

## FACULTAD DE CIENCIAS SALUD

# Trabajo de fin de Carrera titulado:

Secuenciación con nanoporos y análisis bioinformático para la vigilancia de genes de resistencia a antibióticos en Quito-Ecuador, Trabajo Final de Máster.

# **Realizado por:**

Juan David Bohórquez Erazo

# **Director del proyecto:**

Dr. José Rubén Ramírez Iglesias PhD.

# Como requisito para la obtención del título de:

# MAGISTER EN BIOMEDICINA

QUITO, 10 de julio del 2024

## **DECLARACIÓN JURAMENTADA**

Yo, Juan David Bohórquez Erazo, ecuatoriano, con Cédula de ciudadanía Nº 1721295226, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

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



Juan David Bohórquez Erazo

C.I.: 1721295226

## **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.

-----

Dr. José Rubén Ramírez Iglesias PhD. **3050666993** 

## LOS PROFESORES INFORMANTES:

Alexander Maldonado

Jaime Acosta

Después de revisar el trabajo presentado lo han calificado como apto para su defensa

oral ante el tribunal examinador.

Alexander Maldonado

Jaime Acosta

4 of 30

Quito, 10 de julio de 2024

# DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

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



Juan David Bohórquez Erazo

C.I.: 1721295226



Fac Cs Salud, UISEK

## Artículo de tesis.

# Secuenciación con nanoporos y análisis bioinformático para la vigilancia de genes de resistencia a antibióticos en Quito-Ecuador, Trabajo Final de Máster.

Juan David Bohórquez<sup>1</sup>\*, José Rubén Ramírez (Tutor)<sup>2</sup>, Gabriela Sevillano (Tutor)<sup>2</sup> y Andres Herrera (Tutor)<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> Afiliación 2; jose.ramirez@uisek.edu.ec. Afiliación 2; gabriela.sevillano@uisek.edu.ec Afiliación 2; manuel.herrera@uisek.edu.ee

\* Autor de correspondencia: juan.bohorquez@uisek.edu.ec. Tel.: +593995200469

Resumen: La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública global que amenaza la seguridad de los pacientes y la efectividad de los tratamientos médicos. En Ecuador, la prevalencia de bacterias Gram-negativas resistentes a antibióticos, como Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae es de alto interés, sobre todo porque se han reportado aumentos en los casos clínicos, animales e incluso ambientales. Las bacterias pueden albergar plásmidos con genes de resistencia, lo que limita las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de las infecciones. Esta investigación presenta un estudio centrado en la secuenciación por nanoporos y el análisis bioinformático de plásmidos portadores de genes de resistencia a antibióticos en bacterias de Ecuador. El objetivo del presente estudio se centró en determinar la diversidad de genes de resistencia presentes en plásmidos donados de diferentes muestras clínicas. Se analizaron 2071 lecturas secuenciadas con tecnología ONT, encontrando 228 genes de resistencia en 277 secuencias plasmídicas recuperadas, de los cuales se asocia a 7 plásmidos que cumplen con las características señaladas en esta investigación siendo ColRNAI, IncN, IncR y Col8282 los plásmidos de interés. De los genes de resistencia encontrados destacan resistencias a carbapenémicos, quinolonas, cloranfenicol, sulfonamidas y aminoglucósidos. Los resultados de este estudio aportan información valiosa sobre la resistencia a los antibióticos en Ecuador, lo que puede contribuir al desarrollo de estrategias de prevención y control más eficaces, ya que brindan una clara prospección para ser utilizada como un tamizaje epidemiológico. Los hallazgos subrayan la importancia de utilizar herramientas avanzadas de secuenciación y bioinformática para desentrañar las complejidades de los mecanismos de resistencia en las poblaciones bacterianas, contribuyendo en última instancia a la comprensión y gestión global de la resistencia a los antibióticos.

*Palabras clave*: 1. Resistencia a los antibióticos; 2. Genómica; 3. Secuenciación por nanoporos; 4. Análisis bioinformático; 5. Bacterias.

Abstract: Antibiotic resistance is a global public health problem that threatens patient safety and the effectiveness of medical treatments. In Ecuador, the prevalence of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria such as Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae is of high interest, especially because increases in clinical, animal and even environmental cases have been reported. Bacteria can harbor plasmids with resistance genes, which limits the therapeutic options available for the treatment of infections. This research presents a study focused on nanopore sequencing and bioinformatic analysis of plasmids carrying antibiotic resistance genes in bacteria from Ecuador. The objective of the present study focused on determining the diversity of resistance genes present in plasmids donated from different clinical samples. A total of 2071 reads sequenced with ONT technology were analyzed, finding 228 resistance genes in 277 plasmid sequences recovered, of which 7 plasmids were associated with plasmids that meet the characteristics indicated in this research, being ColRNAI, IncN, IncR and Col8282 the plasmids of interest. Of the resistance genes found, resistance to carbapenemics, quinolones, chloramphenicol, sulfonamides and aminoglycosides stand out. The results of this study provide valuable information on antibiotic resistance in Ecuador, which can contribute to the development of more effective prevention and control strategies, since they provide a clear prospect to be used as an epidemiological screening. The findings underscore the importance of using advanced sequencing and bioinformatics tools to unravel the complexities of resistance mechanisms in bacterial populations, ultimately contributing to the global understanding and management of antibiotic resistance.

Keywords: 1. antibiotic resistance; 2. genomics; 3. nanopore sequencing; 4. bioinformatics analysis; 5. bacteria.

#### 1. Introducción.

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública global que amenaza la seguridad de los pacientes y la efectividad de los tratamientos médicos. En Ecuador, la prevalencia de bacterias Gram-negativas resistentes a antibióticos, como Escherichia coli y Klebsiella pneumoniae, es de alto interés, sobre todo por que se han reportado aumentos en los casos de unidades de cuidados intensivos (Tusa-Torres A. et al 2021). Es importante destacar que estas bacterias pueden albergar plásmidos con genes de resistencia, lo que limita las opciones terapéuticas disponibles para el tratamiento de las infecciones (Gaus & Larco, 2021). Los plásmidos desempeñan un papel crucial y comprobado en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos, permitiendo la propagación de estas características entre diferentes especies bacterianas (Soliz Poveda et al., 2022). A pesar de la relación de los plásmidos en la resistencia a los antibióticos, y su relevancia clínica, aún hay vacíos de conocimiento en cuanto a su diversidad y distribución específica en bacterias de Ecuador. La arquitectura de los plásmidos circulantes en Ecuador no se ha estudiado extensamente, lo que conduce a una necesidad en la comprensión genómica de estos elementos en la región. Si bien existe una gran cantidad de investigaciones sobre plásmidos en varias especies bacterianas, incluyendo Mycobacterium tuberculosis, Vibrio cholerae y otras (Villacís et al., 2020), hay una escasez de estudios detallados centrados específicamente en la arquitectura genómica de los plásmidos circulantes o a su vez una prospección macro en el entorno nacional. La arquitectura genómica de los plásmidos puede variar significativamente entre aislados bacterianos, con diferencias en tamaño, número y genes de resistencia (Moreira, 2000). Además, los plásmidos desempeñan un papel crucial en la diseminación de genes de resistencia a múltiples fármacos, por lo que es esencial comprender su composición genómica y su dinámica en el contexto ecuatoriano. La epidemiología genómica y la secuenciación se han destacado como herramientas valiosas para comprender la variabilidad de las cepas resistentes circulantes en Ecuador y el mundo. Estos métodos tienen el potencial de clarificar o identificar los mecanismos moleculares asociados a la resistencia a diversos fármacos. Además, la aplicación de la secuenciación del genoma completo ha demostrado ser eficaz para resolver la transferencia horizontal de plásmidos a una escala sin precedentes, lo que demuestra el valor añadido de la secuenciación rutinaria del genoma completo para comprender la dinámica de los plásmidos. Aunque las investigaciones existentes han aportado valiosos conocimientos sobre la dinámica de los plásmidos y la arquitectura genómica de varias especies bacterianas, se necesitan estudios específicos centrados en el contexto de Ecuador. Dichos estudios podrían aprovechar la secuenciación genómica para caracterizar el paisaje plasmídico, identificar determinantes de resistencia y rastrear la propagación de plásmidos entre las bacterias asociadas a la atención sanitaria en la región. Mediante el empleo de una perspectiva genómica, los investigadores pueden profundizar en la estructura, replicación, contenido genético y función biológica de los plásmidos en Ecuador, contribuyendo a una comprensión global de la arquitectura de los plásmidos y su presencia en la región.

Esta investigación tiene como objetivo determinar la diversidad de genes de resistencia presentes en plásmidos bacterianos de muestras clínicas en Ecuador. Para ello, se utilizaron técnicas de secuenciación por nanoporos y herramientas bioinformáticas avanzadas. Los resultados de esta investigación aportan información valiosa para comprender mejor la dinámica de la resistencia a los antibióticos en Ecuador. La identificación de los tipos de plásmidos y genes de resistencia presentes en bacterias de diferentes ambientes permitirá el diseño de estrategias de prevención y control más precisas y eficientes. Esta información será de gran utilidad para los profesionales de la salud, los responsables de la toma de decisiones en el ámbito de la salud pública y las instituciones que trabajan en la lucha contra la resistencia a los antibióticos.

#### 2. Materiales y métodos.

El diseño de la investigación está caracterizado por ser no aleatorizado, unicéntrico y prospectivo. Se efectuó un análisis de secuenciación de plásmidos mediante el Kit de Secuenciación Rápida por Código de Barras de Nanopore (SQK-RBK004). Se emplearon muestras de aislados bacterianos del Biobanco de los laboratorios Zurita y Zurita, se incluyeron en este estudio muestras de plásmidos que cumplían los requisitos de cantidad y calidad, basado en las lecturas de Qubit 2. Se excluyeron del estudio las muestras de plásmidos muy fragmentados, con ARN o contaminantes químicos, o que no cumplían los requisitos ya mencionados. Se seleccionó un flujo de trabajo de código de barras que proporcionó un informe fácil de interpretar con los resultados. Se realizó un análisis bioinformático para identificar los tipos de plásmidos y genes de resistencia presentes en las muestras.

#### 2.1 Preparación de librerías.

El Kit de Secuenciación por Código de Barras Rápido de Nanopore (SQK-RBK004) fue utilizado por sus ventajas, incluyendo la reducción de costos por muestra, la multiplexación sin PCR (que preserva información adicional como modificaciones de bases) y un tiempo de preparación corto. El proceso de preparación de la librería consistió primeramente en la extracción de ADN plasmídico donde se cultivó las cepas bacterianas que contenían los plásmidos de interés, se cosecharon las células y se realizó la lisis celular para liberar el ADN plasmídico, el cual fue purificado por columna con un kit especializado, los plásmidos fueron facilitados por Laboratorios Zurita & Zurita bajo el convenio de colaboración y de trabajo que mantienen ambas instituciones. Una vez se extrajo el ADN se procedió con la determinación y ajuste de la concentración de ADN donde se cuantificó la concentración de ADN plasmídico por fluorómetro (Qubit 2.0) y se diluyó hasta alcanzar la concentración recomendada por el protocolo que corresponde a 400 ng. Se procedió con el agrupamiento para los códigos de barras, las muestras de ADN plasmídico se agruparon

según los códigos de barras que se utilizarían, considerando las especies y los genes que podrían ser encontrados, como se muestra en **Tabla 1**. Se agregó la mezcla de fragmentación RB a cada grupo de muestras, la cual contiene enzimas que fragmentan el ADN plasmídico y unen simultáneamente un par de códigos de barras a cada fragmento. La mezcla se incubó según las condiciones del protocolo. Se agregaron adaptadores de secuenciación a los extremos de los fragmentos de ADN marcados con códigos de barras, los cuales son necesarios para la unión del ADN a la superficie de la celda de flujo Nanopore. La mezcla se incubó según las condiciones del protocolo. Se purificó la librería de ADN para eliminar los componentes del Kit SQK-RBK004 que no son necesarios para la secuenciación, utilizando un método de columna. Por último se procedió a cebar la celda de flujo R9.4.1 (FLO-MIN106) con enzimas específicas para la secuenciación Nanopore y se cargó la librería de ADN purificada en la celda de flujo cebada. Finalmente, se inició la secuenciación de la librería en el secuenciador Nanopore. La librería de ADN se preparó cuidadosamente siguiendo el protocolo del Kit SQK-RBK004, asegurando la calidad y la integridad de la librería para obtener resultados de secuenciación confiables.



Figura 1. Esquema de flujo de trabajo extracción ADN, creación de librerías y secuenciación. Ilustración creada con BioRender.com

Identificación de especie	Barcode	Identificación de especie	Barcode
Acinetobacter baumannii	1	Pseudomonas aeruginosa	7
Acinetobacter baumannii	1	Klebsiella pneumoniae	7
Klebsiella pneumoniae	1	Escherichia coli	7
Pseudomonas aeruginosa	2	Serratia marcescens	8
Pseudomonas aeruginosa	2	Klebsiella oxytoca	8
Pseudomonas fluorescens	2	Klebsiella oxytoca	8
Acinetobacter baumannii	3	Enterobacter cloacae	9
Acinetobacter baumannii	3	Enterobacter cloacae	9
Acinetobacter baumannii	3	Enterobacter cloacae	9
Klebsiella pneumoniae	4	Klebsiella aerogenes	10
Klebsiella pneumoniae	4	Klebsiella aerogenes	10
Klebsiella pneumoniae	4	Enterobacter cloacae	10
Klebsiella pneumoniae	5	Klebsiella pneumoniae	11
Klebsiella pneumoniae	5	Klebsiella pneumoniae	11
Klebsiella pneumoniae	5	Klebsiella pneumoniae	11
Klebsiella pneumoniae	6	Klebsiella pneumoniae	12
Klebsiella pneumoniae	6	Pseudonomas otitidis	12
Klebsiella pneumoniae	6	Klebsiella pneumoniae	12

 Tabla 1. Especies agrupadas por barcode, 12 agrupaciones con kit SQK-RBK004

#### 2.2 Secuenciación.

Se realizó la secuenciación en un secuenciador MinION de Oxford Nanopore Technologies durante 48 horas para aprovechar al máximo todos los poros en la celda. Se ejecutó el protocolo de secuenciación utilizando el software MinKNOW, configurando un llamado de base de alta precisión, se asignó un mínimo de longitud de 200 bp, excluyendo la opción de modificar las lecturas. Se recopiló los datos "crudos" del dispositivo en *fast 5* y el sistema los convirtió en lecturas con llamada de base generando archivos *fastQ*. Posteriormente, se seleccionó un flujo de trabajo para los códigos de barras con el software EPI2ME.

#### 2.3 Análisis posterior a la secuenciación.

Se empleó la plataforma EPI2ME, un servicio de análisis de datos en la nube desarrollado por Metrichor Ltd. (filial de Oxford Nanopore), y la plataforma web Galaxy (servidor público en usegalaxy.org) para analizar los datos (AfgCreesan et al., 2016). Ambas plataformas ofrecen diversos flujos de trabajo de análisis, como identificación metagenómica, código de barras, alineación y llamada de variantes estructurales. El análisis no requirió equipos adicionales ni potencia de cálculo, y proporcionó un informe de fácil interpretación con los resultados. Se analizaron tutoriales y flujos de trabajo de EPI2ME Labs para un análisis de datos más profundo, disponibles en la sección EPI2ME Labs de la Comunidad. Para determinar las herramientas de análisis de investigación, se revisó el repositorio GitHub, con instrucciones para usuarios avanzados sobre la instalación y ejecución de software.

#### 2.4 Pipeline

Luego del análisis y la delimitación, se seleccionaron dos pipelines para la investigación. En EPI2ME se ejecutó el flujo de trabajo, Fastq Antimicrobial Resistance ID: 442127. En Galaxy Web se ejecutó ensamblaje con Minimap 2 (Li, 2018), Miniasm (Li et al., 2015), Racon (Vaser et al., 2017) y Unicycler (Wick et al., 2017).



Figura 2. Esquema de flujo de trabajo ejecutado en Galaxy (izquierda), flujo de trabajo EPI2ME (derecha)

#### 2.5 Análisis de datos.

El análisis en Galaxy empezó con Nanoplot (Coster et al. 2018) para medir la calidad de las muestras y secuencias obtenidas. Los plásmidos ensamblados se analizaron con Bandage (Wick et al. 2015) ya que genera una representación inicial del plásmido, se empleó PlasFlow (Krawczyk et al. 2018) para diferenciar secuencias y determinar cuántas realmente corresponden o se relacionan a material extra cromosómico y para finalizar se empleó Starmr (GitHub) con lo que se determinó genes de resistencia específicos por barcode. Para ilustrar lo obtenido, se procedió a caracterizar y anotar los plásmidos usando varias plataformas como Benchling (Biology Software, 2024) y Circos. Con relación al análisis en EPI2ME, no fue necesario usar más software para el análisis de datos, ya que el sistema ejecuta todos los pasos predeterminados en el flujo de trabajo y genera un informe completo para el análisis.

#### 3. Resultados

Como se ha manifestado previamente, los resultados obtenidos se engloban en dos direcciones, el análisis empleado con las secuencias en el flujo de trabajo de Starmr y su comparación con Fastq AMR. De esa manera, podemos asociar los resultados en un solo marco interpretativo.

#### **3.1 Secuencias y ensamblaje:**

## 3.1.1 FastQC.

Se realizó el control de calidad (QC) de las secuencias, El QC destaca una longitud promedio de 1320 pb en un total de 89,614 lecturas. La calidad de la secuencia marca un promedio de 11.6 en el Phred Score considerando que el estudio emplea tecnología ONT (químicas V9). Y un porcentaje de bases N de 118.4 Mbases. (Figura 3) Cabe recalcar que la plataforma EPI2ME generó un solo QC de los 12 barcodes.



Figura 3. FastQC de los 12 barcodes ejecutados con EPI2ME información completa en Anexo 1A.

#### 3.1.2 NanoPlot.

Se analizaron las secuencias de ADN Trimmadas con Porechop Wick, R. (2017), el análisis se efectuó con NanoPlot, generando gráficos para evaluar su tamaño y características. La mayoría de las secuencias tienen una longitud entre 1851,14 pb (figura 4) en un total de 63,634 lecturas.





En este experimento utilizamos secuenciación Nanopore; esto significa que los resultados de secuenciación son lecturas largas, y existen solapamientos significativos entre esas lecturas. Para encontrar este solapamiento, se utiliza Minimap2 en Galaxy y WIMP en EPI2ME (cabe recalcar que WIMP es el nombre para todo el paso de ensamblaje, alineamiento y taxonomía en EPI2ME). Este paso mapea las lecturas de la secuencia Nanopore contra sí misma para encontrar solapamientos. El resultado es un archivo PAF. Una vez mapeadas las muestras, se ensamblaron usando Miniasm (Li et al. 2015) en Galaxy. Se realiza con las lecturas originales un remapeo, utilizando el ensamblaje Miniasm como referencia, con el fin de mejorar la llamada de base de consenso por posición. Esto es utilizado por la herramienta Racon (Vaser et al. 2017) para la construcción del consenso. Esto se hace porque algunas lecturas que podrían no haberse mapeado bien durante la llamada de consenso, ahora se mapean en un scaffold.

Para hacerse una idea de lo bien que se ensamblaron nuestros datos y determinar si los contigs son ADN cromosómico o plásmido (los primeros son secuencias lineales, mientras que los plásmidos son moléculas circulares), la herramienta

Bandage (Wick et al. 2015) puede ofrecer una visión clara del ensamblaje, de esta manera se comprende mejor o se puede mejorar los ensamblajes.

#### 3.1.3 Bandage.

Lo ideal sería ver ensamblajes circulares, lo que indicaría que se ha resuelto la secuencia completa del plásmido. Este no es el caso de la mayoría de los códigos de barra (Figura 4), por lo que se decidió mejorar el ensamblaje antes de continuar con los demás pasos como se puede apreciar en la figura 2.



Figura 4. Bandages completos de los 12 barcodes, cada número representa al conjunto de plásmidos encontrados por barcode. Figura elaborada con software Inkscape.

## **3.1.4 PlasFlow**

Para determinar automáticamente si los contigs representan ADN cromosómico o plasmídico, se empleó la herramienta PlasFlow (Krawczyk et al. 2018), también en el caso de que no se haya ensamblado una secuencia plasmídica circular completa. Además, asigna los contigs a una clase bacteriana. En total, con PlasFlow se encontraron 277 secuencias plasmídicas, ninguna secuencia cromosómica, y 11 secuencias sin clasificar su distribución por barcodes se ha representado en la **figura 5**. Siendo el barcode 8 quien presenta el mayor número de plásmidos (158).



Figura 5. Distribución de plásmidos en los diferentes Barcodes. Reporte completo en Anexo 3.

#### 3.2 Genes de resistencia obtenidos:

Para determinar si los contigs contienen genes de resistencia antimicrobiana (AMR) se empleó Staramr. Esta herramienta es completa, ya que busca contigs del genoma bacteriano en las bases de datos ResFinder (Zankari et al. 2012), PointFinder (Zankari et al. 2017) y PlasmidFinder (Carattoli et al. 2014) y compila un informe resumido de los genes de resistencia antimicrobiana y los plásmidos detectados. Para el análisis en EPI2ME, el informe AMR utiliza datos de la base de datos CARD; *Comprehensive Antibiotic Resistance Database*, (Jia et al. 2016) para facilitar la elaboración de informes en tiempo real. Es importante destacar que en nuestro país y varias partes del mundo tienen mayor peso los datos obtenidos con ResFinder.

#### 3.2.1 Genes de resistencia presentes en plásmidos Galaxy

Empleando Staram se alinearon 92 contigs, 51 de los cuales se encontraban en el barcode 6 y corresponden al gen *QnrB5*. Los genes aquí encontrados son: *blaOXA-23*, *blaOXA-72*, *aac(6')-Ib*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrB19*, *qnrB5*, *ARR-3*, *blaKPC-2*, *blaOXA-1*, *blaTEM-1C*, *catB4*, *sul1* y *aph(3')-Ia*.

Barcode	Genotipo	Fenotipo
01	None	Sensitive
03	blaOXA-23, blaOXA-72, blaOXA-72	ampicillin, meropenem
04	None	Sensitive
05	aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, qnrB19	amikacin, gentamicin, kanamycin, ciprofloxacin I/R
06	aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, qnrB5	amikacin, gentamicin, kanamycin, ciprofloxacin I/R
	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, ARR-3, blaKPC-2, blaOXA-1, blaTEM-1C, catB4,	gentamicin, ciprofloxacin I/R, rifampicin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftriaxone, meropenem,
07	sull	sulfisoxazole
08	None	Sensitive
09	None	Sensitive
		kanamycin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin,
10	aph(3')-Ia, blaKPC-2, qnrB19, qnrB19	ceftriaxone, meropenem, ciprofloxacin I/R
11	None	Sensitive
12	None	Sensitive

 Tabla 3. Genes de resistencia encontrados con Staram, al final se unen los genes de los dos métodos en una sola tabla detallada por barcode Anexo 4.

#### 3.2.2 Genes de resistencia presentes en plásmidos EPI2ME.

De las 68,410 lecturas se alineó, 2071 de ellas con un promedio de relación de 90,5 % encontrando 228 CARD GENES en todos los barcodes. En donde destaca el Gen *QnrB5*, *OXA-72* y *QnrB19* con más de 100 alineaciones cada uno, de hecho, *QnrB5* con 733 alineaciones en CARD. Cabe recalcar que las alineaciones se interpretan en esta parte a nivel general de todos los barcodes, para conocer específicamente en que barcode se encuentra cada gen referirse al Anexo 4. Así como también se explica en los pasos a continuación.

Barcode	Genotipo	Predicción del fenotipo
1	acrA, blaOXA-72	fluoroquinolone, beta-lactam
2	blaOXA-50, APH(3')-IIb, ANT(2'')-Ia, FosA, aadA6, catB7	carbapenem, gentamicin, tobramycin, aminoglycoside, fosfomycin, chloramphenicol
3	blaOXA-72, blaOXA-160, blaOXA-26, blaOXA-24, blaOXA- 169, blaOXA-23, blaOXA-139, blaOXA-25, blaOXA-207, msrE	beta-lactamase, macrolides, lincosamides, phenicols
4	blaTEM-4, sul2, APH(3')-Ia, oqxB, sul1, AAC(3)-IIa, aadA2, CTX-M-82, mefB, CTX-M-79	penicillins, cephalosporins, sulfonamide, fluoroquinolone, aminoglycoside, cephalosporins, macrolides, lincosamides, phenicols

5	QnrB5, QnrB19, blaTEM-4, QnrB10, sul2, QnrB40, SHV-95, dfrA14, APH(4)-Ia, SHV-13	fluoroquinolones, Beta-lactams, Sulfonamides, Trimethoprim, Aminoglycosides
6	QnrB5, QnrB19, blaTEM-4, blaKPC-2, AAC(6')-Ib, sul2, blaOXA-9, rmtG, oqxB, vgaC	fluoroquinolones, carbapenems, beta-lactams, sulfonamides, aminoglycosides, glycopeptides
7	blaOXA-1, blaOXA-2 ,sul1, blaKPC-2, mphA, blaTEM-4, dfrA5, sul2, aadA16, FosA	carbapenems, beta-lactams, sulfonamides, trimethoprim, macrolides, aminoglycosides, fosfomycin
8	blaOXA-2, blaOXA-1, blaTEM-4, sul1, aadA16, CTX-M-96, mphA, QnrB18, APH(3')-Ia, blaOXA-9	carbapenems, beta-lactams, sulfonamides, macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones
9	QnrB5, QnrVC4, sul1, QnrVC5, mphA, QnrB19	fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides
10	QnrB5, QnrB19, APH(3')-Ia, msrE, armA, blaKPC-2, vgaC, aadA16, sul1, blaTEM-4	fluoroquinolones, carbapenems, aminoglycosides, glycopeptides, sulfonamides, macrolides, lincosamides, phenicols, beta-lactams
11	blaOXA-1, blaTEM-4, dfrA14, CTX-M-15, sul2, QnrB5, APH(3")-Ib, blaKPC-2, vgaC, sul1	fluoroquinolones, carbapenems, beta-lactams, sulfonamides, trimethoprim, aminoglycosides, glycopeptides
12	blaOXA-181, blaOXA-2, oqxB, sul1, AAC(3)-IIc	fluoroquinolones, sulfonamides, beta-lactams

Tabla 4. Genes de resistencia, encontrados con EPI2ME, se anexa tabla completa Anexo 4.

## 3.2.3 Genes de resistencia

Con el objetivo de brindar una perspectiva consensuada de los resultados obtenidos a partir de ambos métodos bioinformáticos de análisis de las secuencias identificadas por nanoporos, se ha elaborado la **Tabla 5**. Esta tabla muestra por cada código de barras utilizado, los siguientes resultados; con gris genes que solo fueron detectados por la plataforma EPI2ME como se observa en el barcode 1, 2, 4, 8, 9, 11 y 12. En los casos de las celdas blancas en la tabla podemos observar genes encontrados con los dos pipelines, separados por "//" los primeros genes encontrados con galaxy seguidos de los genes encontrados con EPI2ME.

Los genotipos encontrados destacan genes que codifican enzimas y proteínas relacionadas con la resistencia a antibióticos y la virulencia. Se pueden observar genes que confieren resistencia a diversos antibióticos, como betalactámicos (*bla*OXA, *bla*KPC, *bla*TEM), aminoglucósidos (*aadA, armA*), quinolonas (*qnrB*), fosfomicina (*fosA*), también se encuentran genes que codifican bombas de expulsión (*TEM-4, CTX-M*) y factores de virulencia (*mgrB, msrE*). Entre las predicciones de fenotipos se encuentran resistencia a múltiples clases de antibióticos, como fluoroquinolonas, carbapenémicos, betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, lincosamidas, sulfamidas, entre otros. Además, se predicen características de virulencia, como la producción de sideróforos y glicopéptidos.

Barcode	Genotipo	Predicción del fenotipo
barcode01	acrA, blaOXA-72	fluoroquinolone, beta-lactam, spectinomycin
barcode02	blaOXA-50, APH(3')-IIb, ANT(2'')-Ia, FosA, aadA6, catB7	carbapenem, gentamicin, tobramycin, aminoglycoside, fosfomycin, chloramphenicol
barcode03	blaOXA-23, blaOXA-72, blaOXA-72 // blaOXA-72, blaOXA-160, blaOXA-26, blaOXA-24, blaOXA-169, blaOXA-23, blaOXA-139, blaOXA-25, blaOXA-207, msrE	ampicillin, meropenem // beta-lactamase, macrolides, lincosamides, phenicols
barcode04	blaTEM-4, sul2, APH(3')-Ia, oqxB, sul1, AAC(3)-IIa, aadA2, CTX-M-82, mefB, CTX-M-79	penicillins, cephalosporins, sulfonamide, fluoroquinolone, aminoglycoside, cephalosporins, macrolides, lincosamides, phenicols
barcode05	aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, qnrB19 // QnrB5, QnrB19, blaTEM-4, QnrB10, sul2, QnrB40, SHV-95, dfrA14, APH(4)-Ia, SHV-13	amikacin, gentamicin, kanamycin, ciprofloxacin I/R // fluoroquinolones, Beta-lactams, Sulfonamides, Trimethoprim, Aminoglycosides

	aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, qnrB5 // QnrB5, QnrB19,	amikacin, gentamicin, kanamycin, ciprofloxacin I/R //
	blaTEM-4, blaKPC-2, AAC(6')-Ib, sul2, OXA-9, rmtG,	fluoroquinolones, carbapenems, beta-lactams,
barcode06	oqxB, vgaC	sulfonamides, aminoglycosides, glycopeptides
barcode07	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, ARR-3, blaKPC-2, blaOXA- 1, blaTEM-1C, catB4, sul1 // blaOXA-1, blaOXA-2 ,sul1, blaKPC-2, blamphA, blaTEM-4, dfrA5, sul2, aadA16, FosA	gentamicin, ciprofloxacin I/R, rifampicin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftriaxone, meropenem, unknown[catB4_1_AF322577], sulfisoxazole // carbapenems, beta-lactams, sulfonamides, trimethoprim, macrolides, aminoglycosides, fosfomycin
barcode08	blaOXA-2, blaOXA-1, blaTEM-4, sul1, aadA16, CTX-M- 96, mphA, QnrB18, APH(3')-Ia, blaOXA-9	carbapenems, beta-lactams, sulfonamides, macrolides, aminoglycosides, fluoroquinolones
barcode09	QnrB5, QnrVC4, sul1, QnrVC5, mphA, QnrB19	fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides
barcode09 barcode10	QnrB5, QnrVC4, sul1, QnrVC5, mphA, QnrB19 aph(3')-Ia, blaKPC-2, qnrB19, qnrB19 // QnrB5, QnrB19, APH(3')-Ia, msrE, armA, blaKPC-2, vgaC, aadA16, sul1, blaTEM-4	fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides kanamycin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftriaxone, meropenem, ciprofloxacin I/R // fluoroquinolones, carbapenems, aminoglycosides, glycopeptides, sulfonamides, macrolides, lincosamides, phenicols, beta-lactams
barcode10 barcode11	QnrB5, QnrVC4, sul1, QnrVC5, mphA, QnrB19 aph(3')-Ia, blaKPC-2, qnrB19, qnrB19 // QnrB5, QnrB19, APH(3')-Ia, msrE, armA, blaKPC-2, vgaC, aadA16, sul1, blaTEM-4 blaOXA-1, blaTEM-4, dfrA14, CTX-M-15, sul2, QnrB5, APH(3'')-Ib, blaKPC-2, vgaC, sul1	fluoroquinolones, sulfonamides, macrolides kanamycin, ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, ceftriaxone, meropenem, ciprofloxacin I/R // fluoroquinolones, carbapenems, aminoglycosides, glycopeptides, sulfonamides, macrolides, lincosamides, phenicols, beta-lactams fluoroquinolones, carbapenems, beta-lactams, sulfonamides, trimethoprim, aminoglycosides, glycopeptides

Tabla 5. Genes de resistencia consenso por barcode, tabla detallada Anexo 4.

#### 3.3 Análisis de plásmidos:

Se realizó un análisis de cada gen encontrado, incluyendo una breve descripción de su origen y referencias de lugares donde han sido descritos (Anexo 4). Posteriormente, se visualizaron los UTG (unidades de transcripción génica) representan fragmentos del plásmido construido a partir de las combinaciones de plásmidos planificadas para cada barcode. Dentro de cada código de barras, considerando que cada uno alberga diversas especies. Y por último se eligen los plásmidos que si han cumplido con todos los criterios mencionados con anterioridad en cada paso de la investigación es decir, que sean estructuras cerradas, completas y que hayan sido identificadas por los herramientas empleadas.

## 3.3.1 Representación plásmidos con Galaxy

Para la representación de plásmidos se ejecutó Prokka (v1.14.6) y se visualizó con Circos (v0.69.8), permitiendo la visualización circular de los datos y la exploración de las relaciones entre genes y barcodes. Los resultados de Prokka y Circos permitieron relacionar los contigs presentes en las muestras con la posición del gen de resistencia en cada barcode. Los resultados se presentan en "utgs" cada circos está formado por varios utgs y permite relacionar los genes presentes en cada unidad de transcripción. Para visualizar la unión de los utgs se ha generado el Anexo 9 el cual presenta los 12 barcodes con sus respectivos plásmidos y utgs, adicional se cuenta con la **figura 7**, que brinda un ejemplo representativo del barcode 10. Así como también para entender la disposición de utgs en cada barcode se ha preparado la **Tabla 5** que presenta los utgs presentes en cada barcode y sus genes asociados. Cabe recalcar que con las herramientas mencionadas se pueden ver a nivel proteico y enzimático muchos más datos para caracterizar los plásmidos, en esta investigación nos hemos centrado en la representación de los genes de resistencia presentes en dichos plásmidos.



**Figura 6.** Ejemplo de Circos Barcode 10, en utg000001c se encontraron los genes aph(3')-Ia\_1, qnrB19\_1 y blaKPC-2\_1 se aprecia que es el conting más grande, mientras que en los otros 4 contigs no se encuentran genes de resistencia en Galaxy. Anexo 9 Circos de los 12 barcodes.

Barcode	utg	Genes encontrados	Especies
1	19	acrA, blaOXA-72	Acinetobacter baumannii Klebsiella pneumoniae
2	-	blaOXA-50, APH(3')-IIb, ANT(2'')-Ia, FosA, aadA6, catB7	Pseudomonas aeruginosa Pseudomonas fluorescens
3	3	blaOXA-23, blaOXA-72, blaOXA-72 // blaOXA-72, blaOXA-160, blaOXA-26, blaOXA-24, blaOXA-169, blaOXA-23, blaOXA-139, blaOXA-25, blaOXA- 207, msrE	Acinetobacter baumannii
4	13	blaTEM-4, sul2, APH(3')-Ia, oqxB, sul1, AAC(3)-IIa, aadA2, CTX-M-82, mefB, CTX-M-79	Klebsiella pneumoniae
5	7	aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, qnrB19 // QnrB5, QnrB19, blaTEM-4, QnrB10, sul2, QnrB40, SHV-95, dfrA14, APH(4)-Ia, SHV-13	Klebsiella pneumoniae
6	21	aac(6')-Ib, aac(6')-Ib-cr, qnrB5 // QnrB5, QnrB19, blaTEM-4, blaKPC-2, AAC(6')-Ib, sul2, OXA-9, rmtG, oqxB, vgaC	Klebsiella pneumoniae
7	2	aac(6')-Ib-cr, aac(6')-Ib-cr, ARR-3, blaKPC-2, blaOXA-1, blaTEM-1C, catB4, sul1 // blaOXA-1, blaOXA-2 ,sul1, blaKPC-2, blamphA, blaTEM-4, dfrA5, sul2, aadA16, FosA	Pseudomonas aeruginosa Klebsiella pneumoniae Escherichia coli
8	1	blaOXA-2, blaOXA-1, blaTEM-4, sul1, aadA16, CTX-M-96, mphA, QnrB18, APH(3')-Ia, blaOXA-9	Serratia marcescens Klebsiella oxytoca
9	5	QnrB5, QnrVC4, sul1, QnrVC5, mphA, QnrB19	Enterobacter cloacae
10	5	aph(3')-Ia, blaKPC-2, qnrB19, qnrB19 // QnrB5, QnrB19, APH(3')-Ia, msrE, armA, blaKPC-2, vgaC, aadA16, sul1, blaTEM-4	Klebsiella aerogenes Enterobacter cloacae

11	11	blaOXA-1, blaTEM-4, dfrA14, CTX-M-15, sul2, QnrB5, APH(3")-Ib, blaKPC-2, vgaC, sul1	Klebsiella pneumoniae
12	14	blaOXA-181, blaOXA-2, oqxB, sul1, AAC(3)-IIc	Pseudonomas otitidis Klebsiella pneumoniae

Tabla 6. Genes encontrados en relación con utgs y especies por barcode.

#### 3.3.2 Identificación de plásmidos presentes

En el curso de esta investigación, se identificaron un total de 277 secuencias plasmídicas utilizando herramientas bioinformáticas. Sin embargo, es esencial determinar el tipo específico de cada plásmido identificado y analizar sus implicaciones en el contexto de la biomedicina. De los 277 plásmidos identificados inicialmente, 7 cumplen con todos los criterios de inclusión establecidos, según la herramienta bioinformática PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014). Estos plásmidos se pueden caracterizar como entidades completas y se han integrado en la **Tabla 7** para su análisis detallado. Entre los plásmidos que cumplen con los criterios de inclusión, se encontraron los tipos *ColRNAI*, *IncN*, *IncR* y *Col8282*.

Barcode	Plasmid	%Identity	HSP Length/Total Length	Contig	Start	End
5	ColRNAI	99.23	130/130	1	8538	8666
6	ColRNAI	99.23	130/130	1	11835	11707
7	IncN	99.42	514/514	1	48349	47838
10	ColRNAI	99.23	130/130	2	1348	1220
10	ColRNAI	99.23	130/130	2	10636	10508
10	IncR	100.00	251/251	1	30200	30450
12	Col8282	99.04	209/207	2	306	98

Tabla 7. Tipos de plásmidos identificados por BC, empleando la herramienta PlasmidFinder .

#### 4. Discusión

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública mundial que amenaza seriamente la capacidad de tratar infecciones bacterianas comunes. Según la OMS, en 2019 se estima que 1,27 millones de muertes a nivel global fueron causadas directamente por infecciones resistentes a los antibióticos (Murray et al, 2022). En Ecuador, este problema también es crítico, con altas tasas de resistencia reportadas en patógenos como Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae y Acinetobacter baumannii (Gómez-Junyent. et al. 2019; Villarreal-Treviño, et al. 2017). Los hallazgos de este estudio proporcionan una valiosa visión de la epidemiología de la resistencia a los antibióticos en Ecuador, mediante la secuenciación y análisis bioinformático de plásmidos, se identifican genes específicos y se relacionan con cepas bacterianas involucradas en la resistencia. Se analizaron 2071 lecturas secuenciadas con tecnología ONT, encontrando 228 genes de resistencia en 277 secuencias plasmídicas recuperadas, de los cuales se asocia a 7 plásmidos que cumplen con las características señaladas en esta investigación siendo ColRNAI, IncN, IncR y Col8282 los plásmidos de interés. Estos resultados ofrecen una visión detallada de la resistencia antimicrobiana en Ecuador, identificando genes claves como blaOXA-181, blaOXA-2, blaOXA-23, blaOXA-72, blaKPC-2 y blaTEM-1C, levantando especial preocupación, ya que los carbapenémicos representan la última línea de defensa contras las infecciones graves causadas por bacterias multirresistentes (Nordmann, et al. 2011). La resistencia a carbapenémicos se asocia con una alta mortalidad y un aumento significativo de los costos de atención médica (Poirel, et al. 2012). La presencia de estos genes subraya la urgente necesidad de aplicar prácticas más estrictas de administración de antibióticos y de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para combatir las infecciones resistentes a los carbapenems. Igualmente preocupante resulta la prevalencia de genes asociados a la resistencia a los aminoglucósidos, como aac(6')-lb-cr que confiere resistencia a una clase de antibióticos utilizados habitualmente para tratar infecciones por bacterias gram-negativas. La aparición de Enterobacteriaceae resistentes a los aminoglucósidos, como Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp. y Shigella spp; supone una amenaza importante, ya que estos patógenos son responsables de un amplio espectro de infecciones graves como sepsis, neumonía y meningitis (Rozwandowicz et al., 2018). La identificación de genes de resistencia a las quinolonas, qnrB19 y qnrB5, pone aún más de relieve la naturaleza polifacética de la resistencia a los antibióticos. Las quinolonas se utilizan ampliamente para tratar infecciones respiratorias, urinarias y gastrointestinales, la aparición de patógenos resistentes a las quinolonas como Neisseria gonorrhoeae y Mycobacterium tuberculosis ha provocado un aumento de la morbilidad y la mortalidad (Guerra-Sarmiento et al., n.d.). La presencia de genes como sull y aph(3')-la subraya aún más la

complejidad de la crisis de resistencia a los antibióticos. Estos genes confieren resistencia a cloranfenicol, sulfonamidas y aminoglucósidos, respectivamente. La resistencia a estos antibióticos, aunque menos frecuente que la resistencia a carbapenems y quinolonas, sigue siendo un problema importante para el tratamiento de infecciones bacterianas (Potter et al., 2016). La presencia de estos genes en plásmidos móviles facilita su diseminación entre diferentes especies bacterianas, incluyendo patógenos de alto riesgo como Enterobacteriales y Acinetobacter baumannii (Rozwandowicz, et al. 2018; Tacconelli, et al. 2018). Estos hallazgos son consistentes con estudios previos en la región que han reportado altas tasas de resistencia a estos antibióticos de primera línea (Sosa, et al. 2010); Laxminarayan, et al. 2013). Un estudio realizado en 2020 encontró altas tasas de resistencia a los carbapenémicos, aminoglucósidos y quinolonas en aislados de Escherichia coli y Salmonella spp. obtenidos de muestras de carne de pollo a nivel nacional (Amancha, et al. 2023). Esto sugiere que la resistencia a los antibióticos críticos está ampliamente extendida en el país, tanto en entornos clínicos como en la cadena alimentaria. Además, un análisis de la epidemiología molecular de bacilos gramnegativos resistentes a los carbapenémicos en Ecuador reveló la presencia de genes de resistencia clave, como blaKPC, blaOXA-48 y blaNDM, en multiples especies bacterianas (Soria-Segarra, et al. 2024) Estos genes se han asociado con la diseminación global de la resistencia a los carbapenémicos, lo que representa una grave amenaza para la salud pública. Por otro lado, un estudio reciente encontró una alta prevalencia de genes de resistencia a los  $\beta$ -lactámicos, Incluidos blaTEM-1, blaCTX-M-1 y blaOXA-181, en muestras ambientales del sistema de transporte público de Quito (Hernández-Alomía, et al. 2023). Esto demuestra que los genes de resistencia a los antibióticos no se limitan a los entornos clínicos, sino que se han diseminado ampliamente en el medio ambiente, lo que facilita aún más su propagación.

Un aspecto clave de este estudio es el análisis de los plásmidos portadores de genes de resistencia. Los plásmidos desempeñan un papel fundamental en la diseminación horizontal de estos genes entre diferentes especies bacterianas, incluyendo patógenos oportunistas y comensales (Partridge, et al. 2018); Carattoli, 2013). La identificación de los plásmidos con características conservadas, como los pertenecientes a los grupos de incompatibilidad IncN, IncR y ColRNAI, sugieren la existencia de elementos genéticos móviles altamente exitosos que facilitan la propagación de la resistencia. Por ejemplo se han reportado la presencia de plásmidos ColRNAI en Klebsiella pneumoniae, Enterobacter cloacae, E. coli y Klebsiella aerogenes en Ecuador. Estos plásmidos han sido asociados con la diseminación horizontal de genes de resistencia incluyendo colistina y carbapenemasas (Mejia, 2022) Es curioso destacar que ninguno de estos plásmidos ha sido descrito en Pseudomonas de Ecuador todavía, pero con estudios como el realizado se comprueba su fácil diseminación y presencia tan diversa. Estos hallazgos a nivel nacional e incluso local subrayan la urgente necesidad de implementar estrategias integrales de vigilancia, control y uso racional de antibióticos en Ecuador. Dada la naturaleza ubicua de los genes de resistencia, se requiere un enfoque de salud que aborde la resistencia a los antibióticos en los sectores de salud pública humana, animal y ambiental. Algunas iniciativas clave a nivel mundial incluyen UK 5-year action plan for antimicrobial resistance 2024 to 2029. Este plan, al igual que otros, establece objetivos y estrategias para fortalecer la vigilancia, mejorar las prácticas de prescripción y uso de antibióticos, y promover la investigación y el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. Además, Ecuador se ha comprometido a nivel global con la lucha contra la resistencia a los antibióticos, al unirse a la Declaración Ministerial de Mascate y al objetivo de la OMS de que al menos el 60% del consumo total de antibióticos en humanos pertenezca a la categoría "Acceso" para 2030. Estos compromisos internacionales ayudarán a orientar las políticas y acciones nacionales, lo que por supuesto impactaran al conocimiento y manejo epidemiológico de las infecciones resistentes a antibióticos.

#### 5. Conclusiones

La secuenciación por nanoporos y el análisis bioinformático permitieron identificar 7 plásmidos que contenían varios genes de resistencia, incluyendo resistencias a carbapenémicos (blaOXA-181, blaOXA-2, blaOXA-23, blaOXA-72, blaKPC-2), quinolonas (qnrB19, qnrB5), aminoglucósidos (aac(6')-Ib-cr, aph(3')-Ia), cloranfenicol (cat) y sulfonamidas (sul1). Estos hallazgos demuestran la diversidad de genes de resistencia presentes en plásmidos bacterianos de muestras clínicas en Ecuador. La preparación y secuenciación de bibliotecas genómicas de DNA plasmídico con tecnología Oxford Nanopore (ONT) permitió obtener datos de alta calidad de 12 códigos de barras (BC) en pool, representando un tamizaje eficaz para identificar plásmidos portadores de genes de resistencia en especies incluyendo Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, entre otras. El ensamblaje de secuencias plasmídicas utilizando dos plataformas bioinformáticas (Galaxy y Epi2me) con datos de ONT resultó en la identificación de 7 plásmidos completos. La comparación de ambas plataformas reveló que Galaxy proporcionó ensamblajes más contiguos, completos y datos de mayor confianza. Los plásmidos identificados, como ColRNAI, IncN, IncR y Col8282, desempeñan un papel crucial en la diseminación de genes de resistencia a múltiples fármacos en el contexto ecuatoriano. La alta frecuencia de estos genes, especialmente blaOXA y blaKPC, sugiere que los tratamientos de primera línea con  $\beta$ -lactámicos y los de última línea con carbapenémicos podrían ser ineficaces en muchos casos, exigiendo una reevaluación urgente de los protocolos de tratamiento empírico en hospitales de Quito. Dado que este estudio representa un tamizaje inicial con 12 BC en pool, se recomienda realizar una secuenciación de genoma completo (WGS) de todas las cepas incluidas en cada BC. Esto permitirá una asociación precisa de cada gen de resistencia con su especie bacteriana portadora, facilitando intervenciones más específicas.

Financiamiento/Fondos: Esta investigación no recibió financiación externa.

#### **Agradecimientos:**

El presente trabajo de investigación no hubiese sido posible sin la colaboración y el apoyo de varias personas que fueron fundamentales en su desarrollo.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores, el Dr. José Rubén y la MSc. Gabriela, por sus valiosas recomendaciones, su apoyo constante y su invaluable guía desde el inicio de este proyecto. Sus conocimientos, experiencia y dedicación fueron esenciales para la culminación exitosa de esta tesis.

Asimismo, quiero agradecer al MSc. Andrés Herrera por su gran colaboración y por ser una pieza fundamental en el análisis bioinformático del estudio. Su experticia y disposición fueron claves para el avance y la obtención de resultados significativos.

Me permito expresar mi sincero agradecimiento a la Dra. Jeannete Zurita y al Dr. Camilo Zurita por brindarme la oportunidad de participar en su proyecto "Impacto de las pruebas rápidas en el manejo de las bacteriemias por Bacilos Gram negativos en diez hospitales de Ecuador durante el periodo 2021-2022", financiado por Pfizer y la Unidad de Investigaciones en Biomedicina Zurita & Zurita Laboratorios. Su generosidad al facilitarme las muestras y compartir los datos obtenidos ha sido fundamental para el desarrollo de mi tesis. Agradezco profundamente su disposición y contribución, las cuales han sido esenciales para la ejecución exitosa de este trabajo.

De igual manera, agradezco a mi compañero Paul Márquez por su apoyo en la revisión bibliográfica y el análisis de datos. Su colaboración y entusiasmo fueron de gran ayuda para mejorar la calidad del trabajo.

No puedo dejar de mencionar a mi familia, quienes me brindaron su apoyo incondicional durante todo el proceso. A mis padres, Tamara y Juan Manuel, por su amor, comprensión y por inculcarme el valor de la perseverancia. A mi esposa, Daniela, por su paciencia, apoyo y por ser mi fuente de inspiración constante. Y a mi hija Sofía, por su alegría y por llenarme de energía cada día.

Finalmente, quiero agradecer a la Universidad Internacional SEK (UISEK) por brindarme la formación y las herramientas necesarias para obtener este título de cuarto nivel. Agradezco a todos los profesores, personal administrativo y compañeros que de alguna manera contribuyeron a mi desarrollo profesional.

Gracias a todos por su invaluable apoyo.

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

#### Referencias citadas.

1. Amancha, G., Celis, Y., Irazabal, J., Falconí, M., Villacis, K., Thekkur, P., ... & Verdonck, K. (2023). High levels of antimicrobial resistance in escherichia coli and salmonella from poultry in ecuador. Revista Panamericana De Salud Pública, 47, 1. https://doi.org/10.26633/rpsp.2023.15

2. Angela, Gomez-Simmonds., Medini, K., Annavajhala., Nina, Tang., Felix, D., Rozenberg., Mehrose, Ahmad., Heekuk, Park., Allison, J., Lopatkin., Anne-Catrin, Uhlemann. (2022). Population structure of blaKPC-harbouring IncN plasmids at a New York City medical centre and evidence for multi-species horizontal transmission.. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, doi: 10.1093/jac/dkac114

3. Bankevich, A., S. Nurk, D. Antipov, A. A. Gurevich, M. Dvorkin et al., 2012 SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. Journal of Computational Biology 19: 455–477. 10.1089/cmb.2012.0021

4. Beatson, S. A., and M. J. Walker, 2014 Tracking antibiotic resistance. Science 345: 1454–1455. 10.1126/science.1260471

5. Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β-lactamase-producing pathogens. In Clinical Microbiology Reviews (Vol. 33, Issue 2). American Society for Microbiology. https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19

6. Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. In International Journal of Medical Microbiology (Vol. 303, Issues 6–7, pp. 298–304). https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001

7. Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. International Journal of Medical Microbiology, 303(6-7), 298-304.

8. Carattoli, A., E. Zankari, García-Fernández Aurora, M. V. Larsen, O. Lund et al., 2014 In SilicoDetection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 58: 3895–3903. 10.1128/aac.02412-14

9. Castillo, D., Vandieken, V., Engelen, B., Engelhardt, T., & Middelboe, M. (2018). Draft Genome Sequences of Six Vibrio diazotrophicus Strains Isolated from Deep Subsurface Sediments of the Baltic Sea. Genome Announcements, 6(10), e00081-18. https://doi.org/10.1128/genomeA.00081-18

10. Coster, W. D., S. D'Hert, D. T. Schultz, M. Cruts, and C. V. Broeckhoven, 2018 NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data (B. Berger, Ed.). Bioinformatics 34: 2666–2669. 10.1093/bioinformatics/bty149

11. Cuccuru, G., Orsini, M., Pinna, A., Sbardellati, A., Soranzo, N., Travaglione, A., Uva, P., Zanetti, G., & Fotia, G. (2014). Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. Bioinformatics, 30(13), 1928–1929. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu135

12. Curry, E., & Zhang, H. (n.d.). Computational Genomics with R Computational Biology Series Introduction to Bioinformatics with R: A Practical Guide for Biologists Analyzing High-Dimensional Gene Expression and DNA Methylation Data with R. https://www.routledge.com/Chapman--HallCRC-Computational-Biology-Series/bookseries/CRCCBS

13. Gaus, D., & Larco, D. (2021). La epidemiologia microbiológica de una unidad rural de cuidados intensivos en Ecuador. Práctica Familiar Rural, 6(1). https://doi.org/10.23936/pfr.v6i1.191

14. Gómez-Junyent, J. et al. (2019). Épidemiology of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in a tertiary care hospital in Quito, Ecuador. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 17, 31-35.

15. Grabherr, M. G., B. J. Haas, M. Yassour, J. Z. Levin, D. A. Thompson et al., 2011 Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. Nature Biotechnology 29: 644–652. 10.1038/nbt.1883

16. Guerra-Sarmiento, M., Ruíz-Martin Leyes, F., Arzuza-Ortega, L., & Maestre-Serrano, R. (n.d.). Characterization of multiresistant gram-negative bacilli, isolated in patients hospitalized in health institutions in Barranquilla (Colombia). www.revinf.cl

17. Hernández-Alomía, F., Bastidas-Caldes, C., Ballesteros, I., Tenea, G. N., Jarrín-V, P., Molina, C. A., ... & Castillejo, P. (2023). Beta-lactam antibiotic resistance genes in the microbiome of the public transport system of quito, ecuador. International Journal of Environmental Research and Public Health, 20(3), 1900. https://doi.org/10.3390/ijerph20031900

18. Jayakumar, V., and Y. Sakakibara, 2017 Comprehensive evaluation of non-hybrid genome assembly tools for third-generation PacBio long-read sequence data. Briefings in Bioinformatics 20: 866–876. 10.1093/bib/bbx147

19. Jia, B., A. R. Raphenya, B. Alcock, N. Waglechner, P. Guo et al., 2016 CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. Nucleic Acids Research 45: D566–D573. 10.1093/nar/gkw1004

20. Kaitlin, A., Tagg., Carola, Venturini., M., Kamruzzaman., Andrew, N., Ginn., Andrew, N., Ginn., Sally, R., Partridge., Sally, R., Partridge. (2019). Plasmid DNA Isolation and Visualization: Isolation and Characterization of Plasmids from Clinical Samples. Methods of Molecular Biology, doi: 10.1007/978-1-4939-9877-7\_1

21. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD.: Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. Applied and Environmental Microbiology

22. Krawczyk, P. S., L. Lipinski, and A. Dziembowski, 2018 PlasFlow: predicting plasmid sequences in metagenomic data using genome signatures. Nucleic Acids Research 46: e35–e35. 10.1093/nar/gkx1321

23. Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J., & Marra, M. A. (2009). Circos: An information aesthetic for comparative genomics. Genome Research, 19(9), 1639–1645. https://doi.org/10.1101/gr.092759.109

24. Laxminarayan, R. et al. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. The Lancet Infectious Diseases, 13(12), 1057-1098.

25. Li, D., C.-M. Liu, R. Luo, K. Sadakane, and T.-W. Lam, 2015 MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics 31: 1674–1676. 10.1093/bioinformatics/btv033

26. Li, H., 2018 Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences (I. Birol, Ed.). Bioinformatics 34: 3094–3100. 10.1093/bioinformatics/bty191

 Li, R., M. Xie, N. Dong, D. Lin, X. Yang et al., 2018 Efficient generation of complete sequences of MDRencoding plasmids by rapid assembly of MinION barcoding sequencing data. GigaScience 7: 10.1093/gigascience/gix132
 Li, W., J. Köster, H. Xu, C.-H. Chen, T. Xiao et al., 2015 Quality control, modeling, and visualization of CRISPR

screens with MAGeCK-VISPR. 16: 10.1186/s13059-015-0843-6

29. Maio, N. D., L. P. Shaw, A. Hubbard, S. George, N. Sanderson et al., 2019 Comparison of long-read sequencing technologies in the hybrid assembly of complex bacterial genomes. 10.1101/530824

30. Maljkovic Berry, I., Melendrez, M. C., Bishop-Lilly, K. A., Rutvisuttinunt, W., Pollett, S., Talundzic, E., Morton, L., & Jarman, R. G. (2020). Next Generation Sequencing and Bioinformatics Methodologies for Infectious Disease Research and Public Health: Approaches, Applications, and Considerations for Development of Laboratory Capacity. Journal of Infectious Diseases, 221, S292–S307. https://doi.org/10.1093/infdis/jiz286

31. Manuel, Ares-Arroyo., Cristina, Bernabe-Balas., Alfonso, Santos-Lopez., Maria, R., Baquero., Kashi, N., Prasad., D., Cid., Carmen, Martin-Espada., Alvaro, San, Millan., Bruno, Gonzalez-Zorn. (2018). PCR-based analysis of ColE1 plasmids in clinical isolates and metagenomic samples reveals their importance as gene capture platforms. Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/FMICB.2018.00469

32. Mengjie Shao, Nanjiao Ying, Qian Liang, Nan Ma, Sebastian Leptihn, Yunsong Yu, Huan Chen, Chengzhi Liu, Xiaoting Hua, Pdif-mediated Antibiotic resistance genes Transfer in Bacteria identified by pdifFinder, Briefings in Bioinformatics, 2022;, bbac521, https://doi.org/10.1093/bib/bbac52

33. Moreira, D. (2000). Multiple independent horizontal transfers of informational genes from bacteria to plasmids and phages: Implications for the origin of bacterial replication machinery. In Molecular Microbiology (Vol. 35, Issue 1, pp. 1–5). https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01692.

34. Munita, J. M., and C. A. Arias Mechanisms of Antibiotic Resistance, pp. 481–511 in Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, Fifth Edition, American Society of Microbiology. 10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015

35. Murray, C. J. et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet, 399(10325), 629-655.

36. Nordmann, P. et al. (2011). The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria. The Lancet Infectious Diseases, 11(4), 288-296.

37. Pablo Yarza, Pelin Yilmaz, Elmar Pruesse, Frank Oliver Glöckner, Wolfgang Ludwig, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman, Jean Euzéby, Rudolf Amann, Ramon Rosselló-Móra: Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences.

38. Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). Carbapenems: Past, present, and future. In Antimicrobial Agents and Chemotherapy (Vol. 55, Issue 11, pp. 4943–4960). https://doi.org/10.1128/AAC.00296-11

39. Partridge, S. R. et al. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. Clinical Microbiology Reviews, 31(4), e00088-17.

40. Poirel, L. et al. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(7), 1597-1606.

41. Potter, R. F., D'Souza, A. W., & Dantas, G. (2016). The rapid spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. In Drug Resistance Updates (Vol. 29, pp. 30–46). Churchill Livingstone. https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.09.002

42. Rasche, H., & Hiltemann, S. (2020). Galactic Circos: User-friendly Circos plots within the Galaxy platform. GigaScience, 9(6). https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa065

43. Rozwandowicz, M. et al. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(5), 1121-1137.

44. Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 73(5), 1121–1137. https://doi.org/10.1093/jac/dkx488

45. Salud global: tendencias y retos para un abordaje integral / Intriago, D. & Llanos, G. (Eds.); – 1ra. ed.— Quito: Universidad Internacional SEK, 2023.

46. Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics, 30(14), 2068–2069. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153

47. Smillie, C., M. P. Garcillan-Barcia, M. V. Francia, E. P. C. Rocha, and F. de la Cruz, 2010 Mobility of Plasmids. Microbiology and Molecular Biology Reviews 74: 434–452. 10.1128/mmbr.00020-10

48. Soliz Poveda, C., Calle Caamaño, C., Coloma Coloma, E., Plaza Rodríguez, A., & Castro Ramírez, N. (2022). Prevalencia de gérmenes con multirresistencia antibiótica en bacteriemia asociada a neutropenia febril en pacientes oncológicos hospitalizados. Oncología (Ecuador), 32(2), 157–168. https://doi.org/10.33821/631

49. Soria-Segarra, C., Soria-Segarra, C., Molina-Matute, M., Agreda-Orellana, I., Núñez-Quezada, T., Cevallos-Apolo, K., ... & Gutiérrez-Fernández, J. (2024). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in ecuador. BMC Infectious Diseases, 24(1). https://doi.org/10.1186/s12879-024-09248-6

Sosa, A. D. J. et al. (2010). Antimicrobial resistance in developing countries. Springer Science & Business Media.
 Tacconelli, E. et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. The Lancet Infectious Diseases, 18(3), 318-327.

52. Tusa-Torres A. et al. Indicadores de resistencia antimicrobiana en la unidad de cuidados intensivos en un hospital de Quito, Ecuador Revista científica INSPILIP V. (5), Número 2, Guayaquil, Ecuador. DOI:10.31790/inspilip.v5i2.33

53. Vaser, R., I. Sović, N. Nagarajan, and M. Šikić, 2017 Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. Genome Research 27: 737–746. 10.1101/gr.214270.116

54. Villacís, J. E., Reyes, J. A., Castelán-Sánchez, H. G., Dávila-Ramos, S., Lazo, M. A., Wali, A., Bodero, L. A., Toapanta, Y., Naranjo, C., Montero, L., Campos, J., Galas, M. G., & Gestal, M. C. (2020). OXA-48 carbapenemase in Klebsiella pneumoniae sequence type 307 in Ecuador. Microorganisms, 8(3). https://doi.org/10.3390/microorganisms8030435

55. Villarreal-Treviño, L. et al. (2017). Antimicrobial resistance trends in Acinetobacter baumannii infections in a university hospital in Ecuador. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 35(9), 554-558.

56. Wick, R. R., L. M. Judd, C. L. Gorrie, and K. E. Holt, 2017 Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLOS Computational Biology 13: 1–22. 10.1371/journal.pcbi.1005595

57. Wick, R. R., M. B. Schultz, J. Zobel, and K. E. Holt, 2015 Bandage: interactive visualization of \lessi\greaterde novo\less/i\greater genome assemblies. Bioinformatics 31: 3350–3352. 10.1093/bioinformatics/btv383

58. Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen et al., 2012 Identification of acquired antimicrobial resistance genes. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 67: 2640–2644. 10.1093/jac/dks261

59. Zankari, E., R. Allesøe, K. G. Joensen, L. M. Cavaco, O. Lund et al., 2017 PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 72: 2764–2768. 10.1093/jac/dkx217

60. Zerbino, D. R., and E. Birney, 2008 Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. Genome Research 18: 821–829. 10.1101/gr.074492.107

Anexo 1.A QC. EPI2ME Detalla el porcentaje de éxito del workflow, las lecturas por barcode, reporte de calidad, longitud y bases de cada lectura.

QC



Anexo 2. Nanoplot por Barcode generado en plataforma Galaxy, reporte NanoStats.

<b>10 2.</b> Manopiot por 1	Jaroodo gonorado en plataronn	a Galaxy, reporte Manobiais.
Barcode 1. Gener	al summary:	Read length N50: 1,319.0
Mean read length	: 2,319.1	Total bases: 4,897,748.0
Median read leng	th: 1,965.0	
Number of reads:	658.0	Barcode 8. General summary:
Read length N50:	3,945.0	Mean read length: 1,411.9
Total bases:	1,525,974.0	Median read length: 595.5
		Number of reads: 6,790.0
Barcode 3. Gener	al summary:	Read length N50: 4,494.0
Mean read length	: 2,526.7	Total bases: 9,586,657.0
Median read leng	th: 796.0	
Number of reads:	2,367.0	
Read length N50:	7,654.0	Barcode 9. General summary:
Total bases:	5,980,773.0	Mean read length: 490.0
	, ,	Median read length: 241.0
Barcode 4. Gener	al summary:	Number of reads: 2,167.0
Mean read length	: 2,594.6	Read length N50: 882.0
Median read leng	th: 974.0	Total bases: 1,061,836.0
Number of reads:	4,574.0	
Read length N50:	6,473.0	Barcode 10. General summary:
Total bases:	11,867,814.0	Mean read length: 3,250.3
		Median read length: 1,877.0
Barcode 5. Gener	al summary:	Number of reads: 3,301.0
Mean read length	: 1,687.1	Read length N50: 8,953.0
Median read leng	th: 772.0	Total bases: 10,729,121.0
Number of reads:	4,819.0	
Read length N50:	3,433.0	Barcode 11. General summary:
Total bases:	8,130,245.0	Mean read length: 1,760.0
	, ,	Median read length: 793.5
Barcode 6. Gener	al summary:	Number of reads: 14,572.0
Mean read length	: 1,543.7	Read length N50: 3,423.0
Median read leng	th: 701.0	Total bases: 25,647,027.0
Number of reads:	8,949.0	
Read length N50:	4,002.0	Barcode 12. General summary:
Total bases:	13,814,496.0	Mean read length: 2,119.5
		Median read length: 1,768.0
Barcode 7. Gener	al summary:	Number of reads: 8,012.0
Mean read length	: 659.6	Read length N50: 3.946.0
Median read leng	th: 312.0	Total bases: 16,981,280.0
Number of reads:	7,425.0	, , , , , , , , , , , , , , , , , , ,

Anexo 3. Reporte PlasFlow sintetizado en matriz excel.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1fkRlSyovOoIkMjn9NT60pMjKSym6tyYc/edit?usp=sharing&ouid=10835457155536812 3596&rtpof=true&sd=true

Anexo 4. Tabla análisis de genes presentes en las lecturas de ambas plataformas, contiene el URL para acceder al CARD específico.

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1sJInTxy36HSx6M7QFNgcVn7q67XjMDlY/edit?usp=sharing&ouid=108354571555 368123596&rtpof=true&sd=true Anexo 5. Lecturas de plásmidos que se corrieron en EPI2ME para generar anotaciones, primero el número de lecturas y segundo el resumen de su estado.



Sample 🌐	pass/failed reason	Length 🄶
barcode01	Completed successfully	9695
barcode02	Failed to trim Assembly	N/A
barcode03	Completed successfully	7835
barcode04	Completed successfully	6636
barcode05	Completed but no annotations found in the database	4383
barcode06	Completed successfully	4373
barcode07	Completed successfully	8263
barcode08	Completed successfully	4765
barcode09	Failed due to insufficient reads	N/A
barcode10	Completed successfully	9282
barcode11	Completed successfully	7666
barcode12	Completed successfully	5158

## Anexo 6. Anotaciones de plásmidos EPI2ME

Muestra	Característic a	Base de datos	Identid ad	Similit ud	Descripción	Inici o	Fin	Longit ud	Hebr a	Longitu d del plásmid o
barcode1 2	RLX1_SALT M	swisspr ot	54.2%	66.3%	Protein inferred from homology: Swiss-Prot protein existence level 3. This protein is probably required for relaxation complex formation. From Salmonella typhimurium.	1696	243 4	738	1	5158
barcode1 2	yibT	swisspr ot	81.8%	47.8%	YIBT_ECO57 - Protein predicted: Swiss- Prot protein existence level 4. From Escherichia coli O157:H7.	3331	343 0	99	-1	5158
barcode0 4	ori	snapgen e	96.3%	99.5%	high-copy-number ColE1/pMB1/pBR322/pUC origin of replication	5025	561 2	592	1	6636

-										
barcode0 4	mbeA	swisspr ot	99.8%	83.4%	MBEA_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization and is thus essential to promote the specific transfer of the plasmid during conjugation. First catalyzes the specific cleavage of one of the DNA strands at oriT, forming a covalent 5'- phosphotyrosine intermediate. The nic site corresponds to 5'- (1469)CTGG/CTTA(1462)-3' in the cleaved strand. The cleaved strand is then transferred through the dedicated type IV secretion apparatus. MbeA remains covalently linked at the 5' end of the strand, and once in the recipient cell, it probably catalyzes the rejoining of the two ends of the strand, re- forming the circular plasmid DNA. Is functional in vitro without a requirement for the conjugative accessory proteins. From Escherichia coli.	215	150 8	1293	1	6636
barcode0 4	cer region	snapgen e	99.6%	100.0%	ColE1-derived recombination site that helps to maintain plasmids as monomers	1463	174 7	284	1	6636
barcode0 4	cea	swisspr ot	100.0%	48.5%	CEA1_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Colicins are polypeptide toxins produced by and active against E.coli and closely related bacteria. From Escherichia coli.	3721	448 0	759	1	6636
barcode0 4	rop	swisspr ot	100.0%	98.4%	ROP_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Regulates plasmid DNA replication by modulating the initiation of transcription of the primer RNA precursor. Processing of the precursor of the primer, RNAII, is inhibited by hydrogen bonding of RNAII to its complementary sequence in RNAI. ROP increases the affinity of RNAI for RNAII and thus decreases the rate of replication initiation events. From Escherichia coli.	6031	621 7	186	-1	6636
barcode0 4	mbeC	swisspr ot	100.0%	60.9%	MBEC_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Required for efficient mobilization of ColE1 plasmid and is thus essential to promote the specific transfer of the plasmid during conjugation. Probably functions by inducing DNA bending, helping the MbeA relaxase to melt the DNA around the nic site and cleave the phosphodiester bond. Binds specifically double-stranded DNA (dsDNA) containing the ColE1 oriT but does not recognize the inverted repeat (IR). From Escherichia coli.	6378	658 8	210	1	6636
barcode0 4	imm	swisspr ot	100.0%	100.0%	IMM1_ECOLX - Protein predicted: Swiss- Prot protein existence level 4. This protein is able to protect a cell, which harbors the plasmid ColE1 encoding colicin E1, against colicin E1. From Escherichia coli.	4482	482 1	339	-1	6636
barcode0 4	lys	swisspr ot	100.0%	100.0%	LYS3_ECOLX - Protein inferred from homology: Swiss-Prot protein existence level 3. Lysis proteins are required for both colicin	4868	500 3	135	1	6636

					release and partial cell lysis. From Escherichia coli.					
barcode0 4	RNAI	Rfam	100.0%	97.1%	Accession: RF00106 - RNAI	5063	516 8	105	-1	6636
barcode0 4	YPB1_ECOL X	swisspr ot	100.0%	29.5%	Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. From Escherichia coli.	6253	637 0	117	1	6636
barcode0 6	p15A ori	snapgen e	98.3%	43.2%	Plasmids containing the medium-copy- number p15A origin of replication can be propagated in E. coli cells that contain a second plasmid with the ColE1 origin.	4137	437 3	236	-1	4373
barcode0 6	rop	swisspr ot	65.5%	87.3%	ROP_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Regulates plasmid DNA replication by modulating the initiation of transcription of the primer RNA precursor. Processing of the precursor of the primer, RNAII, is inhibited by hydrogen bonding of RNAII to its complementary sequence in RNAI. ROP increases the affinity of RNAI for RNAII and thus decreases the rate of replication initiation events. From Escherichia coli.	3793	395 8	165	-1	4373
barcode0 6	RNAI	Rfam	100.0%	98.0%	Accession: RF00106 - RNAI	164	268	104	1	4373
barcode0 6	ColA ori	snapgen e	95.2%	16.4%	Plasmids containing the ColA origin of replication can be propagated in E. coli cells that contain additional plasmids with compatible origins.	9	113	104	-1	4373
barcode0 6	cer region	snapgen e	100.0%	8.1%	ColE1-derived recombination site that helps to maintain plasmids as monomers	2644	266 7	23	-1	4373
barcode0 6	oriT	snapgen e	100.0%	5.8%	origin of transfer for the bacterial F plasmid (Frost et al., 1994)	3248	326 5	17	-1	4373
barcode0 3	blaOXA-133	swisspr ot	65.5%	79.5%	BL133_ACIRA - Experimental evidence at transcript level: Swiss-Prot protein existence level 2. Catalyzes the hydrolysis of beta- lactam antibiotics. From Acinetobacter radioresistens.	1488	213 9	651	-1	7835
barcode0 3	lambda t0 terminator	snapgen e	100.0%	17.9%	transcription terminator from phage lambda	4284	430 1	17	-1	7835
barcode0 8	mbeA	swisspr ot	54.8%	96.5%	MBEA_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Relaxase involved in plasmid ColE1 conjugative mobilization and is thus essential to promote the specific transfer of the plasmid during conjugation. First catalyzes the specific cleavage of one of the DNA strands at oriT, forming a covalent 5'- phosphotyrosine intermediate. The nic site corresponds to 5'- (1469)CTGG/CTTA(1462)-3' in the cleaved strand. The cleaved strand is then transferred through the dedicated type IV secretion apparatus. MbeA remains covalently linked at the 5' end of the strand, and once in the recipient cell, it probably catalyzes the rejoining of the two ends of the strand, re-	3424	156	1497	1	4765

					forming the circular plasmid DNA. Is functional in vitro without a requirement for the conjugative accessory proteins. From Escherichia coli.					
barcode0 8	p15A ori	snapgen e	97.4%	57.3%	Plasmids containing the medium-copy- number p15A origin of replication can be propagated in E. coli cells that contain a second plasmid with the ColE1 origin.	2402	271 1	313	1	4765
barcode0 8	mbeC	swisspr ot	66.7%	54.8%	MBEC_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Required for efficient mobilization of ColE1 plasmid and is thus essential to promote the specific transfer of the plasmid during conjugation. Probably functions by inducing DNA bending, helping the MbeA relaxase to melt the DNA around the nic site and cleave the phosphodiester bond. Binds specifically double-stranded DNA (dsDNA) containing the ColE1 oriT but does not recognize the inverted repeat (IR). From Escherichia coli.	3240	342 9	189	1	4765
barcode0 8	RNAI	Rfam	100.0%	99.0%	Accession: RF00106 - RNAI	2196	229 9	103	-1	4765
barcode0 8	YPB1_ECOL X	swisspr ot	75.0%	24.2%	Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. From Escherichia coli.	3100	319 6	96	1	4765
barcode1 0	CloDF13 ori	snapgen e	95.9%	100.0%	Plasmids containing the CloDF13 (CDF) origin of replication can be propagated in E. coli cells that contain additional plasmids with compatible origins.	9105	558	739	1	9282
barcode1 0	ceaC	swisspr ot	61.2%	84.9%	CEA3_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Colicins are polypeptide toxins produced by and active against E.coli and closely related bacteria. From Escherichia coli.	7193	859 7	1404	1	9282
barcode1 0	cim	swisspr ot	98.8%	100.0%	IMMC_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. This protein complexes with cloacin protein in equimolar amounts and inhibits it by binding with high affinity to the C- terminal catalytic domain of cloacin. From Escherichia coli.	8609	886 4	255	1	9282
barcode1 0	mobA	swisspr ot	57.5%	99.2%	MOBA1_ECOLX - Also known as B. Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. This protein is essential to promote the specific transfer of the plasmid in the presence of conjugative plasmids. From Escherichia coli.	1464	306 3	1599	1	9282

barcode1 0	гор	swisspr ot	58.6%	92.1%	ROP_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Regulates plasmid DNA replication by modulating the initiation of transcription of the primer RNA precursor. Processing of the precursor of the primer, RNAII, is inhibited by hydrogen bonding of RNAII to its complementary sequence in RNAI. ROP increases the affinity of RNAI for RNAII and thus decreases the rate of replication initiation events. From Escherichia coli.	4559	473 3	174	-1	9282
barcode1 0	cnl	swisspr ot	56.4%	94.2%	LYS4_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Lysis proteins are required for both colicin release and partial cell lysis. From Escherichia coli.	8957	912 2	165	1	9282
barcode1 )	D	swisspr ot	95.8%	99.3%	RPI_ECOLX - Also known as rpi. Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. From Escherichia coli.	3775	420 4	429	-1	9282
barcode1 0	RNAI	Rfam	100.0%	99.0%	Accession: RF00106 - RNAI	9159	926 2	103	-1	9282
barcode1 0	cer region	snapgen e	95.1%	14.4%	ColE1-derived recombination site that helps to maintain plasmids as monomers	6081	612 2	41	1	9282
barcode1 0	mobB	swisspr ot	66.7%	41.9%	MOBB1_ECOLX - Also known as C. Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. This protein is essential to promote the specific transfer of the plasmid in the presence of conjugative plasmids. From Escherichia coli.	3257	344 3	186	1	9282
barcode0 7	CloDF13 ori	snapgen e	98.1%	58.5%	Plasmids containing the CloDF13 (CDF) origin of replication can be propagated in E. coli cells that contain additional plasmids with compatible origins.	3320	375 1	432	1	8263
barcode0 7	rop	swisspr ot	61.0%	93.7%	ROP_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Regulates plasmid DNA replication by modulating the initiation of transcription of the primer RNA precursor. Processing of the precursor of the primer, RNAII, is inhibited by hydrogen bonding of RNAII to its complementary sequence in RNAI. ROP increases the affinity of RNAI for RNAII and thus decreases the rate of replication initiation events. From Escherichia coli.	7790	796 7	177	-1	8263
barcode0 7	D	swisspr ot	81.8%	99.3%	RPI_ECOLX - Also known as rpi. Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. From Escherichia coli.	7009	743 8	429	-1	8263
barcode0 7	mobA	swisspr ot	72.2%	47.6%	MOBA1_ECOLX - Also known as B. Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. This protein is essential to promote the specific transfer of the plasmid in the presence of conjugative plasmids. From Escherichia coli.	5054	581 0	756	1	8263
barcode0 7	mobB	swisspr ot	55.9%	41.9%	MOBB1_ECOLX - Also known as C. Protein predicted: Swiss-Prot protein existence level 4. This protein is essential to promote the specific transfer of the plasmid	6491	667 7	186	1	8263

					in the presence of conjugative plasmids. From Escherichia coli.					
barcode0 7	p15A ori	snapgen e	97.2%	6.6%	Plasmids containing the medium-copy- number p15A origin of replication can be propagated in E. coli cells that contain a second plasmid with the ColE1 origin.	3124	316 0	36	1	8263
barcode1 1	p15A ori	snapgen e	97.9%	43.2%	Plasmids containing the medium-copy- number p15A origin of replication can be propagated in E. coli cells that contain a second plasmid with the ColE1 origin.	7431	766 6	236	-1	7666
barcode1 1	rop	swisspr ot	65.5%	87.3%	ROP_ECOLX - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Regulates plasmid DNA replication by modulating the initiation of transcription of the primer RNA precursor. Processing of the precursor of the primer, RNAII, is inhibited by hydrogen bonding of RNAII to its complementary sequence in RNAI. ROP increases the affinity of RNAI for RNAII and thus decreases the rate of replication initiation events. From Escherichia coli.	7086	725	165	-1	7666
barcode1 1	RNAI	Rfam	100.0%	98.0%	Accession: RF00106 - RNAI	164	264	100	1	7666
barcode1 1	oriT	snapgen e	100.0%	5.8%	origin of transfer for the bacterial F plasmid (Frost et al., 1994)	6520	653 7	17	-1	7666
barcode0 1	vapB2	swisspr ot	51.9%	65.4%	VAPB2_RICFE - Experimental evidence at protein level: Swiss-Prot protein existence level 1. Antitoxin component of a type II toxin-antitoxin (TA) system. Upon expression in E.coli or S.cerevisiae neutralizes the effect of cognate toxin VapC2, partially inhibits the RNase activity of VapC2. From Rickettsia felis (strain ATCC VR-1525 / URRWXCal2) (Rickettsia azadi).	4121	427 4	153	-1	9695

Anexo 7. Caracterización de cada plásmido EPI2ME



Anexo 8. Anotaciones plásmidos en plataforma Galaxy, análisis con Proka.

Se ha generado una tabla con las proteínas identificadas empleando la herramienta Prokka lo que puede ser revisado en el siguiente link, al igual que los Fasta obtenidos: https://drive.google.com/drive/folders/1TJIoF3fhJslzEAPeHaPlpiIR3d4vikFl?usp=sharing

Anexo 9. Representación gráfica de las anotaciones con Proka, se emplea la herramienta Circos.

Plásmidos AMR 2024, Bohórquez, et al.

