MinKNOW para posteriormente ser analizadas por la plataforma EPI2ME de Oxford Nanopore.

#### 2.3.3.1 Extracción y cuantificación del ADN bacteriano total

La extracción de ADN total de cada aislado bacteriano se realizó a partir de 1mL de pellet celular siguiendo el protocolo establecido por el kit comercial de purificación de ADN genómico Wizard® para bacterias gram negativas. El proceso de cuantificación del ADN extraído se realizó analizando 1uL de muestra previamente homogenizada con el kit Qubit 1X dsDNA HS en el fluorómetro Qubit 2.0 acorde a las especificaciones del fabricante (Invitrogen).

#### 2.3.3.2 Preparación de librerías genómicas y secuenciación en MinION

Para la secuenciación en nanoporos se realizó la preparación de cuatro librerías genómicas usando el kit de secuenciación rápida de códigos de barras (SQK-RBK004) utilizando una entrada total de ~ 400 ng de ADN molde por cada código de barras (BC) acorde a las especificaciones dadas en el protocolo del fabricante (Oxford Nanopore Technologies, 2023). Seguido se agruparon las muestras con código de barras (BC1, BC2, BC3 y BC4) en un tubo eppendorf colocando un volumen de 10 uL de cada BC. Posteriormente, se realizó un proceso de purificación de la librería genómica utilizando el kit de purificación de ADN SPRI basado en perlas magnéticas. En este proceso se añadió un volumen igual de perlas resuspendidas a toda la muestra colectiva con código de barras y se dejó incubar por 5 minutos. Luego, se colocó la mezcla en la gradilla magnética por 5 minutos más y se desechó el sobrenadante. Consecutivamente se efectuó dos lavados con etanol frío al 70% y se retiró nuevamente el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió las perlas con ADN en 10 uL de agua destilada ultrapura, se dejó reposar y se colocó nuevamente en la gradilla magnética por 5 minutos. Del paso anterior, se recuperó 10 uL de la librería genómica purificada para luego añadirse 1 uL del adaptador de secuenciación RAP. La reacción fue incubada en un termociclador por 5 minutos a 20°C seguido de 5 minutos más a 65°C.

Antes de cargar las librerías en las celdas de flujo MIN-106D del secuenciador MinION, se verificó el estado de las celdas de flujo y la funcionalidad del hardware mediante el software MinKNOW GUI (versión 5.0.5). Para verificar el estado de las celdas de flujo se efectuó un cebado de las mismas mediante el uso del kit EXP-FLP002. Una vez concluida la prueba de calidad, se cargó gota a gota 75 uL de la biblioteca para secuenciación a una a Flow Cell R9.4.1 (FLO-MIN106D con 512 nanoporos) del secuenciador MinION. La secuenciación fue programada en el modo High Accuracy Basecalling y se programó la secuenciación con criterios de calidad mínimos como quality check de 8 y tamaño mínimo de lecturas de 200 pb. El tiempo de duración de la secuenciación fue de 72 horas a -180 mV.

#### 2.3.3.3 Obtención y análisis de datos de secuenciación masiva

El secuenciador MinION produjo archivos en formato FAST5 que contenían datos crudos generados a partir de las lecturas eléctricas para posteriormente ser traducidas a bases nitrogenadas mediante la herramienta llamada de base (basecalling). Una vez finalizada la secuenciación los datos fueron almacenados en archivos FASTQ. Posteriormente se efectuó un filtrado de calidad y demultiplexación de las secuencias obtenidas. En el filtrado de calidad se realizó una eliminación de lecturas de baja calidad mientras que en la demultiplexación las secuencias de los adaptadores fueron removidas de las lecturas. Seguido, las lecturas fueron clasificadas acorde al código de barras asignado anteriormente.

Los archivos depurados FASTQ fueron analizados en el software EPI2ME (Oxford Nanopore Technologies) a través del protocolo Fastq Antimicrobial Resistance. Dentro de este protocolo se utilizó la herramienta FASTQ WIMP (What's in my pot) que permitió la identificación taxonómica de los aislados bacterianos a través de la comparación de las secuencias nucleotídicas analizadas con la base de datos del NCBI. Además, la detección de los genes de resistencia antimicrobiana se obtuvo accediendo a la herramienta ARMA mediante la cual se efectuó una comparación de las secuencias aminoacídicas bacterianas con la base de datos de Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Oxford Nanopore Technologies, 2008).

### 3. Resultados

#### 3.1 Librerías genómicas para secuenciación en MinION

En la Tabla 1 se muestra la clasificación por código de barras (BC) de 20 aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* pertenecientes a la colección de microorganismos del Hospital General Docente de Calderón. Los criterios de clasificación que se tomaron a consideración fue el año de almacenamiento, mecanismo fenotípico de resistencia y tipo de muestra. La asignación de los BC fue desde el BC1 al BC4 siendo variable el número de muestras agrupadas para cada uno de ellos. El género bacteriano común en los BC1 al BC3 fue *Klebsiella*; a diferencia del BC4 que contiene al género *Enterobacter*. El mecanismo de resistencia KPC fue característico en todos los aislados clínicos. Cabe destacar que el tipo de muestra sangre, orina, aspirado traqueal e hisopado rectal no será tomado a consideración dentro de los resultados, ya que estos datos solo fueron utilizados con fines didácticos para la organización de las bibliotecas genómicas.

**Tabla 1:** Asignación de código de barras (BC) a los aislados bacterianos de la familia *Enterobacteriaceae* pertenecientes al cepario del Hospital General Docente de Calderón de acuerdo al año, mecanismo de resistencia y tipo de muestra.

Año	Identificación fenotípica bacteriana	Mecanismo resistencia fenotípico	Tipo muestra	BC*
2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC	Sangre	BC1
2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC	Orina	BC2
2021	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	Aspirado traqueal	BC3
2021	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	KPC	Hisopado rectal	BC4

BC\* (Código de barras)

### 3.2 Control de calidad (QC) de la secuenciación

Los archivos en formato FASTQ obtenidos en el secuenciador MinION fueron posteriormente depurados y analizados en el software EPI2ME obteniéndose un informe general de calidad de todos los datos de secuenciación obtenidos a través de la herramienta QC, la cual detectó 3103 secuencias bacterianas con una longitud total de 15,4 Mpb y un promedio de las secuencias de 4956 pb.

En la Tabla 2 se muestra los principales parámetros de calidad obtenidos durante la secuenciación de cada BC observándose que en el BC4 se generó el menor número de lecturas con un valor de 41 mientras que el mayor valor se registró en el BC2 con 214 lecturas. Con respecto a la longitud de las secuencias obtenidas, se puede apreciar que las seis muestras de *Klebsiella* que conformaron el BC3 generaron un tamaño de fragmento de 1.4 Mpb y el promedio entre fragmentos fue de 6912 pb. Por el contrario, el BC1 que agrupó cinco muestras de *Klebsiella* registró un valor de 112,5 kpb correspondiendo al tamaño más pequeño de todos los fragmentos de BC obtenidos; además el promedio de los fragmentos generados fue de 929 pb reflejándose tamaños muy pequeños de fragmentos bacterianos.

**Tabla 2:** Análisis de la calidad de las secuencias obtenidas mediante la tecnología Oxford Nanopore (ONT).

BC*	Identificación fenotípica Bacteriana	Número Muestras	Número lecturas	Lecturas totales	Longitud promedio lecturas
BC1	<i>Klebsiella</i>	5	121	112,5 kpb	929 pb*
BC2	<i>Klebsiella</i>	4	214	946,8 kpb	4424 pb
BC3	<i>Klebsiella</i>	6	201	1.4 Mpb	6912 pb
BC4	<i>Enterobacter</i>	5	41	124,2 kpb	3030 pb

BC\* (Código de barras)

pb\* (pares de bases)

### 3.3 Identificación taxonómica de especie bacteriana

#### 3.3.1 Clasificación taxonómica por nucleótidos

La herramienta FASTQ WIMP del software EPI2ME realizó la clasificación taxonómica de los aislados bacterianos mediante la comparación de las secuencias nucleotídicas de las muestras que conforman cada BC contra una base de datos específica como la del NCBI.

En la Tabla 3 se muestra la comparación por BC de los resultados de identificación genómica bacteriana efectuado por el software EPI2ME contra la base de datos fenotípica del Hospital General Docente de Calderón del año 2021. Tal como se muestran en los resultados moleculares de identificación bacteriana de las muestras que conforman los BC1 al BC3, se puede apreciar que el género asignado es *Klebsiella* el cual coincide con datos fenotípicos previamente obtenidos. Esto contrasta, con los resultados obtenidos para las muestras del BC4 en el que la asignación molecular fue de *Escherichia*, la cual no es consistente con la asignación fenotípica de *Enterobacter*.

En cuanto al número de lecturas analizadas en los BC1 al BC3, se aprecia que van en un rango mínimo de 121 a un máximo de 214, de las cuales un porcentaje de secuencias que van desde el 49.5 al 74.6 fueron clasificadas dentro de varias asignaciones taxonómicas. De todos los géneros clasificados se tomó a consideración el género más abundante, donde los géneros *Klebsiella* y *Escherichia* registraron el mayor número de lecturas por cada BC

analizado. De lo anterior el BC2 obtuvo el mayor número de lecturas con un valor de 74. En el caso del BC4, se registró un valor muy bajo de secuencias analizadas de las cuales el 61% de secuencias fueron clasificadas y solo 8 lecturas asignaron molecularmente al género *Escherichia*.

**Tabla 3:** Comparación de los métodos de detección fenotípicos y moleculares en la identificación taxonómica de los aislados bacterianos pertenecientes al Hospital General Docente de Calderón, año 2021.

BC*	Identificación fenotípica	Identificación molecular ONT*	Número lecturas	Secuencias clasificadas	Lecturas asignadas
BC1	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	121	60 (49.5%)	18
BC2	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	214	145 (67.8%)	74
BC3	<i>Klebsiella</i>	<i>Klebsiella</i>	201	150 (74,6%)	68
BC4	<i>Enterobacter</i>	<i>Escherichia</i>	41	25 (61%)	8

BC\* (Código de barras)

ONT\* (Tecnología Oxford Nanopore)

### 3.4 Análisis de genes de resistencia

Con el uso de la herramienta ARMA del software EPI2ME, se efectuó la detección de los principales genes de resistencia antimicrobiana en cada uno de los BC analizados. Esta herramienta se basa en la detección de secuencias de proteínas en función de su similitud con la base de datos de Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD). La Tabla 4 hace referencia a los principales genes de resistencia detectados por ONT y la información proporcionada por el software en cuanto a porcentaje de cobertura e identidad de las secuencias aminoacídicas analizadas con la secuencia de referencia; además de los antibióticos afectados por dicha resistencia. Por otro lado, también se muestran los resultados relacionados a la detección fenotípica de la producción de enzimas Betalactamasas del tipo carbapenemasas en todos los aislados que conforman los diferentes grupos de BC. Dentro de los resultados también se puede apreciar que para los 20 genomas analizados se obtuvieron un total de 3 genes diferentes (*oqxA*, *KPC* y *qnrB*) implicados en la resistencia de los aislados de la familia *Enterobacteriaceae* tanto a antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos) como a no betalactámicos (fluoroquinolonas). Para el caso del gen de resistencia *bla<sub>KPC</sub>* se detectaron 4 diferentes variantes *bla<sub>KPC-2</sub>*, *bla<sub>KPC-3</sub>*, *bla<sub>KPC-6</sub>* y *bla<sub>KPC-14</sub>*.

**Tabla 4:** Detección de los genes de resistencia en aislados bacterianos del Hospital General Docente de Calderón, año 2021.

BC*	Fenotipo Resistencia	Gen resistencia ONT*	% Cobertura	% identidad	Antibiótico inhibido
BC1	KPC*	<i>oqxA</i>	90.0	91.2	Fluoroquinolonas
BC2	KPC	<i>bla<sub>KPC-6</sub></i>	98	90.9	Carbapenémicos Cefalosporinas Monobactámicos Penicilinas (penams)
		<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	99.7	90.7	Carbapenémicos
		<i>bla<sub>KPC-3</sub></i>	99.7	92.2	Cefalosporinas
		<i>bla<sub>KPC-14</sub></i>	98.5	95.8	Monobactámicos Penicilinas (penams)
BC3	KPC	<i>qnrB</i>	99.7	91.3	Fluoroquinolonas
		<i>qnrB</i>	99.6	90.0	Fluoroquinolonas

BC\* (Código de barras)

ONT\* (Tecnología Oxford Nanopore)

KPC\*(Enzimas Betalactamasas tipo carbapenemasas)

En los resultados obtenidos para cada BC analizado, se detectó en el BC1 la presencia del gen *oqxa* que confiere resistencia a las fluoroquinolonas con una identidad del 91.2 % con la secuencia del gen de referencia (cobertura del 90 %). La resistencia fenotípica por enzimas carbapenemas KPC no fue corroborada, ya que el gen *bla*<sub>KPC</sub> esperado no fue identificado. Para el caso del BC2, la resistencia fenotípica por enzimas carbapenemasas KPC fue confirmada con la identificación de la variante del gen *bla* KPC-6, la cual confiere resistencia a los antibióticos betalactámicos como cefalosporinas, carbapenémicos, monobactámicos y penicilinas. El porcentaje de identidad y cobertura identificado en esta variante fue de 90.9 y 98.

Los resultados en el BC3 consistieron en la detección de tres variantes del gen *bla* KPC: *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>KPC-3</sub> y *bla*<sub>KPC-14</sub>, los cuales confieren resistencia a los antibióticos betalactámicos anteriormente mencionados a la vez que se confirmó los resultados fenotípicos de resistencia con la enzima carbapenemasa KPC. Para las tres variantes del gen *bla*<sub>KPC</sub> los porcentajes de identidad con el gen de referencia fueron elevados obteniéndose para la variante *bla*<sub>KPC-2</sub> y *bla*<sub>KPC-3</sub> un valor de 99.7 y de 98.5 para la variante *bla*<sub>KPC-14</sub>. Los porcentajes de cobertura también fueron altos para las tres variantes del gen *bla*<sub>KPC</sub>, siendo el valor inferior de 95.8 para la variante *bla*<sub>KPC-14</sub> y el valor superior de 92.2 para la variante *bla*<sub>KPC-3</sub>. Por último, se detectó resistencia a los antibióticos quinolonas a través de la identificación de la variante *qnrB* del gen *qnr* cuyo porcentaje de identidad y cobertura fue de 91.3 y 99.7 con respecto al gen de referencia. Finalmente, en el BC4 se encontró la presencia del gen *qnrB* que codifica la resistencia a los antibióticos quinolonas, pero no se corroboró los resultados de resistencia fenotípica con la enzima KPC. Los porcentajes de identidad y cobertura obtenidos fueron 90.0 y 99.6 respectivamente.

#### 4. Discusión

La resistencia a los antibacterianos se ha convertido en un grave problema mundial con la aparición de nuevos patrones de resistencia, por lo que constituye una seria amenaza a la eficacia de la terapia antimicrobiana y ha limitado los esfuerzos para desarrollar nuevos fármacos. Así, una variedad de aislados patógenos gramnegativos de la familia *Enterobacteriaceae* han adquirido resistencia o multiresistencia (MDR) frente a múltiples antibióticos, esta última puede ser causada por la presencia simultánea de múltiples mecanismos de resistencia individuales que pueden estar mediados por plásmidos o cromosomas (Li & Nikaido, 2009). En el presente estudio se realizó la identificación molecular del género bacteriano de aislados causantes de enfermedades infecciosas y la detección de genes clínicamente relevantes que codifican resistencia antimicrobiana en esta casa de salud, mediante el uso de la secuenciación de tercera generación mediante la tecnología Oxford nanopore.

De acuerdo a Oromí (2000), el ambiente hospitalario constituye un ecosistema en el cual la resistencia bacteriana es muy alta, puesto que para prevenir y tratar las diferentes infecciones bacterianas causadas por bacterias patógenas resistentes o multiresistentes deben utilizarse diversos tipos de antibióticos. Además, la fácil diseminación de las resistencias se debe también a la alta densidad de enfermedades infecciosas en los pacientes, alta rotación y movilización del personal de salud y procedimientos terapéuticos realizados por los mismos.

En la secuenciación de 20 genomas de aislados bacterianos de *K. pneumoniae* y *E. cloacae* con identificación fenotípica previa de especie bacteriana, se obtuvo un total de 3103 lecturas cuya longitud total fue de 15,4M pb con un promedio de las secuencias bacterianas de 4956 pb.

De acuerdo a lo mencionado por Jin et al. (2016), los tamaños del genoma de las diversas cepas de *Enterobacter spp* fue de 4.81 M pb; esta información es corroborada por el estudio efectuado por Peng et al. (2024) en el que se reportó que el tamaño de la secuencia completa de un aislado de esta bacteria fue de 4.43 Mpb. Al efectuar la comparación entre el tamaño del genoma bacteriano reportado por los estudios en mención y el tamaño promedio encontrado entre secuencias bacterianas del BC4 (3030 pb), se pudo determinar que este tamaño promedio identificado en el presente estudio fue mucho menor al identificado por estudios.

Al realizar una revisión de todos los protocolos empleados en este estudio, se pudo identificar que los procedimientos empleados de extracción y purificación, cuantificación y purificación del ADN bacteriano con perlas magnéticas previo a la secuenciación estaban previamente validados en el laboratorio de investigación (*contención BSL2+*) de la Universidad Internacional SEK (Campus Miguel de Cervantes). En base a lo anterior, se puede mencionar que el número bajo de lecturas estuvo asociado al tiempo (más de 1 año) en el cual estuvo almacenado el kit de secuenciación rápida de códigos de barras (SQK-RBK004). Este antecedente pudo haber influido en la afectación directa de la capacidad de la enzima transposasa y de los procesos químicos implicados en la adición de los códigos de barras y componentes de adaptación en los extremos del ADN para que puedan ser secuenciados a través de los nanoporos de la celda de flujo.

Para la asignación molecular del género bacteriano, el software EPI2ME clasificó el número total de lecturas obtenidas (3103) acorde al BC asignado. Tomando en consideración que el número de lecturas obtenidas en este estudio fue bajo, era de esperarse que en los BC4 y BC1 se obtuvieran igualmente lecturas muy bajas en relación al resto. El BC que obtuvo el número más bajo de lecturas fue el BC4 con un número de 41 y una longitud total de la secuencia de 124,2 kpb. A este resultado le siguió el BC1, en el cual se obtuvo 121 lecturas con una longitud cercana al del BC4 que fue de 112,5kpb.

Dentro de los resultados obtenidos en la identificación taxonómica de los aislados bacterianos efectuada por la herramienta FASTQ WIMP, se confirmó que los resultados moleculares obtenidos a nivel de género (*Klebsiella*) para los BC1 a BC3 coincidieron con la caracterización fenotípica previa (*Klebsiella*), a excepción del BC4 en el cual se identificó molecularmente al género *Escherichia* y el resultado fenotípico esperado era el género *Enterobacter*. Este resultado contradictorio era de esperarse, por el número bajo de lecturas (41), del cual 25 secuencias fueron utilizadas para la clasificación taxonómica bacteriana y solo 8 de las secuencias se clasificaron dentro del género *Escherichia* a través de la comparación con la secuencia de referencia del NCBI. De lo anterior, es posible que el algoritmo de búsqueda de FAST WIMP haya efectuado una clasificación errónea debido al número bajo de secuencias analizadas. Se tomó a consideración en este estudio al género *Enterobacter* obtenido fenotípicamente en el BC4.

La detección molecular de los genes que codifican resistencia a antimicrobianos en cada BC se efectuó utilizando la herramienta ARMA, con la cual se identificó un total de 4 genes diferentes como *oqxA*, *bla<sub>KPC</sub>*, y *qnrB* con varios tipos de mecanismos de resistencia que más adelante se abordará. Para el gen *bla<sub>KPC</sub>* se obtuvo 4 variantes *bla<sub>KPC-2</sub>*, *bla<sub>KPC-3</sub>*, *bla<sub>KPC-6</sub>* y *bla<sub>KPC-14</sub>*.

Al efectuar la comparación de los genes detectados por la tecnología Oxford nanopore con la resistencia fenotípica encontrada (enzimas carbapenemasas tipo KPC), se identificó que para los BC1 y BC4 no coincidieron los resultados ya que se esperaba obtener genes *bla<sub>KPC</sub>* con resistencia a betalactámicos y se obtuvieron otros genes como *oqxA* y *qnrB* que codifican resistencia a los antibióticos fluoroquinolonas. Estos resultados son consistentes, ya que los porcentajes de identidad para estos genes fueron altos (*oqxA*: 91%; *qnrB*: 90 %); sin embargo, el número bajo de lecturas registradas en los dos BC no permitieron detectar el gen esperado *bla<sub>KPC</sub>*.

En los aislados que integran el BC3 se detectó varios tipos de resistencia a antibióticos (multirresistencia). La resistencia fenotípica determinada por la enzima KPC coincidió con la detección genotípica de cuatro variantes del gen de resistencia *bla<sub>KPC</sub>* que registraron un porcentaje alto de identidad (*bla<sub>KPC-2</sub>*: 90.7 *bla<sub>KPC-3</sub>*: 92.2 y *bla<sub>KPC-14</sub>*: 95.8) con la secuencia de referencia. Además, también se obtuvo la resistencia a fluoroquinolonas codificada por el gen *qnrB* con un porcentaje alto de identidad de 91.3%. Finalmente, en el BC2 también se registró una nueva variante del gen *bla<sub>KPC</sub>* que corresponde al *bla<sub>KPC-6</sub>* con un porcentaje de identidad del 90.9%.

Dentro de los resultados obtenidos por EPI2ME para el BC1, se obtuvo la identificación del gen *oqxA* adquirido por plásmidos y que codifica la resistencia a los antibióticos fluoroquinolonas (PMQR) en el género detectado de *Klebsiella*. Según Moosavian et al. (2021), los mecanismos específicos de salida de antibióticos también están codificados por elementos móviles como plásmidos que portan genes de resistencia y estos mecanismos constituyen las bombas de eflujo. La bomba de eflujo *OqxAB* es un elemento de resistencia a las fluoroquinolonas mediado por plásmidos que se encuentra en la familia *Enterobacteriaceae* (Kim et al., 2009; Li & Nikaido, 2009). De acuerdo a Amereh et al. (2022), existe una alta prevalencia de la bomba de eflujo *oqxAB* en *K. pneumoniae*. Tomando en consideración lo anterior y los resultados del estudio, se puede observar que los aislados clínicos de *Klebsiella* obtuvieron una resistencia a fluoroquinolonas mediada por elementos plasmídicos que portaban el gen *oqxA*. De tal manera, la bomba de eflujo *oqxAB* constituye uno de los mecanismos que se desarrolló a través de una posible transferencia conjugativa de resistencia a las fluoroquinolonas en aislados de *Klebsiella* dentro de esta casa de salud. Esto es consistente, ya que el principal origen genético de esta bomba de eflujo fue detectado en el cromosoma de *K. pneumoniae* (Wong et al., 2015).

Las fluoroquinolonas y  $\beta$ -lactámicos son antimicrobianos que tienen un amplio uso a nivel clínico (Amereh et al., 2022). Las fluoroquinolonas son usadas en el tratamiento de pacientes con infecciones intrahospitalarias y comunitarias. Las resistencias adquiridas a betalactámicos en enterobacterias, hizo que se incluya a estos antibióticos como una alternativa al tratamiento de infecciones originadas por microorganismos resistentes (Machuca, 2014; Moosavian et al., 2021). En este estudio, los resultados obtenidos en el BC1 que incluyen la detección del gen plasmídico *oqxA* y la resistencia fenotípica por enzimas carbapenemasas KPC se asocian con la adquisición de una multiresistencia a más de una familia de antibióticos que incluyen las fluoroquinolonas y betalactámicos. Lo anterior es consistente, ya que existen estudios que mencionan que esta bomba de eflujo se encuentra ampliamente distribuida entre aislados productores de enzimas BLEE y carbapenemasas (Rodríguez-Martínez, 2013).

La detección del gen *oqxA* en aislados del género *Klebsiella* fue un hallazgo encontrado en este estudio. El gen *oqxAB* se encuentra en las bacterias *K. pneumoniae* y *E. coli* en el cromosoma o plásmido y desempeñan un papel en la resistencia baja a moderada a las fluoroquinolonas (Amereh et al., 2022; Li et al., 2019). Este resultado difirió con lo obtenido por Moosavian., et al (2021), en el cual no se detectó la presencia del gen *oqxA*, *oqxB* o ambos en los aislados de *K. pneumoniae*, pero si en los aislados de *E. coli* y *Enterobacter gergoviae*, entre otros. Se encontró que la prevalencia para al menos uno de los genes *oqxA* y *oqxB* fue de 22% y el 15% respectivamente y del 12% en ambos genes.

Existen estudios relacionados con la contribución de la bomba de eflujo *oqxAB* a la resistencia a las fluoroquinolonas. En el estudio efectuado por Park et al. (2012), se confirmó mediante secuenciación la presencia del gen *oqxA* u *oqxB* o ambos genes en aislados de *K. pneumoniae*. El gen *oqxA* estuvo presente en el 14.4% de los aislamientos mientras que el 24.4 % fue positivo para ambos genes *oqxAB*. Los aislados que portaban el gen *oqxAB* mostraron resistencia a las fluoroquinolonas ciprofloxacina y levofloxacino. En el estudio efectuado por Amereh et al. (2022), la resistencia a la ciprofloxacina se relacionó significativamente con los niveles de expresión del gen *oqxA*. En este estudio es posible que los aislados tengan resistencia a la ciprofloxacina; sin embargo, es necesario tomar en cuenta otros mecanismos de resistencia intrínsecos en los aislados que influyan en la resistencia bacteriana a las fluoroquinolonas (Martínez-Martínez et al., 1998).

Los resultados obtenidos tanto para el BC4 y parte del BC3 están relacionados con la identificación del locus *qnrB* responsable de la resistencia a las fluoroquinolonas y que fue detectado dentro de un plásmido localizado en aislados del género *Enterobacter* y *Klebsiella* respectivamente. De acuerdo a Rodríguez-Martínez (2005), la función de la proteína que expresa este locus es proteger tanto a la ADN girasa como la topoisomerasa de la acción de las fluoroquinolonas. Este resultado derivado por el software EPI2ME es consistente, ya que de acuerdo a lo mencionado por Armas-Freire et al. (2016), la resistencia a las fluoroquinolonas está causada por mutaciones en los genes cromosómicos de la topoisomerasa tipo II (objetivos de la acción de las fluoroquinolonas) y por plásmidos que transportan genes *qnr*. Según Jacoby et al. (2006), el primer gen de resistencia a quinolonas (*qnr*) fue identificado en un plásmido con multiresistencia en la bacteria *K. pneumoniae*. Salah et al. (2019), menciona que la resistencia a las fluoroquinolonas mediada por plásmidos facilita su propagación y aumenta la frecuencia de cepas resistentes a esta familia de antibióticos. Existen estudios sobre la diseminación de los genes de resistencia a las fluoroquinolonas mediada por plásmidos en países latinoamericanos, donde la prescripción de este antibiótico es elevada. Se identificó que la mayoría de genes fueron identificados principalmente en Brasil (37,7%), México (18%) y Uruguay (11,5%), siendo el *qnrB* uno de los genes de mayor prevalencia entre aislados de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* y *Salmonella*.

En Ecuador se registró únicamente la presencia de este gen que codifica la resistencia a fluoroquinolonas (Vieira et al., 2020). Otros estudios como el efectuado en Togo (África) por Salah et al. (2019), determinaron que el gen *qnrB* fue el de mayor prevalencia entre los aislados de *Klebsiella spp* y *E. coli* con el 47,74%. La presencia simultánea de dos grupos de genes *qnr* produjo mayor frecuencia en resistencia a la quinolona ácido nalidíxico y la fluoroquinolona ciprofloxacina. Todos estos aislados también poseían sustituciones cromosómicas en los genes que codifican la girasa y la topoisomerasa, lo que explica su alto nivel de resistencia a las quinolonas. Cabe destacar, que en el BC3 también fue detectado el gen *bla<sub>KPC</sub>* que confiere resistencia a los  $\beta$ -lactámicos.

Como se mencionó anteriormente, en el caso del BC4 se tomó en cuenta la resistencia fenotípica mediada por la enzima KPC. De tal manera, en ambos BC se identificó la presencia de aislados bacterianos con características de multiresistencia mediado por un elemento plasmídico. Según Tran & Jacoby (2002), *qnr* por sí solo, proporciona un nivel de resistencia bajo en aislados bacterianos, por lo que pueden ser susceptibles a una fluoroquinolona. La importancia clínica reside en el efecto de aumento entre *qnr* y otras mutaciones de resistencia. Cabe destacar, que los subtipos *qnr* podrían coexistir solos o en asociación con genes de betalactamasa (Salah et al., 2019).

De tal manera, los genes *qnr* han sido identificados en plásmidos de resistencia a múltiples fármacos en aislados de la familia *Enterobacteriaceae* que producen enzimas betalactamasas (Salah et al., 2019; Chmelnitsky et al., 2008). Por ejemplo, se ha observado que la resistencia a la ciprofloxacina en *K. pneumoniae* está relacionada mayormente con la producción de enzimas BLEE. En un estudio de bacteriemia efectuado por Paterson et al. (2000), se detectó la producción de enzimas BLEE en el 60% de aislados de *K. pneumoniae* resistentes a la ciprofloxacina. En base a lo anterior, la relación entre la resistencia a la ciprofloxacina y la producción de enzimas BLEE puede deberse a la interacción entre el uso intensivo previo de antibióticos y las condiciones clínicas que favorecen la transferencia de bacterias resistentes a múltiples fármacos de un paciente a otro. En otro estudio efectuado por Alves et al. (2018), se encontró que aislados bacterianos del género *Enterobacter cloacae* portaban los genes *bla<sub>KPC</sub>* y *qnrB* codificados en el mismo plásmido.

En el presente estudio, se encontraron aislados bacterianos del género *Enterobacter* y *Klebsiella* con características de multiresistencia debido a la presencia de dos genes *bla<sub>KPC</sub>* y *qnrB* codificados en el mismo

plásmido. El gen *qnrB* podría otorgar un aumento de las concentraciones mínimas inhibitorias de las fluoroquinolonas, que podrían estar por debajo de los puntos de corte del CLSI; sin embargo, el nivel de resistencia podría verse incrementada con la existencia de otros mecanismos intrínsecos propios de los aislados como mutaciones cromosómicas que pueden alterar sus porinas o por sobreexpresión de bombas de eflujo. En el caso de estos aislados, no existió la presencia de un mecanismo intrínseco que pueda elevar el nivel de resistencia a las fluoroquinolonas, por lo no se reportó una resistencia fenotípica a las fluoroquinolonas. En base a lo anterior, estas cepas multiresistentes fueron resistentes a los antibióticos Betalactámicos pero susceptibles a fluoroquinolonas; donde el gen *qnrB* pudo haber sido cotransportado junto con el gen *bla<sub>KPC</sub>* en el mismo plásmido (Alves et al., 2018).

Las variantes del gen *bla<sub>KPC</sub>* (*bla<sub>KPC-2</sub>*, *bla<sub>KPC-3</sub>*, *bla<sub>KPC-6</sub>* y *bla<sub>KPC-14</sub>*) obtenidas en este estudio, indica la presencia de enzimas betalactamasas (KPC) en los aislados pertenecientes al BC2 y BC3. De acuerdo a Kitchel et al. (2010), la carbapenemasa KPC corresponde a un tipo de betalactamasa que puede hidrolizar la mayoría de los agentes  $\beta$ -lactámicos, incluido los carbapenémicos. Esto concuerda, con los resultados obtenidos por el software EPI2ME, donde no solo se registra resistencia a los antibióticos carbapenémicos, sino a otros tipos de antibióticos  $\beta$ -lactámicos como cefalosporinas, monobactámicos y penicilinas. Vera-Leiva et al. (2017), menciona que en los países de Brasil, Uruguay, Argentina y Ecuador se ha reportado cepas productoras de KPC en aislados de enterobacterias como *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Pseudomona spp*, *Enterobacter spp*, *S. marcescens* y *K. oxytoca*, siendo *K. pneumoniae* la principal especie productora de esta enzima. Lo anteriormente mencionado, coincidió con los resultados obtenidos en este estudio, ya que se identificó molecularmente la presencia de cuatro variantes del gen *bla<sub>KPC</sub>* localizados en aislados del género *Klebsiella*. Paciel et al. (2011) menciona que los genes *bla<sub>KPC</sub>* han sido detectados en plásmidos que varían en sus características de estructura y tamaño.

La amplia diseminación del gen *bla<sub>KPC</sub>* se debe a una mezcla de factores que incluyen la transmisión paciente-paciente de bacterias productoras de KPC y por transferencia horizontal de genes. La rapidez en la diseminación de los genes *bla<sub>KPC</sub>* en muchas especies bacterianas es consecuencia de la presencia de estos genes de resistencia en el transposón Tn 4401 portado en diversos tipos de plásmidos, que a su vez suelen estar asociados a otros determinantes genéticos que confieren resistencia a otros antimicrobianos como fluoroquinolonas y otros tipos de betalactámicos (Paciel et al., 2011; Vera-Leiva et al., 2017; Zurita et al., 2013). Esto último, pudo haber sucedido en los aislados del BC3 en los cuales se observó la presencia del gen *qnrB* y tres variantes del gen *bla<sub>KPC</sub>*.

En los aislados del BC3, se apreció la existencia de tres variantes del gen *bla<sub>KPC</sub>* (*bla<sub>KPC-2</sub>*, *bla<sub>KPC-3</sub>*, *bla<sub>KPC-14</sub>*) que probablemente hayan estado solas o en combinación entre ellas dentro del mismo plásmido; mientras que en los aislados del BC2 solo se observó la presencia de la variante *bla<sub>KPC-6</sub>*. De acuerdo a Kitchel et al. (2010), los niveles altos de resistencia a carbapenémicos en aislados de *K. pneumoniae* están relacionados con la producción de una cantidad elevada de KPC; que a su vez está determinada por un alto número de copias del gen *bla<sub>KPC</sub>* ubicado dentro del mismo plásmido. Si además de lo anterior, existe la presencia de un mecanismo de resistencia propio de la bacteria como las porinas no funcionales, este nivel de resistencia podría verse incrementado. En el caso de los aislados que posiblemente portaron una sola variante del gen *bla<sub>KPC</sub>*; según Kitchel et al., (2010), la producción baja de KPC no necesariamente está relacionado con un bajo nivel de resistencia a los carbapenémicos, ya que la presencia de los mecanismos intrínsecos anteriormente mencionados podría incrementar el nivel de resistencia. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el número de copias obtenidas del gen *bla<sub>KPC</sub>* pueden influir en el nivel de producción de la enzima KPC y por ende generar un alto nivel de resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae*, especialmente cuando se combina con un mecanismo intrínseco bacteriano que implica la carencia de porinas funcionales. De tal manera, la enzima KPC por sí sola no confiere resistencia a

los carbapenémicos. La generación de estos mecanismos de resistencia bacterianos, explicaría el porqué del incremento del nivel de resistencia fenotípico en los aislados analizados en este estudio (Kitchel et al, 2010).

Las enzimas KPC se han distribuido ampliamente entre enterobacterias de algunos países de América del Sur, donde su epidemiología local y características varían. En el caso de la variante bla<sub>KPC-2</sub>, esta se encuentra distribuida de forma endémica en los países de Brasil, Argentina, Chile y Colombia, en este último país también se ha identificado la variante bla<sub>KPC-3</sub> (Muñoz-Prince et al., 2013; Rodríguez et al., 2014; Vera-Leiva et al., 2017). En el año 2010, en Ecuador se identificó el primer caso de resistencia a carbapenémicos en *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC-2 (Herrera-Dután, 2021). En el caso de las enterobacterias productoras de KPC pertenecientes al BC2 y BC3, se detectó la presencia de las variantes bla<sub>KPC-2</sub> y bla<sub>KPC-3</sub>, bla<sub>KPC-6</sub> y bla<sub>KPC-14</sub>. Según Vera-Leiva et al. (2017), se han descrito 24 alelos del gen bla<sub>KPC</sub> que difieren entre sí por uno a tres aminoácidos y por su eficiencia hidrolítica en carbapenémicos; siendo las variantes bla<sub>KPC-2</sub> y bla<sub>KPC-3</sub> las más comunes entre aislados clínicos y son las responsables de brotes intrahospitalarios. En el Ecuador, según Soria-Segarra et al., (2020), la variante bla<sub>KPC-2</sub> es la más frecuente en el Ecuador (Zurita et al., 2013; Yauri et al, 2020).

Según el Ministerio de Salud Pública. (2018), en el Ecuador la producción de enzimas KPC, constituye el mecanismo más frecuente de resistencia a los carbapenémicos en la bacteria *K. pneumoniae* (Soria-Segarra et al., 2019). Los datos proporcionados por el sistema de vigilancia de resistencia a antimicrobianos informaron que la bacteria *K. pneumoniae*, uno de los patógenos más frecuentes en pacientes hospitalizados, presentó el 40% de resistencia a los carbapenémicos imipenem, meropenem y ertapenem y el 70% a cefalosporinas (Satán et al., 2023). Existen estudios efectuados en el Ecuador en el que se efectúa la identificación molecular de los determinantes de resistencia a carbapenémicos mediado por la producción de enzimas KPC. Zurita et al., (2013), efectuó la genotipificación de aislados productores de KPC-2 y otras enzimas betalactamasas mediante identificación por PCR y posterior secuenciación de los productos obtenidos. Se confirmó mediante secuenciación la presencia del gen bla<sub>KPC-2</sub> en todos los aislados y adicionalmente estos portaron al menos uno de los genes bla<sub>CTX</sub>, bla<sub>TEM</sub> y bla<sub>VIM</sub>. En otro estudio efectuado por Yauri et al., (2020) sobre detección de genes que codifican enzimas BLEE y carbapenemasas mediante PCR y secuenciamiento, se determinó que todos los 30 aislados bacterianos fueron positivos para el gen bla<sub>KPC-2</sub>. Además, se identificó que el 67% (20/30 aislados) fueron positivos para el gen bla<sub>CTX</sub>, 100% (30/30 aislados) para el gen bla<sub>SHV</sub> y el 93% (28 de 30) fueron positivos para el gen bla<sub>TEM</sub>.

En el presente estudio en el BC2 y BC3 se obtuvo la identificación de la variante bla<sub>KPC-2</sub> en los aislados bacterianos del género *Klebsiella*, resultado que coincidió con lo reportado por algunos autores (Zurita et al., 2013; Yauri et al, 2020) que mencionan que KPC-2 es la carbapenemasa reportada en mayor frecuencia en el Ecuador y en algunos países de América Latina (Yauri et al, 2020). La variante bla<sub>KPC-3</sub> es la segunda variante mayormente reportada en otros países de Latinoamérica como Colombia (Rodríguez et al, 2014). Las variantes KPC-6 y KPC-14 constituyen variante de la enzima KPC-2 (Lamoureaux et al, 2012; Wang et al, 2023). Según Lamoureaux et al. (2012) la enzima KPC-6 hidrolizó efectivamente a penicilinas, cefalosporinas (cefalotina, cefuroxima, cefotaxima y ceftriaxona) y aztreonam; mientras que KPC-14 según estudios efectuados tiene afinidad por ceftazidima/avibactam (Wang et al, 2023). Acorde a lo anteriormente mencionado, estas variantes del gen bla<sub>KPC</sub> no son endémicas en el Ecuador; sin embargo, Vera-Leiva et al., (2017) menciona que la diseminación del gen bla<sub>KPC</sub> entre zonas geográficas se puede atribuir a viajes internacionales. Esto resulta preocupante, ya que existen determinantes de resistencia que pueden diseminarse silenciosamente y podrían ser omitidos en los programas de vigilancia epidemiológica.

## 5. Conclusión

La propagación de la resistencia mediada por la enzima KPC entre cepas del género *Klebsiella*, constituye el mecanismo de resistencia más común en el Ecuador. Las variantes KPC-2, KPC-3, KPC-6 y KPC-14 fueron los alelos predominantes del gen *bla*<sub>KPC</sub>. Estas variantes fueron detectadas en los BC2 y BC3 analizados en este estudio; sin embargo el número bajo de lecturas registradas en el BC1 y BC4 no permitió confirmar molecularmente la resistencia fenotípica por la enzima KPC detectada previamente. Las variantes del gen *bla*<sub>KPC</sub> confirieron resistencia enzimática a Betalactámicos; mientras que los alelos identificados como *qnrB* y *oqxA* codificaron la resistencia a las fluoroquinolonas. La posible asociación entre mecanismos de resistencia en un mismo plásmido podría contribuir a la propagación de la resistencia a múltiples fármacos. Estos hallazgos nos demuestran que siguen surgiendo nuevas combinaciones de determinantes de resistencia transferibles que podrían afectar gravemente el tratamiento antibiótico con  $\beta$ -lactámicos y fluoroquinolonas.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente y en base a los resultados obtenidos con la secuenciación de tercera generación a través de la plataforma Oxford nanopore, se ha logrado obtener información valiosa sobre el panorama de la resistencia antimicrobiana en esta casa de salud mediante la identificación molecular del género bacteriano causantes de enfermedades infecciosas y la detección de genes que codifican resistencia antimicrobiana clínicamente relevantes; permitiendo de esta manera corroborar y ampliar la información fenotípica obtenida anteriormente para tomar acciones en la implementación del esquema antibiótico utilizado y de esta manera optimizar tempranamente la terapia con antimicrobianos.

## 6. Recomendación

Actualmente en el Ecuador existe el Plan Nacional para la prevención y control de la resistencia antimicrobiana 2019-2023 en donde varios grupos de investigación se han centrado en el estudio de la resistencia antimicrobiana; sin embargo, se recomienda que se profundice en la investigación genotípica en los diferentes establecimientos de salud que participan en este plan de salud, esto con el objetivo de obtener un mayor conocimiento sobre la distribución y frecuencia de las diferentes variantes alélicas que codifican la resistencia a betalactámicos y otros antibióticos de uso constante; las cuales no siempre podrían ser identificadas a través de los métodos fenotípicos convencionales (Yauri et al, 2020). Posterior, a este estudio también se recomienda que se efectúe nuevamente una caracterización genotípica de todos los aislados que conforman la colección bacteriana del Hospital General Docente de Calderón en el período 2021-2023 mediante el uso de un kit de secuenciación nuevo y de una generación más actual como el RBK-114 que tiene un porcentaje de precisión del 99%.

**Financiamiento/Fondos:** Esta investigación recibió apoyo económico de la Universidad Internacional -UISEK.

**Agradecimientos:** Hospital General Docente de Calderón, por haber proporcionado la colección de aislados utilizado en este estudio. Dr. Giovanni Núñez (ex) Jefe técnico de laboratorio clínico y Servicio de Medicina Transfusional.

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

## Referencias citadas

1. Almirante, B. (2002). Infecciones por enterobacterias, Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado, Volume 8, Issue 64, 2002, Pages 3385-3397, ISSN 0304-5412, [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(02\)70632-X](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(02)70632-X).
2. Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas y Microbiología

Clínica, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>

3. Alves, D. P., Carvalho-Assef, A. P. D., Conceição-Neto, O. C., Aires, C. A. M., Albano, R. M., Folescu, T. W., Ornelas, S. C. S., Leão, R. S., & Marques, E. A. (2018). Enterobacter cloacae harbouring blaKPC-2 and qnrB-1 isolated from a cystic fibrosis patient: a case report. *New microbes and new infections*, 25, 49–51. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2018.06.010>
4. Amereh F, Arabestani MR, Shokoohzadeh L. Relationship of OqxAB efflux pump to antibiotic resistance, mainly fluoroquinolones in Klebsiella pneumoniae, isolated from hospitalized patients. (2022). *Iran J Basic Med Sci* 2023; 26: 93-98. doi: <https://dx.doi.org/10.22038/IJBMS.2022.67095.14714>
5. Armas-Freire, P. I., Trueba, G., Proaño-Bolaños, C., Levy, K., Zhang, L., Marrs, C. F., Cevallos, W., & Eisenberg, J. N. (2016). Unexpected distribution of the fluoroquinolone-resistance gene qnrB in Escherichia coli isolates from different human and poultry origins in Ecuador. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 18(2), 85–90. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.237>
6. Bobay LM y Ochman H (2017) La evolución de la arquitectura del genoma bacteriano. *Frente. Gineta*. 8:72. doi: 10.3389/fgene.2017.00072
7. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
8. Calderón RG, Aguilar UL. (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Rev Med Cos Cen*. 73(621):757-763. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=69870>
9. Calero-Cáceres W, Ortuño-Gutiérrez N, Sunyoto T, Gomes-Dias C, Bastidas-Caldes C, Ramírez MS, et al. (2023). Whole-genome sequencing for surveillance of antimicrobial resistance in Ecuador: present and future implications. *Rev Panam Salud Publica*. 2023;47:e8. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.8>
10. Celis Bustos, Yamile Adriana, Rubio, Vivian Vanesa, & Camacho Navarro, María Marcela. (2017). Perspectiva histórica del origen evolutivo de la resistencia a antibióticos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19 (2), 105-117. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n2.69501>
11. Comas, I., Cancino-Muñoz, I., Mariner-Llicer, C., Goig, G. A., Ruiz-Hueso, P., Francés-Cuesta, C., García-González, N., & González-Candelas, F. (2020). Uso de las tecnologías de secuenciación masiva para el diagnóstico y epidemiología de enfermedades infecciosas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(Supl 1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.02.006>
12. Chmelnitsky, I., Navon-Venezia, S., Strahilevitz, J., & Carmeli, Y. (2008). Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene bla(KPC-2) carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible Enterobacter cloacae isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(8), 2962–2965. <https://doi.org/10.1128/AAC.01341-07>
13. Fariña, N. (2016). Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. 14(1), 4–5. [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1812-95282016000100001](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1812-95282016000100001)
14. Fica, C. (2014). Resistencia antibiótica en bacilos gram negativos, cóceas gram positivas y anaerobios. implicancias terapéuticas. Vol. 25. Núm. 3. Tema central: Infectología. páginas 432-444 (mayo 2014). DOI: 10.1016/S0716-8640(14)70060-4
15. Garrido D, Garrido S, Gutiérrez M, et al. (2017). Clinical characterization and antimicrobial resistance of Escherichia coli in pediatric patients with urinary tract infection at a third level hospital of Quito, Ecuador. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2017;74(4):265-271. DOI: 10.1016/j.bmhmx.2017.02.004.
16. García-Lozano T, López-Guerrero JA, Aznar-Oroval E. (2013). Colección de microorganismos («cepario») para uso en investigación biomédica. Experiencia de un hospital oncológico. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. el 1 de abril de 2013;31(4):270–1
17. Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de

la resistencia bacteriana. 51(1), 439–446.

18. Gonzales-Rodríguez, Arturo Octavio, Castillo Horna, Javier Ignacio, & Gonzales Escalante, Edgar. (2022). Identificación de enterobacterias multirresistentes a antibióticos en muestras de heces de lactantes residentes en Talara, Piura, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 39(4), 456-462. Epub 09 de diciembre de 2022. <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2022.394.11870>
19. Gómez BJP, Pazmiño JPR, Quinde GSG, et al. (2022). Multidrug- Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Patient with SARS-Cov-2 Pneumonia in an Intensive Care Unit in Guayaquil, Ecuador: A Case Report. *Am J Case Rep.* 2022;23:1-7. DOI: 10.12659/AJCR.936498.
20. Gutiérrez-Jiménez, Javier, Luna-Cazáres, Lorena Mercedes, Mendoza-Orozco, Mónica Ivonne, Díaz-Marina, Gabriela de Jesús, Burguete-Gutiérrez, Julio César, & Feliciano-Guzmán, José Manuel. (2015). Organización, mantenimiento y preservación de la Colección de Cultivos Bacterianos del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas (UNICACH), México. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 35(2), 95-102. Recuperado en 09 de febrero de 2024, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000200007&lng=es&tlng=es)
21. Hashemi A, Fallah F, Taherpour A, Goudarzi H, Erfanimanesh S, Taki E. Evaluación del patrón genético y determinación de los niveles de expresión del gen *oqxA* entre aislados clínicos de cepas de *Klebsiella Pneumoniae*. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2014; 24 (119): 48-61
22. Hernández-Gómez, Cristhian, Blanco, Víctor M., Motoa, Gabriel, Correa, Adriana, Vallejo, Marta y Villegas, María Virginia. (2014). Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. *Biomédica* , 34 (Supl. 1), 91-100. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1667>
23. Herrera Dutan, Edgar Vinicio, Andrade Campoverde, Diego, & Reinoso Rojas, Yessenia Valeria. (2021). Resistencia antimicrobiana en *Klebsiella pneumoniae*, Ecuador. *Vive Revista de Salud*, 4(12), 36-49. Epub 00 de diciembre de 2021. <https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i12.107>
24. Hospital General Docente de Calderón. Informe de rendición de cuentas. (2021). Disponible en: [www.hgdc.gob.ec/images/transparencia/2021/INFORME%20PRELIMINAR%20DE%20RENDICIÓN%20DE%20C UENTAS.pdf](http://www.hgdc.gob.ec/images/transparencia/2021/INFORME%20PRELIMINAR%20DE%20RENDICIÓN%20DE%20C UENTAS.pdf)
25. Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., María Gómez, A., Maldonado, L., & Jeannete Zurita, D. (2012). *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo *KPC-2*: primer reporte en el Ecuador. In *Rev Fac Cien Med (Quito)* (Vol. 37, Issue 2).
26. Jacoby, G. A., Walsh, K. E., Mills, D. M., Walker, V. J., Oh, H., Robicsek, A., & Hooper, D. C. (2006). *qnrB*, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(4), 1178–1182. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1178-1182.2006>
27. Jin Zhou, Yong-Min Lao, Zhi-Ping Ma, Zhong-Hua Cai, Genome sequence of *Enterobacter* sp. ST3, a quorum sensing bacterium associated with marine dinoflagellate. (2016). *Genomics Data*, Volume 7, 2016, Pages 195-199, ISSN 2213-5960, <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.01.008>.
28. Kim HB, Wang M, Park CH, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. (2009). *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Aug;53(8):3582-4. doi: 10.1128/AAC.01574-08. Epub 2009 Jun 15. PMID: 19528276; PMCID: PMC2715617.
29. Kitchel, B., Rasheed, JK, Endimiani, A., Hujer, AM, Anderson, KF, Bonomo, RA y Patel, JB (2010). Factores genéticos asociados con una elevada resistencia a los carbapenémicos en *Klebsiella pneumoniae* productora de *KPC*. *Agentes antimicrobianos y quimioterapia* , 54 (10), 4201-4207.
30. Lamoureaux, T. L., Frase, H., Antunes, N. T., & Vakulenko, S. B. (2012). Antibiotic resistance and substrate profiles of the class A carbapenemase *KPC-6*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(11), 6006–6008. <https://doi.org/10.1128/AAC.01338-12>

31. Li, X.-Z. y Nikaido, H. (2009). Resistencia a fármacos mediada por eflujo en bacterias. *Drogas*, 69(12), 1555-1623. doi:10.2165/11317030-000000000-00000
32. Li J, Zhang H, Ning J, Sajid A, Cheng G, Yuan Z, et al. (2019). La naturaleza y epidemiología de OqxAB, una bomba de eflujo de múltiples fármacos. *Control de infecciones resistentes a los antimicrobianos* 2019; 8:44.
33. Machuca, J. (2014). Interacción de mecanismos plasmídicos y cromosomas de resistencia a quinolonas en *E.coli* y su efecto en la resistencia, fitness y toxicidad celular.(2014). Tesis. Universidad de Sevilla España.
34. Marchetti, M., Errecalde, J., Mestorino, N. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multiresistencia (2011). *Analecta Vet* 2011;31 (2):40-53. Impresa ISSN 0365514-8.
35. Martín, G, & Carmona, O. (2003). Prevención de la resistencia bacteriana a antimicrobianos. aspectos farmacológicos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 23(1), 55-59. Recuperado en 13 de junio de 2023, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562003000100013&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562003000100013&lng=es&tlng=es).
36. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, GA (1998). Resistencia a quinolonas a partir de un plásmido transferible. *The Lancet* , 351 (9105), 797-799.
37. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2018). Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública. Reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos.
38. Moosavian, M., Khoshkholgh Sima, M., Ahmad Khosravi, N., & Abbasi Montazeri, E. (2021). Detection of OqxAB Efflux Pumps, a Multidrug-Resistant Agent in Bacterial Infection in Patients Referring to Teaching Hospitals in Ahvaz, Southwest of Iran. *International journal of microbiology*, 2021, 2145176. <https://doi.org/10.1155/2021/2145176>
39. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. (2013). *Lancet Infect Dis*. 2013 Sep;13(9):785-96. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70190-7. PMID: 23969216; PMCID: PMC4673667.
40. Mustafa Z, Salman M, Aldeyab M, Kow C y Hasan S. (2021). Antimicrobial consumption among hospitalized patients with COVID-19 in Pakistan. *SN Compr. Clin. Med.* 3, 1691–1695.
41. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. 2000;405
42. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2016). Plan de Acción Mundial sobre la resistencia a antimicrobianos. ISBN 978 92 4 350976 1. Subject headings are available from WHO institutional repository. Recuperado de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255204/9789243509761-spa.pdf>
43. Organización Mundial de la Salud. (2020). Semana mundial de concienciación sobre el uso de los antimicrobianos. 18 – 24 de noviembre del 2020, 1. <https://www.who.int/es/campaigns/world-antibiotic-awareness-week/2020>
44. Organización Panamericana de la Salud. (OPS) (2021). La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial. <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
45. Organización Panamericana de la Salud. (OPS) (2022). La resistencia a los antimicrobianos, acelerada por la pandemia de covid-19. Disponible en: [https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55928/OPSCDEAMRCOVID19220006\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/55928/OPSCDEAMRCOVID19220006_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
46. Oromí, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. Vol. 36. Núm. 10. páginas 367-370 (diciembre 2000). <https://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-resistencia-bacteriana-antibioticos-10022180>
47. Oxford Nanopore Technologies. (2008). Analysis solutions for nanopore sequencing data Disponible en: <https://nanoporetech.com/support/nanopore-sequencing-data-analysis>
48. Oxford Nanopore Technologies. (2023). Community - Chemistry Technical Document. [https://community.nanoporetech.com/docs/sequence/sequencing\\_software/chemistry-technical-document/v/cht\\_d\\_500\\_v1\\_revae\\_07jul2016](https://community.nanoporetech.com/docs/sequence/sequencing_software/chemistry-technical-document/v/cht_d_500_v1_revae_07jul2016).

49. Paciel, D. Seija, V. Prieto, J. Vignoli, R. Medina, J. Savio, E. Enterobacterias productoras de KPC. (2011). *Revista Tendencias en Medicina*.
50. Park, K.S. Kim, M.H. Park, T.S. Nam, Y.S. Lee H.J. Suh, J.T. (2012) “Prevalencia de los genes de resistencia a quinolonas mediados por plásmidos, aac (6') -Ib-cr, qepA y oqxAB en aislados clínicos de extendido- *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasa de espectro (ESBL) en Corea”, *Annals of Clinical Laboratory Science*, vol. 42, págs. 191-197, 2012.
51. Paterson, D. Mulazimoglu, L. Casellas, J. Ko, W. Goossens, H. Von Gottberg, A. Mohapatra, S. Trenholme, G. Epidemiología de la ciprofloxacina Resistencia y su relación con la producción de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido en aislados de *Klebsiella pneumoniae* que causan bacteriemia. (2000). *Enfermedades infecciosas clínicas*, volumen 30, número 3, marzo de 2000, páginas 473–478, <https://doi.org/10.1086/313719>
52. Prado-Vivar MB, Ortiz L, Reyes J, et al. (2019). Molecular typing of a large nosocomial outbreak of KPC-producing bacteria in the biggest tertiary-care hospital of Quito, Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:328-332. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.05.014
53. Peng, M., Lin, W., Zhou, A. et al. Alta diversidad genética y diferentes sistemas de secreción tipo VI en especies de *Enterobacter* revelados por análisis genómico comparativo. *BMC Microbiol* 24, 26 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12866-023-03164-6>
54. Pérez-Guerrero P, Galán-Sánchez F, Gutiérrez- Saborido D, Guerrero-Lozano I. (2014). Infecciones por enterobacterias. Volume 11. Issue 55. Pages 3276-3282. ISSN 0304-5412. [https://doi.org/10.1016/S0304-5412\(14\)70768-1](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70768-1).
55. Perozo-Mena, Armindo, Castellanos-González, Maribel, Ling, Eliana, Gómez, Liliana, Ginestre, Messaria, & Rincón, Gresleida. (2016). Presencia de carbapenemasa tipo KCP en aislados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes de unidades de cuidados intensivos. *Kasmera*, 44(1), 44-52. Recuperado en 26 de marzo de 2024, de [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0075-52222016000100007&lng=es&tlng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222016000100007&lng=es&tlng=es).
56. Rodríguez-Martínez, JM. Mecanismos de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos. (2005). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 23, Issue 1, páginas 25-31. ISSN 0213-005X. <https://doi.org/10.1157/13070406>.
57. Rodríguez-Martínez, P. Díaz de Alba, A. Briaies, J. Machuca, M. Lossa, F. Fernández-Cuenca, J. Rodríguez Baño, L. Martínez-Martínez, Á. Pascual, Contribución de las bombas de eflujo OqxAB a la resistencia a las quinolonas en *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido. (2013). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, volumen 68, número 1, enero de 2013, páginas 68–73, <https://doi.org/10.1093/jac/dks377>
58. Rodríguez, Edna Catering, Saavedra, Sandra Yamile, Leal, Aura Lucía, Álvarez, Carlos, Olarte, Narda, Valderrama, Alberto, Cuervo, Sonia Isabel, & Escobar, Javier. (2014). Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un período de tres años. *Biomédica*, 34 (Supl. 1), 224-231. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i0.1696>
59. Romero-Alvarez D, Reyes J, Quezada V, et al. (2017). First case of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Ecuador: An update for South America. *Int J Infect Dis*. 2017; 65:119-121. DOI: 10.1016/j.ijid.2017.10.012
60. Salah, F.D, Soubeiga, S.T, Ouattara, A.K et al. Distribución del gen de resistencia a las quinolonas (qnr) en *Escherichia coli* y *Klebsiella spp* productoras de BLEE. en Lomé, Togo. *Control de infecciones con resistencia a antimicrobianos* 8, 104 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0552-0>
61. Satán, C., Satyanarayana, S., Shringarpure, K., Mendoza-Ticona, A., Palanivel, C., Jaramillo, K., Villavicencio, F., Davtyan, H., & Esparza, G. (2023). Epidemiology of antimicrobial resistance in bacteria isolated from inpatient and outpatient samples, Ecuador, 2018. *Revista panamericana de salud pública = Pan American journal of public health*, 47, e14. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2023.14>

62. Soria-Segarra C, Soria-Segarra C, Catagua-González A, Gutiérrez-Fernández J. Carbapenemase producing Enterobacteriaceae in intensive care units in Ecuador: Results from a multicenter study. *J Infect Public Health*. (2019) Jan;13(1):80-88. doi: 10.1016/j.jiph.2019.06.013. Epub 2019 Jun 29. PMID: 31262670.
63. Tamayo, V. Guevara, A. Cadena, S. Paz, E. Ruiz, V. Zambrano, A. (2022). Genes involucrados con resistencia antimicrobiana en hospitales del Ecuador. *Periodicidad semestral: flujo continuo* Vol. 21 (2) Jul-Dic 2022 revista.hcam@iess.gob.ec DOI: <https://doi.org/10.36015/cambios.v21.n2.2022.863>
64. Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638-5642.
65. Vera-Leiva, Alejandra, Barría-Loaiza, Carla, Carrasco-Anabalón, Sergio, Lima, Celia, Aguayo-Reyes, Alejandro, Domínguez, Mariana, Bello-Toledo, Helia, & González-Rocha, Gerardo. (2017). KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. *Revista chilena de infectología*, 34(5), 476-484. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000500476>
66. Vieira, DC, Lima, WG & de Paiva, MC Resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (PMQR) entre enterobacterias en América Latina: una revisión sistemática. (2020). *Mol Biol Rep*. 47, 1471-1483 (2020). <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05220-9>
67. Villacís JE, Reyes JA, Castelán-Sánchez HG, et al. (2020). OXA-48 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 307 in Ecuador. *Microorganisms*. 2020;8(3). DOI: 10.3390/microorganisms8030435
68. Wang, L., Shen, W., & Cai, J. (2023). Mobilization of the blaKPC-14 gene among heterogenous plasmids in extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology*, 14, 1261261. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1261261>
69. Wong MHY, Chan EWC, Chen S. Evolución y difusión de bombas de eflujo similares a OqxAB, un determinante emergente de resistencia a las quinolonas entre miembros de Enterobacteriaceae. (2015). *Agentes antimicrobianos quimioterápicos*. 2015;59:3290–7.
70. Yaneth, G. Morales, G. Armenta, C. (2017). Perfil de resistencia bacteriana en hospitales y clínicas en el departamento del Cesar (Colombia). *Medicina & Laboratorio* 2017; 23:387-398.
71. Yauri, M. Rodríguez, M. Alcocer, I. Diseminación clonal de KPC-2 en *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos. *Infectio* 2020; 24(1):42-49.
72. Zurita J, Alcocer I, Ortega-Paredes D, Barba P, Yauri F, Iñiguez D, et al. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. (2013). *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(4):229-30.
73. Zurita J, Solís MB, Ortega-Paredes D, Barba P, Paz y Miño A, Sevillano G. (2019). High prevalence of B2-ST131 clonal group among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from bloodstream infections in Quito, Ecuador. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19:216- 221. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.04.019

## ANEXOS

## Anexo I

**Tabla A1:** Aislados bacterianos de la familia Enterobacteriaceae pertenecientes al cepario del Hospital General Docente de Calderón, año 2021.

<b>Año</b>	<b>Código investigación</b>	<b>Identificación fenotípica bacteriana</b>
2021	2021-KPN-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-14	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KOX-17	<i>Klebsiella oxytoca</i>
2021	2021-KPN-18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KOX-22	<i>Klebsiella oxytoca</i>
2021	2021-KPN-2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KPN-7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
	2021-KOX-12	<i>Klebsiella oxytoca</i>
	2021-KPN-13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2021	2021-ECL-1	<i>Enterobacter cloacae</i>
	2021-ECL-7	<i>Enterobacter cloacae</i>
	2021-ECL-11	<i>Enterobacter cloacae</i>
	2021-ECL-12	<i>Enterobacter cloacae</i>
	2021-ECL-14	<i>Enterobacter cloacae</i>





