

MIKROBIOLOGIA ETA OSASUNA UNIBERTSITATE MASTERRA / MASTER  
UNIVERSITARIO EN MICROBIOLOGÍA Y SALUD

Master Amaierako Lana / Trabajo Fin de Máster

**Identificación, detección de genes de  
resistencia de betalactamasas y tipado  
molecular de *Klebsiella pneumoniae* a partir de  
hemocultivo mediante secuenciación masiva**

Egilea/Autor:

Juan Carlos Forero Niampira

Zuzendaria/Director/a:

Matxalen Vidal García

Mikel Urrutikoetxea Gutiérrez

Data/Fecha

Septiembre de 2022

## Índice

<b>1. Resumen</b> .....	6
<b>1 Introducción</b> .....	8
<b>2 Objetivos</b> .....	11
<b>3 Materiales y métodos</b> .....	11
3.1 Muestras.....	11
3.2 Extracción de ADN .....	12
3.3 Purificación del ADN extraído de hemocultivo .....	13
3.4 Preparación de librería y secuenciación .....	13
3.5 Análisis de secuencias crudas (raw data).....	14
3.6 Obtención de secuencias consenso .....	14
3.7 Análisis de secuencia consenso en bases de datos.....	15
<b>4 Resultados y discusión</b> .....	17
4.1 Calidad del ADN extraído y de la secuenciación. ....	17
4.2 Identificación de especie y detección de betalactamasas a partir de secuencias crudas (raw sequences). ....	20
4.3 Identificación de ST y genes de resistencia a partir de ensamblaje de genoma completo.....	23
<b>5 Conclusiones</b> .....	27
<b>6 Bibliografía</b> .....	29

## Índice de figuras

Figura 1. Nanoporo sintético y secuenciación en MinION (Fuente Nanopore Oxford Technologies, disponible en <https://nanoporetech.com/how-it-works> consultado en Junio de 2022)..... 9

Figura 2. Flujo de trabajo de preparación de muestras, secuenciación, análisis bioinformático para el ensamblaje de secuencias crudas y obtención de secuencia consenso. .... 16

Figura 3. Reporte de lecturas realizadas, poros disponibles en hemocultivo sin realizar una segunda purificación de ADN. .... 18

## Índice tablas.

Tabla 1. Cultivo, concentración y número de lecturas obtenido de las muestras analizadas. .... 18

Tabla 2. Asignación taxonómica de lecturas obtenidas de la secuenciación por el programa WIMP de EPI2ME. .... 21

Tabla 3 Análisis de genes de resistencia realizado en el programa EPI2ME con AMR CARD. .... 24

## 1. Resumen

Las bacteriemias (presencia de bacterias en sangre), son infecciones graves con una importante tasa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial generando grandes costos a los sistemas de salud. En este tipo de infecciones el tiempo para obtener un diagnóstico etiológico constituye un elemento fundamental, de igual forma una correcta detección de los genes de resistencia frente a antimicrobianos, favorecen un adecuado tratamiento en los pacientes. La tecnología de secuenciación de genoma completo (WGS) en tiempo real ofrecida por Oxford Nanopore Technologies (ONT), ha demostrado una gran utilidad en la secuenciación de ADN en muestras clínicas, nuestro objetivo en este estudio fue identificar las especies y los genes de resistencia de betalactamasas presentes en hemocultivos mediante WGS usando la tecnología del MinION (ONT). Los resultados obtenidos muestran que la identificación de especie se pudo realizar en menos de una hora con Epi2ME y para el caso de las secuencias consenso en tan solo 6 horas se puede tener la identificación de especie, genes de resistencia y el secuenciotipo de las bacterias analizadas y que este análisis es más fiable si se lleva a cabo un proceso de ensamblado del genoma que si se analizan las secuencias a tiempo real. En la mayoría de las ocasiones, los resultados obtenidos a las 3 horas fueron igualmente correctos, por lo que se trata de una tecnología prometedora que cambiara la forma de trabajar los hemocultivos en los próximos años

## Abstract

Bacteraemia (presence of bacteria in the blood) is a serious infection with a significant morbidity and mortality rate worldwide, leading high costs for health systems. In this type of infections, the time to obtain an aetiological diagnosis is essential, as well as a correct detection of antimicrobial resistance genes, enhancing an adequate treatment of patients. Real-time whole genome sequencing (WGS) technology offered by Oxford Nanopore Technologies (ONT) has proven to be very useful for DNA sequencing in clinical samples. Our objective was to identify the species and resistance genes of betalactamases in blood cultures by WGS through MinION (ONT) technology. The

results obtained show that species identification could be performed in around one hour with Epi2ME and in the case of consensus sequences in only 6 hours it is possible to obtain the species identification, resistance genes and ST. This analysis is more reliable if a genome assembly process is carried out than if the sequences are analysed in real time. In most cases, the results obtained after 3 hours were equally correct, so this is a promising technology that will change the way blood cultures are processed in the coming years.

## 1 Introducción

La presencia de bacterias en la sangre y en particular las sepsis son una importante causa de morbilidad y mortalidad. Se estima una tasa de mortalidad hasta del 50% a nivel mundial que puede variar en función de varios parámetros como el microorganismo causante, su resistencia a antibióticos y el tiempo hasta instaurar un tratamiento adecuado (Alberto et al., 2017; Fleischmann et al., 2016; Vincent et al., 2014). Para el buen pronóstico de este tipo de infecciones es necesario instaurar de forma precoz un tratamiento empírico adecuado, teniendo el fracaso terapéutico un profundo impacto negativo en la evolución del paciente y contribuyendo, además, al desarrollo de resistencias que limiten aún más las posibilidades terapéuticas (Chen et al., 2019; Sweeney et al., 2019).

Como consecuencia del uso inadecuado de determinados antibióticos, la resistencia adquirida por parte de diferentes especies bacterianas ha aumentado en los últimos años, siendo esta una de las razones por las cuales la Organización Mundial de la Salud publicó en el año 2017 una lista de patógenos prioritarios ya que existen limitadas opciones terapéuticas para su tratamiento, lo que supone un alto peligro para la salud humana, ya que pueden estar presentes en ambientes hospitalarios, residencias de ancianos, etc.

Dentro de estas bacterias se encuentran algunas enterobacterias como *Klebsiella pneumoniae*, cuya importancia clínica en los últimos años ha aumentado debido a la proliferación de clones de alto riesgo asociados a resistencia antibiótica. En concreto, el secuencio tipo (ST) 307 se asocia a la carbapenemasa de clase D (OXA-48) y el ST512, se asocia a la carbapenemasa de clase A (KPC) (Cañada-García et al., 2022). Estos microorganismos son una amenaza tanto individual como a nivel de salud pública ya que los carbapenems (inactivos frente a estas bacterias), son el último recurso para el tratamiento de infecciones de bacterias patógenas multirresistentes (Laws et al., 2019; Taxt et al., 2020; Xu et al., 2017). Por ello, es importante realizar tanto la identificación de especies como caracterizar los mecanismos de resistencia y el tipado molecular, para la vigilancia de los clones de alto riesgo presentes en los hospitales con el fin de evitar su propagación.

A pesar de que en los últimos años las técnicas de identificación de especies y de detección de resistencia frente a antibióticos en han mejorado notablemente, el tiempo requerido por métodos convencionales puede variar entre 48 y 72 horas. Por lo cual, un menor tiempo en el diagnóstico es fundamental, ya que en pacientes con bacteriemia se ha observado que, por cada hora que pasa sin un tratamiento disminuye la supervivencia en un 7,6%, o bien puede conducir a que la infección persista por periodos de tiempo más prolongados (Pulido et al., 2013). Afortunadamente, en la última década la espectrometría de masas ((MALDI-TOF MS) por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry) ha revolucionado el tiempo que se tarda en identificar la bacteria causante de la infección, reduciendolo a menos de una hora a partir de hemocultivo positivo (Alizadeh et al., 2021; Yoon & Jeong, 2021).

Además de una identificación precoz, para el correcto tratamiento de los pacientes sépticos es necesario reducir el tiempo empleado para emitir el antibiograma. Son muchos los trabajos que avalan la realización del antibiograma a partir de hemocultivo directo, reduciendo un día el tiempo necesario para obtenerlo, tanto automatizados como manual (antibiograma) (Åkerlund et al., 2020; EUCAST, 2022). Existen otros métodos para reducir el tiempo de identificación y detección de genes de resistencia en muestras de hemocultivo. La mayoría se basan en métodos moleculares rápidos que permiten la identificación de los microorganismos más frecuentemente causantes de sepsis y de los genes de resistencia más relevantes en aproximadamente una hora; algunos ejemplos son: GenXpert, Biofire Filmarray, Revogene Carba C (Jacobs et al., 2021; She & Bender, 2019).

Una de las tecnologías emergentes en microbiología y que va a suponer una nueva revolución es la secuenciación de genoma completo (WGS, por sus siglas en inglés Whole Genome Sequencing). Esta tecnología ha llegado a los Laboratorios de Microbiología impulsada por la pandemia de SARS-CoV-2 y ha facilitado su implementación en otros ámbitos como la bacteriología, ya que permite realizar estudios de microbiota, detección de bacterias no cultivables en medios convencionales o caracterizar todo el genoma de una bacteria (Filkins et al., 2020; Lemon et al., 2017). Las plataformas de secuenciación que más se han generalizado

son Illumina, Ion Torrent y Oxford Nanopore Technologies (ONT), siendo este último uno de los más prometedores ya que cuenta con un sistema que permite analizar y visualizar las secuenciaciones en tiempo real y que realiza lecturas de fragmentos largos (promedio 10kb) (Jain et al., 2016). Además, es un sistema compacto, portátil y con un software para análisis bioinformático accesible para usuarios medios. El fundamento de secuenciación del MinION, es la medición de un cambio de corriente iónica existente en un nanoporo sintético cuando una molécula de ADN pasa a través del mismo. Estos cambios de potencial eléctrico son procesados por un software llamado *basecaller*, que posteriormente generan los archivos de lectura (raw data) en formato .fastq, (Figura 1) (Wick et al., 2019). Gracias a este proceso y a la plataforma de análisis EPI2ME de ONT se pueden obtener resultados de forma rápida ya que el análisis de secuencias, se puede realizar a partir de las lecturas conseguidas durante las primeras horas o incluso minutos (Rang et al., 2018). De hecho, algunos autores han demostrado identificar microorganismos de forma fiable en un tiempo tan breve como 10 minutos (Avershina et al., 2022).

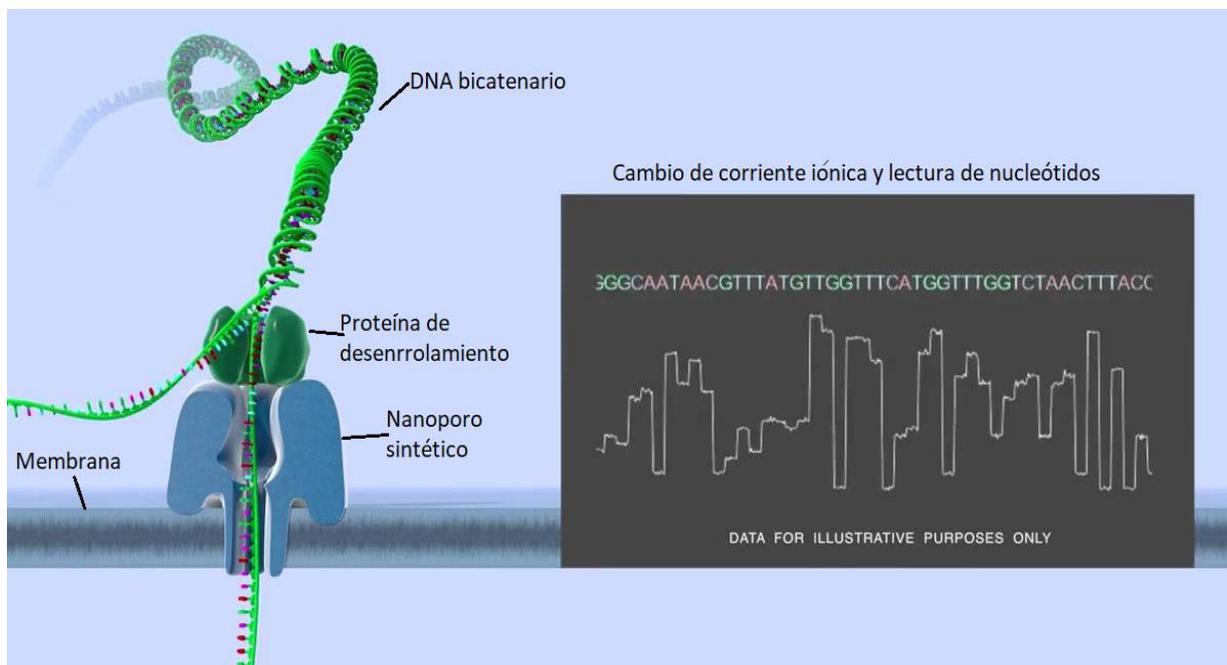


Figura 1. Nanoporo sintético y secuenciación en MinION (Fuente Nanopore Oxford Technologies, disponible en <https://nanoporetech.com/how-it-works> consultado en Junio de 2022)

A diferencia de las pruebas disponibles hasta ahora en los Laboratorios de Microbiología, la WGS permite identificar el microorganismo causal de la infección, sus genes de resistencia, de virulencia y realizar el tipado molecular en un solo equipo. Con los secuenciadores como Illumina, este proceso tarda más de un día, ya que hay que esperar que toda la secuenciación acabe para poder analizar las lecturas. Ya que actualmente este equipo está disponible en el Hospital Universitario Basurto (HUB) para secuenciación de SARS-COV-2, con este trabajo se ha buscado llevar a cabo una prueba de concepto de la utilización de la WGS en el equipo MinION para la identificación, detección de genes de resistencia de betalactamasas y tipado molecular de aislados de *Klebsiella pneumoniae* a partir de hemocultivo.

## **2 Objetivos**

- Evaluar la validez de un método de extracción y purificación de ADN a partir de hemocultivo para la preparación de librerías y posterior secuenciación masiva en MinION (ONT).
- Comparar la capacidad de identificación, detección de genes de resistencia de betalactamasas y de tipado molecular analizando las secuencias obtenidas a tiempo real del secuenciador y tras obtener una secuencia consenso.
- Analizar la capacidad de identificación de microorganismos, genes de resistencia y tipado molecular a diferentes horas tras el inicio de la secuenciación.

## **3 Materiales y métodos**

### **3.1 Muestras**

Se utilizaron 11 aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas obtenidos en el HUB. La identificación de todos los aislados se llevó a cabo por MALDI-TOF MS y la detección de mecanismos de resistencia por métodos fenotípicos (discos con inhibidores, inmunocromatografía, etc). Además, tres aislados habían sido caracterizados por Illumina. Estos aislados se secuenciaron a partir de

subcultivo en placa, para comprobar que los resultados obtenidos eran los mismos que los secuenciados por MinION. Una vez comprobado, se procedió a inocular las cepas en hemocultivos y su preparación se realizó de la siguiente manera:

Los aislados habían sido conservados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en glicerina y se realizó un subcultivo a placa de agar chocolate (Becton Dickinson (BD), USA) que se incubó 18 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Tras el crecimiento de la colonia, se hizo una suspensión bacteriana en  $400\ \mu\text{l}$  de agua destilada y se procedió a la extracción de ADN, en el caso de los aislados analizados de subcultivo.

Para los aislados inoculados en hemocultivo se preparó una suspensión bacteriana 0.5 McFarland con uno de los subcultivos en agar chocolate y se añadieron  $100\ \mu\text{l}$  en 5 ml de sangre de donante sano anónimo. Posteriormente se transfirió este volumen de sangre al medio de hemocultivo BD Bactec Lytic/10 Anaerobic/F. Se incubaron en el equipo BD BACTEC FX hasta que el equipo los confirmó como positivos. Posteriormente, se tomó un volumen de 2 ml de sangre y se procedió a realizar una doble centrifugación a 13.000 rpm durante 2 minutos para obtener un pellet bacteriano que se resuspendió en  $400\ \mu\text{l}$  de agua para su posterior extracción de ADN.

### **3.2 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó con el equipo MagnaPure Compact (Roche, Suiza) empleando el kit Nucleic Acid isolation Kit I según el protocolo DNA Blood 100\_400 V3.2. El volumen inicial era  $400\ \mu\text{l}$  y el volumen de eluido era de  $100\ \mu\text{l}$ . Para determinar la concentración de ADN se utilizó el equipo Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen, USA), empleando el kit de ensayo dsDNA HS (ThermoFisher Scientific, USA) y para determinar el grado de pureza se utilizó el equipo NanodropOne (ThermoFisher Scientific). Se consideraron aceptables para la secuenciación masiva aquellos eluidos con un cociente A260/A280 entre 1.8 y 2.0, y cociente A260/A230 entre 2.0 y 2.2 según las recomendaciones establecidas para la secuenciación con MinION (Oxford Nanopore Technologies, 2022).

### **3.3 Purificación del ADN extraído de hemocultivo**

Posteriormente, en los casos de extracción desde hemocultivo se procedió a realizar una purificación adicional de ADN con NEBNext sample purification beads (New England BioLabs), siguiendo el siguiente protocolo:

- Se mezclaron 50  $\mu$ L de eluido de ADN y 50  $\mu$ L de NEBNext sample purification beads.
- La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Posteriormente el tubo con la mezcla se llevó a un soporte magnético durante 5 minutos hasta obtener un pellet.
- Sin retirar el tubo del soporte, se desechó el sobrenadante y se realizaron dos lavados de 30 segundos con alcohol al 80%.
- Se retiró todo volumen de alcohol del tubo, sin dejar rastros de líquido y se dejó secar durante 5 minutos.
- Se retiró el tubo del soporte y se añadieron 50  $\mu$ L de agua libre de nucleasas, mezclando por pipeteo hasta que el pellet estuviera disuelto y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Se llevó el tubo al soporte magnético para separar las esferas del eluido durante 5 minutos.
- Se transfirió el sobrenadante con el ADN a otro tubo para su posterior uso.

### **3.4 Preparación de librería y secuenciación**

La preparación de la librería se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante para el Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004) en su versión para Flongle FLO-101:

- Se ajustó la concentración de ADN del eluido para procesar 400 ng en 7.5  $\mu$ L de volumen.
- Se añadieron 2.5  $\mu$ L de fragmentasa.
- Se incubó durante 1 min a 30°C y 1 min a 80°C.
- Se añadió 1  $\mu$ L del Rapid Adapter.
- Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente.
- Finalmente, se procedió a cargar 5  $\mu$ L de librería en el secuenciador.

El experimento de secuenciación se realizó durante 24 horas mediante el programa High Accuracy Basecalling en el MinION.

### **3.5 Análisis de secuencias crudas (raw data)**

Una vez la secuenciación fue iniciada, se llevó a cabo el proceso de adquisición de datos y el proceso de basecalling, con el software MinKNOW. Dado que las secuencias se procesan a tiempo real, se obtuvieron lecturas a las 1, 3, 6, 12 y 24 horas de inicio de la secuenciación. Estas lecturas se obtienen en formato .fastq, se denominan secuencias crudas (raw sequences), y pueden ser analizadas en el programa EPI2ME Agent versión 3.4.2 (<https://epi2me.nanoporetech.com/user>) de ONT sin ninguna modificación. El programa EPI2ME, tiene diferentes protocolos de análisis en función de lo que se quiere estudiar. En nuestro caso, se empleó el protocolo *Fastq Antimicrobial Resistance* versión 2022.08.16-150679, que permite la identificación y cuantificación de especies (WIMP (What's in my pot)), así como la detección de genes de resistencia antimicrobiana comparando las secuencias con la base de datos Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)

### **3.6 Obtención de secuencias consenso**

A partir de los archivos .fastq obtenidos del secuenciador se utilizó el programa Epi2MeLabs, protocolo *Assembly tutorial*, para ensamblar las secuencias mediante el software Flye (Kolmogorov et al., 2019) y se corrigieron mediante el algoritmo Medaka las secuencias consenso a partir de los datos de secuenciación de nanoporos en formato .fasta (Oxford Nanopore Technologies, 2018, consultado en mayo de 2022 disponible en: <https://github.com/nanoporetech/medaka>).

Finalmente, a partir de la secuencia consenso obtenida, se generó el archivo SAM Secuencia de Alineamiento/Mapeo (SAM) empleando el programa EPI2ME Labs protocolo *Introduction to SAM to BAM files*. Este archivo permite evaluar la profundidad de cobertura, es decir, el número de veces que cada base de un genoma secuenciado tiene una lectura que alinea en esa posición (cuya unidad se representa por el número de alineamientos seguido por la letra "X") (Hernández et al., 2020; Zhang, 2016)

### 3.7 Análisis de secuencia consenso en bases de datos

Utilizando las secuencias consenso obtenidas, se realizó un análisis en diferentes bases de datos como:

- Mlstfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>): es una herramienta que alberga datos de secuencias alélicas, para la tipificación molecular a partir de genomas ensamblados o de un conjunto de lecturas.
- Pathogen Watch (<https://pathogen.watch/>): permite realizar el procesamiento y visualización de secuencias de genomas bacterianos en un contexto filogenético y geográfico. Permite realizar una predicción de especies bacterianas de forma rápida y de genotipos resistentes de bacterias a partir de ensamblajes de genomas.
- Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>): es una herramienta de libre acceso para la identificación de genes de resistencia y predicción de fenotipos a partir de datos obtenidos de secuenciación masiva,
- CARD (<https://card.mcmaster.ca/>): es una base de datos que permite realizar la descripción de genes de resistencia, proteínas asociadas y literatura sobre la resistencia a los antibióticos a partir de secuencias o genomas ensamblados.

Para identificar la especie, ST y los diferentes genes de resistencia, solo se tuvieron en cuenta los alineamientos con un 100% de similitud. Los genes de resistencia antimicrobianos identificados en las bases de datos fueron comprobados teniendo en cuenta la cobertura y profundidad de las lecturas, con los archivos .sam. El diagrama de flujo de trabajo se observa en la Figura 2.



## **4 Resultados y discusión**

### **4.1 Calidad del ADN extraído y de la secuenciación.**

En nuestro estudio se buscó realizar una prueba de concepto para evaluar la aplicación de WGS con MinION de ONT empleando una Flongle en el procesamiento de hemocultivos positivos, realizando la extracción de ADN bacteriano mediante el uso del MagnaPure Compact, usado para el procesamiento rutinario de muestras clínicas en el HUB. Para lo cual se realizó la extracción de ADN de 3 cepas provenientes de subcultivo previamente secuenciadas con Illumina, y 9 cepas inoculadas en hemocultivo (una de ellas secuenciadas con Illumina y ocho no secuenciadas previamente).

La concentración de ADN obtenida de las muestras en subcultivo fue de 44 a 112 ng/μl, resultado similar al de las muestras inoculadas en hemocultivos que tuvieron de 84 a 118 ng/μl, por lo tanto, no hubo una notable diferencia en la concentración entre los dos tipos de muestras secuenciadas. Estos rendimientos fueron similares a los descritos en otros estudios para secuenciación con MinION a partir de hemocultivos aunque se empleaban otros kits comerciales de extracción, como el BiOstic Bacteremia DNA kit (Zhou et al., 2021), o el kit TIANamp Bacteria DNA, con concentraciones entre 31 y 60 ng/μl y 17 ng/μl respectivamente. En este último caso, era necesario un pretratamiento de lisis enzimática o lisis mecánica, lo que aumenta el tiempo de extracción de ADN hasta tres horas (Taxt et al., 2020; Zhou et al., 2021). En nuestro caso el MagnaPure Compact realizó este proceso en 30 minutos y la purificación adicional se llevó a cabo en aproximadamente 20 minutos. Las concentraciones de ADN obtenidas fueron suficientes para realizar WGS sin necesidad de realizar procedimientos adicionales como PCR para aumentar el rendimiento de las librerías (Grumaz et al., 2020), lo cual se traduce en una disminución de tiempo necesario para la preparación de las muestras.

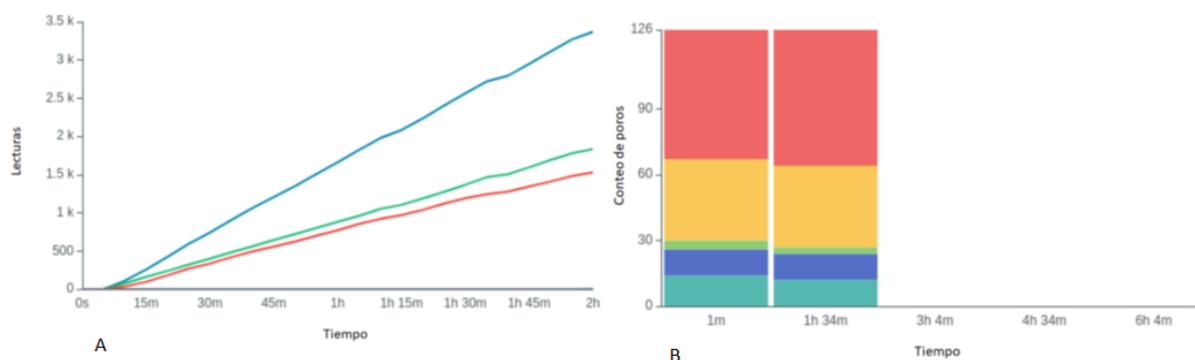
Por otro lado, se observó que la calidad de ADN en subcultivo se encontraba en un rango de absorbancia aceptable, mientras que en hemocultivo era necesario una purificación, concretamente para mejorar los parámetros de A260/230 ya que se observaron valores entre 1.80 y 1.90. De esta forma, era posible encontrarse en los

rangos recomendados por Nanopore para realizar una óptima secuenciación (Tabla 1), ya que sin esta purificación se observó en un ensayo previo (datos no incluidos en Tabla 1), que se producían errores de lecturas durante la secuenciación y, por consiguiente, el número de lecturas era muy bajo. Sin dicha purificación el tiempo en el que el secuenciador genera las lecturas fue más corto porque no se llegó a completar las 24 horas de duración, debido a la obstrucción de los poros (Figura 3).

Tabla 1. Resumen de datos obtenidos de extracción de ADN y secuenciación de las muestras analizadas.

Tipo de muestra	Muestra	Concentración DNA (ng/μl)	Previo a purificar		Trás purificar		Número de lecturas	Número de poros	Cobertura de profundidad media (X)
			A260/A280	A260/A230	A260/A280	A260/A230			
Subcultivo	1	44	2,01	1,95	—	—	229591	61	150
	2	112	1,90	1,91	—	—	10549	54	28
	3a	55,4	1,98	2,09	—	—	123969	97	138
Hemocultivo	3b	99,8	2,16	2,20	2,10	2,03	10350	93	5
	4	90,4	2,12	2,13	2,01	2,12	100350	62	63
	5	118	2,03	1,91	1,99	2,08	150960	61	74
	6	114	2,12	2,03	2,03	2,20	129000	86	111
	7	104	2,02	1,87	2,02	2,04	59800	44	45
	8	100	2,05	1,90	2,04	1,97	150800	31	114
	9	84,6	2,07	2,05	2,11	2,17	66110	61	50
	10	78,4	2,00	1,91	2,10	2,21	29140	54	29
	11	86,6	2,11	2,04	2,08	2,24	124680	84	98

Figura 3. Reporte de lecturas realizadas, poros disponibles en hemocultivo sin realizar una segunda purificación de ADN. A) Rojo: lecturas erróneas. Verde: lecturas correctas, Azul total de las lecturas; B) Turquesa: poro en funcionamiento; Naranja: en espera/en evaluación; Azul: poro bloqueado; Verde: más de un poro presente en el sensor; Rojo: muy poca corriente pasando en el sensor, poro no viable



La saturación de poros puede deberse a la presencia de inhibidores en la sangre como la hemoglobina, así como la inmunoglobulina G. Se conoce que estos elementos interactúan con los ácidos nucleicos como en el caso de PCR u otros procedimientos moleculares que emplean ADN que ha sido extraído de sangre (Sidstedt et al., 2018). Adicionalmente, se ha descrito que la contaminación con genes humanos reduce la cobertura en las secuencias de genes bacterianos, lo cual influye en los alineamientos y en el proceso de identificación de especie o genes de resistencia (Anson et al., 2018). En nuestros resultados, los rangos de A260-230 inferiores a 2.0 pueden estar relacionados con contaminación de fenoles y carbohidratos que pueden interferir con los componentes de librerías como los adaptadores u otros componentes (Oxford Nanopore Technologies, 2022).

Respecto al número de lecturas obtenidas, en nuestro caso se observó que a partir del subcultivo se obtenían entre 10000 y 230000 lecturas (Tabla 1; muestras 1, 2 y 3a). Por otro lado, el número de lecturas obtenido a partir de los hemocultivos (muestras de la 3b a la 11) tuvieron un comportamiento similar a las obtenidas en placa, con lecturas entre 10000 y 150000. Particularmente, las muestras 2 y 4 provenientes de cultivo en placa y de hemocultivo respectivamente, presentaron un bajo número de lecturas, teniendo en cuenta que la calidad del ADN se encontraba en rangos aceptables, esto podría deberse a problemas relacionados con la manipulación, preparación y carga de las librerías en el secuenciador. El propio fabricante la ficha técnica del Rapid Sequencing Kit (SQK-RAD004), indica que factores como la presencia de burbujas en el momento de realizar la carga del buffer o de la librería, pueden generar saturación o daño de los poros presentes en la Flongle.

Finalmente, cabe resaltar que en este estudio se emplearon Flongles, que cuentan con un máximo de 126 poros y permiten analizar una única muestra en 24 horas. Este es uno de los pocos estudios a la fecha que las utilizan, ya que en la mayoría se han evaluado muestras clínicas de bacteriemias utilizando Flow cells, que cuentan con un mayor número de poros (desde 512 poros) y que permiten secuenciar más de una muestra en 48 horas. Los resultados obtenidos han sido similares a otros estudios que

emplean Flow cells, lo que sugiere que una Flongle sea una la solución más rápida y accesible para pruebas o experimentos más pequeños.

#### **4.2 Identificación de especie y detección de betalactamasas a partir de secuencias crudas (raw sequences).**

En el caso de las cepas secuenciadas a partir de hemocultivos se observó a nivel general que WIMP realizó una asignación entre el 70% al 95% del total de las lecturas para la identificación de especie. Las demás asignaciones (valores entre el 1% al 30%) fueron para la especie *Homo sapiens* (Tabla 2), lo cual demuestra que nuestra metodología permite realizar en una alta proporción, una correcta separación de los componentes y células presentes en la sangre dando como resultado una mayor proporción de ADN bacteriano. Finalmente, cerca del 3% al 5% del porcentaje neto asignado a bacterias, correspondía a otros taxones bacterianos relacionados, con los que posiblemente se comparten genes o secuencias similares. Según Tax y colaboradores (2020), muchas de estas asignaciones de lecturas con bajos porcentajes en la clasificación taxonómica en WIMP, se deben a la búsqueda errónea que realiza el programa en las bases de datos (Kim et al., 2016) o bien cuando se comparten secuencias de genes entre especies (Charalampous, *et al.*, 2019).

En la identificación a nivel de especie realizada con WIMP, se observó que las identificaciones coincidieron con las que se tenían previamente por MALDI-TOF MS, salvo en el caso de las muestras 3 inicialmente identificadas como *Klebsiella pneumoniae* y después de la secuenciación fue clasificada como *Klebsiella quasipneumoniae* (Tabla 2). En todos los casos empleando las secuencias obtenidas de la primera hora fue posible identificar la especie. Existen otros estudios que han informado conseguir la identificación de especie en 30 minutos tras el inicio de la secuenciación empleando entre 300 y 3000 lecturas (Taxt et al., 2020).

La detección de genes de resistencia antimicrobiana usando el programa EPI2ME (CARD), permitió la identificación de betalactamasas en todas las muestras analizadas en este estudio. Los genes de resistencia con mayor prevalencia fueron *bla<sub>OXA-48</sub>* presente en el 66,6% de las muestras, seguido de *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (58,3%), *bla<sub>OXA-1</sub>* (45,6%) y *bla<sub>SHV-28</sub>* (45,6%).

Tabla 2. Asignación taxonómica de lecturas obtenidas de la secuenciación por el programa WIMP de EPI2ME e identificación de especie y ST.

Muestra	Asignación de lecturas (%)	Lecturas asignadas a la especie <i>Klebsiella pneumoniae</i> (%)	Identificación (MALDI-TOF MS)	Identificación WGS
1	99% bacteria 1% <i>Homo sapiens</i> <1% virus <1% archaea	74,18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	98% bacteria 2% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	89,52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
3a	99% bacteria <1% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	95,52	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. quasipneumoniae</i>
3b	70% bacteria 30% <i>Homo sapiens</i> <1 virus	69%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. quasipneumoniae</i>
4	99% bacteria <1% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	86,62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5	99% bacteria <1% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	87,48	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	96% bacteria 3% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	84,62	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7	91% bacteria 9% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	80,46	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	97% bacteria <3% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	89%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
9	94% bacteria <6% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	84,8	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
10	85% bacteria <15% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	70,7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
11	96% bacteria <4% <i>Homo sapiens</i> <1% virus	75%	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

El número de genes encontrados en este caso coincidió con el fenotipo de resistencia previamente caracterizado por métodos convencionales, sin embargo, al tratarse de secuencias crudas que no tienen un proceso de corrección de errores, se generaron alineamientos con otras variantes de genes de betalactamasas por errores de lectura del propio secuenciador.

Esto se observa en todas las muestras evaluadas, por ejemplo, en la muestra 2, la identificación de secuencias relacionadas con betalactamasas del tipo SHV, dio lugar a alineamientos para *bla*<sub>SHV-28</sub> y *bla*<sub>SHV-106</sub>; en la muestra 4, se detectaron varias variantes del tipo OXA (*bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>OXA-162</sub> y *bla*<sub>OXA-244</sub>) y de forma similar ocurre en las muestras 5 y 6 para ambos tipos de genes (Tabla 3 Genes de resistencia identificados frente a betalactámicos con secuencias a tiempo final de, en el programa EPI2ME y con secuencia consenso para diferentes bases de datos.). Por lo cual, es recomendable seleccionar aquellos que cuentan con un mayor número de alineamientos ya que muchos de estos resultados pueden ser erróneos por varios factores como los descritos previamente en el caso de las asignaciones realizadas con EPI2ME (Sakai et al., 2019). La asignación a varios genes de la misma categoría en EPI2ME, pueden tener tasas de error entre el 10% el 20% y ocurre en genes con elevada similitud (Sakai et al., 2019; Taxt et al., 2020) a lo cual se suma que este tipo de asignaciones pueden ser erróneas ya que se pueden incluir regiones flanqueantes de integrones (Schmidt et al., 2017).

Por todo lo anterior, esta herramienta permite dar un perfil básico de genes de resistencia y es recomendable realizar un análisis a partir de secuencias consenso. A pesar de esto, este programa muestra un gran potencial para la detección rápida en los casos de infecciones graves, además, presenta la ventaja de no requerir conocimientos avanzados en bioinformática ni el uso de grandes recursos informáticos facilitando el acceso a más personas.

Como resultado de la comparación y el análisis de las lecturas a diferentes tiempos después de haber iniciado la secuenciación (1, 3, 6, 12 y 24 horas) en EPI2ME, se encontró que, entre mayor número de lecturas, mayor número de genes y alineamientos se tendrían. En la mayoría de los casos a partir de la tercera o sexta hora, se conseguían aproximadamente 30000 lecturas y se lograba identificar los genes que estaban presentes al final de la secuenciación. Sin embargo, en las muestras 2 y 4, que tenían un número bajo de lecturas en estos lapsos de tiempo (aproximadamente 7000), también fue posible identificar los principales genes de resistencia después de 3 horas. Es importante tener en cuenta que en estas muestras

el número de genes identificados fue bajo debido al bajo número de lecturas obtenidas.

#### **4.3 Identificación de ST y genes de resistencia a partir de ensamblaje de genoma completo.**

A partir del proceso de ensamblaje del genoma completo se obtuvieron las secuencias consenso para todas las muestras, incluyendo las muestras 2 y 4, permitiendo su uso para el análisis en las diferentes bases de datos (Pathogenwatch, Resfinder, MlstFinder y CARD).

Como se observa en la Tabla 3, en la evaluación de las secuencias consenso en la base de datos CARD, se redujo la cantidad de genes de resistencia detectados con respecto a la evaluación realizada empleando secuencias crudas con EPI2ME. Esto ocurre de forma notable en las muestras 2, 3a, 3b, 4, 5, y 6, para las variantes de genes OXA, SHV, que son identificados con mayor especificidad obteniendo alineamientos con un 100% de identidad. Esto permitió corroborar que los genes identificados con EPI2ME fueran correctos o no. El proceso de ensamblaje favorece tener una mayor cobertura de las secuencias, así como una corrección de la secuencia obtenida lo cual reduce la asignación errónea a genes de resistencia.

Respecto a los resultados obtenidos en las bases de datos Resfinder y Pathogenwatch se observaron resultados similares en los genes de resistencia identificados con ambas bases de datos como: *bla*<sub>OXA-48</sub> presente en el 66,6% de las muestras analizadas, *bla*<sub>CTX-M-15</sub> en el 58,3%, y *bla*<sub>SHV-28</sub> en el 33,3%. A diferencia de lo que ocurre con estos genes (que se detectaron en todas las bases de datos), se detectaron diferentes variantes de los genes SHV y TEM. Por ejemplo; en la muestra 5 se identifican diferentes variantes de TEM (*bla*<sub>TEM-1</sub> en CARD, *bla*<sub>TEM-1B</sub> en Resfinder, *bla*<sub>TEM-1D</sub> en Pathogenwatch). El análisis de los archivos SAM permitió la identificación como *bla*<sub>TEM-1</sub> ya que se comparó los alineamientos frente a la secuencia molde de los genes obtenidos de las bases de datos.

Tabla 3 Genes de resistencia identificados frente a betalactámicos con secuencias a tiempo final de, en el programa EPI2ME y con secuencia consenso para diferentes bases de datos.

Muestra	ST	Fenotipo de resistencia	EPI2ME	Secuencia consenso		
			CARD secuencias crudas	CARD	ResFinder	Pathogenwatch
1	573	OXA-48 like, CTX-M-15	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>DHA-1</sub>
2	307	KPC	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-106</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC-3</sub>
3a	489	AmpCp	<i>bla</i> <sub>OXA-15</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-161</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>
3b	489	AmpCp	<i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>	<i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-2</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-18</sub>
4	307	CTX-M+ OXA-48 like	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-162</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-244</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-106</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>
5	307	CTX-M+Amp Cp	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-106</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-59</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-106</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1D</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
6	469	CTX-M+ OXA-48 like	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-13</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-70</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
7	422	OXA-48 like	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-1</sub>
8	307	CTX-M+ OXA-48 like	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-4</sub>
9	307	OXA-48 like	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-28</sub>
10	5000	CTX-M+OXA-48 like	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>
11	1640	OXA-48 like	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-11</sub>

Por otro lado, el tiempo necesario para identificar los genes de resistencia y el ST con un 100% de identidad, fue: 6 horas en el 66% de las muestras, 3 horas en el 25% y 12 horas en el 8%. Sin embargo, en algunos casos el tiempo de identificación de genes y ST fue diferente, como la muestras 5, en la cual los genes de resistencia se identificaron a 3 horas y el ST a 6 horas, o bien la muestra 1, donde 3 de 4 genes (*bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>DHA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>) tenían 100% de identidad a las tres horas, y un gen (*bla*<sub>OXA-1</sub>) y el ST se identificaron a la sexta hora. De nuevo, los resultados obtenidos dependen de la calidad de la secuenciación y número de poros activos. En nuestro caso la mayoría de las detecciones se realizaron en el rango de 20000 y 50000 lecturas con profundidad cercana a 20X aproximadamente, como se observa en la Tabla 4.

Tabla 4 Evaluación de tiempo necesario para identificación de ST y genes de resistencia respecto al tiempo final de secuenciación

Muestra	Tiempo (horas)	Lecturas	profundidad	Genes de resistencia con identidad del 100%			
				mlst	card	resfinder	Pathogenwatch
1	3	44000	19				
	6	88400	40				
2	6	8260	13				
3a	3	29882	26				
3b	6	9300	5				
4	6	28288	23				
5	3	30290	17				
	6	54952	33				
6	3	59800	35				
7	6	19980	20				
8	6	48486	41				
9	6	20920	24				
10	12	19636	22				
11	3	22252	21				

identificado

no identificado

Nuestro trabajo difiere en algunos aspectos con respecto a otros estudios publicados, por ejemplo se empleó una Flongle en lugar de Flow cell, se seleccionaron alineamientos con 100% de identidad en lugar de parciales como en el caso de Cao. *et al.*, 2016. Estos autores describieron que para la detección de genes de resistencia en la base de datos Resfinder de una cepa de *K. pneumoniae* secuenciada con MinION, que el número de lecturas necesarias para la identificación de betalactamasas era entre 1200 y 25000 con profundidad de 4X a 7X en un tiempo entre 2 y 10 horas. Sin embargo, el autor señala detecciones erróneas debido a bajos valores de cobertura y de rendimiento en la secuenciación.

Por otro lado, Avershina. *et al.*, en 2022, en *K. pneumoniae*, describe que los archivos recuperados durante las primeras 3 horas eran suficientes para realizar la identificación de genes de resistencia y las primeras secuencias se obtenían con tan solo 3000 a 4000 lecturas. Adicionalmente, resaltan diferencias en los tiempos y la rapidez con la que se generan las lecturas y los archivos para el análisis de diferentes kits empleados con Nanopore, siendo el kit SQK-RBK004 el que demostró un mejor rendimiento en Flow cell tanto en hemocultivos como en aislados puros.

En nuestro caso el kit SQK-RAD004 empleado en Flongle, demostró un buen rendimiento tanto en subcultivos como en hemocultivos, ya que se obtienen valores similares de número de lecturas y calidad en la secuenciación. Respecto a otros estudios, el tiempo necesario para la identificación de genes de resistencia fue mayor, ya que se valoraron genes de resistencia con una identidad del 100%, lo cual requiere una mayor cobertura y número de lecturas.

Pese a que se ha determinado que la secuenciación con ONT puede presentar tasas de error de hasta del 3%, este tipo de secuenciación ofrece ventajas como permitir secuenciar fragmentos más largos de ADN, lo cual facilita y reduce el tiempo para el proceso de ensamblaje. Para mejorar el proceso de ensamblaje y reducir la tasa de errores, ONT ha mejorado su software bioinformático, mediante una optimización en los algoritmos de alineación que favorece el aumento de la profundidad de las secuencias y la producción de una secuencia consenso más fiable (30x a 50x) (Delahaye & Nicolas, 2021).

En cuanto al ST se obtuvo que el único presente en más de una muestra, era el ST307 (presente en 5 de las doce muestras evaluadas). Este ST pertenece a un clon multirresistente que está asociado a la producción de carbapenemasas y ha emergido en varias partes del mundo, siendo actualmente es un clon de alto riesgo (Villa et al., 2017). Particularmente en España, han sido descritos varios brotes asociados a este clon, incluyendo bacteriemias (Oteo-Iglesias et al., 2020). Cabe resaltar que los genes con mayor prevalencia en este estudio ( $bla_{CTX-M-15}$  y  $bla_{OXA-48}$ ) estaban relacionados con el ST307, lo cual adquiere importancia en el aspecto de vigilancia y control al tratarse de una clon de importancia clínica y con aumento de diseminación en Europa.

Este trabajo presenta limitaciones respecto al tipo de muestra empleado ya que se partió de cepas conocidas que fueron inoculadas en hemocultivos, por lo cual no se evaluaron muestras clínicas en las cuales se pueden presentar cultivos mixtos, o con diferentes concentraciones de microorganismos. La sangre empleada era de voluntarios sanos y desconocemos de qué forma la sangre de pacientes con infección (mayor número de neutrófilos, respuesta inmune activada, tratamiento antibiótico) puede afectar a la extracción o WGS. Adicionalmente, en este estudio se han trabajado bajo número de muestras debido al elevado coste que representa realizar WGS. Son necesarios mas estudios para evaluar el rendimiento de la secuenciación masiva aplicada al procesamiento de hemocultivos en la práctica clínica diaria.

## **5 Conclusiones**

En este estudio hemos demostrado la aplicabilidad de una metodología rápida para la extracción y WGS de bacterias en hemocultivos con el secuenciador MinION de ONT, como un método eficiente para la identificación de patógenos y de genes de betalactamasas en muestras sanguíneas.

La identificación a nivel de especie, ST y de genes de resistencia mediante el uso de EPI2ME, presentó mayor inespecificidad en comparación al uso de la secuencia consenso en las bases de datos evaluadas, ya que en todos los casos se observó un mayor valor en la profundidad y cobertura de los alineamientos para varios genes empleando la secuencia consenso. Con lo anterior, se demostró que la secuenciación con MinION, así como el uso de sus herramientas de análisis en EPI2ME y

EPI2MELabs, permite la identificación de mayor información de forma rápida en hemocultivos, y por consiguiente, presenta un gran potencial para su uso en el diagnóstico y tratamiento de infecciones en la sangre. La identificación de especie se pudo realizar en menos de una hora con WIMP y la identificación de genes de resistencia mediante el uso de una secuencia consenso fue posible después de la tercera hora de secuenciación.

## 6 Bibliografía

- Åkerlund, A., Jonasson, E., Matuschek, E., Serrander, L., Sundqvist, M., & Kahlmeter, G. (2020). EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(11), 3230–3238. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa333> .
- Alberto, L., Marshall, A. P., Walker, R., & Aitken, L. M. (2017). Screening for sepsis in general hospitalized patients: a systematic review. *The Journal of Hospital Infection*, 96(4), 305–315. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.05.005> .
- Alizadeh, M., Yousefi, L., Pakdel, F., Ghotaslou, R., Rezaee, M. A., Khodadadi, E., *et al* (2021). MALDI-TOF Mass Spectroscopy Applications in Clinical Microbiology. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 9928238. <https://doi.org/10.1155/2021/9928238> .
- Anson, L. W., Chau, K., Sanderson, N., Hoosdally, S., Bradley, P., Iqbal, Z., *et al.* (2018). DNA extraction from primary liquid blood cultures for bloodstream infection diagnosis using whole genome sequencing. *Journal of Medical Microbiology*, 67(3), 347–357. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000664> .
- Avershina, E., Frye, S. A., Ali, J., Taxy, A. M., & Ahmad, R. (2022). Ultrafast and Cost-Effective Pathogen Identification and Resistance Gene Detection in a Clinical Setting Using Nanopore Flongle Sequencing. *Frontiers in Microbiology*, 13, 822402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.822402> .
- Cañada-García, J. E., Moure, Z., Sola-Campoy, P. J., Delgado-Valverde, M., Cano, M. E., Gijón, D., *et al.* (2022). CARB-ES-19 Multicenter Study of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* From All Spanish Provinces Reveals Interregional Spread of High-Risk Clones Such as ST307/OXA-48 and ST512/KPC-3. *Frontiers in Microbiology*, 13, 918362. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.918362> .
- Cao, M. D., Ganesamoorthy, D., Elliott, A. G., Zhang, H., Cooper, M. A., & Coin, L. J. M. (2016). Streaming algorithms for identification of pathogens and antibiotic resistance potential from real-time MinION(TM) sequencing. *GigaScience*, 5(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13742-016-0137-2> .

- Charalampous, T., Kay, G. L., Richardson, H., Aydin, A., Baldan, R., Jeanes, C., *et al* (2019). Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nature Biotechnology*, 37(7), 783–792. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0156-5> .
- Chen, A. X., Simpson, S. Q., & Pallin, D. J. (2019). Sepsis Guidelines. *The New England Journal of Medicine*, 380(14), 1369–1371. <https://doi.org/10.1056/NEJMc1de1815472> .
- Delahaye, C., & Nicolas, J. (2021). Sequencing DNA with nanopores: Troubles and biases. *PLOS ONE*, 16(10), e0257521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257521> .
- EUCAST. (2022). *EUCAST: Rapid AST in bloodcultures*. [https://www.eucast.org/rapid\\_ast\\_in\\_blood\\_cultures/](https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/), consultado en Junio de 2022.
- Filkins, L. M., Bryson, A. L., Miller, S. A., & Mitchell, S. L. (2020). Navigating Clinical Utilization of Direct-from-Specimen Metagenomic Pathogen Detection: Clinical Applications, Limitations, and Testing Recommendations. *Clinical Chemistry*, 66(11), 1381–1395. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa183> .
- Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N. K. J., Hartog, C. S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., *et al* (2016). Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 193(3), 259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC> .
- Grumaz, C., Hoffmann, A., Vainshtein, Y., Kopp, M., Grumaz, S., Stevens, P., *et al* (2020). Rapid Next-Generation Sequencing-Based Diagnostics of Bacteremia in Septic Patients. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 22(3), 405–418. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.12.006> .
- Hernández, M., Quijada, N. M., Rodríguez-Lázaro, D., & Eiros, J. M. (2020). Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(2), 150–161.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.06.003> .

- Jacobs, M. R., Colson, J. D., & Rhoads, D. D. (2021). Recent advances in rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 21(6), 563–578. <https://doi.org/10.1080/14737159.2021.1924679> .
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akesson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 239. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0> .
- Kim, D., Song, L., Breitwieser, F. P., & Salzberg, S. L. (2016). Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Research*, 26(12), 1721–1729. <https://doi.org/10.1101/gr.210641.116> .
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature Biotechnology*, 37(5), 540–546. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0072-8> .
- Laws, M., Shaaban, A., & Rahman, K. M. (2019). Antibiotic resistance breakers: current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(5), 490–516. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz014> .
- Lemon, J., Khil, P., Frank, K., Dekker, J., & Alexander, M. (2017). Rapid Nanopore Sequencing of Plasmids and Resistance Gene Detection in Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(12), 3530–3543. <https://doi.org/10.1128/JCM.01069-17> .
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. Comunicado de Prensa. <https://www.who.int/es/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> .
- Oteo-Iglesias, J., Pérez-Vázquez, M., Sola Campoy, P., Moure, Z., Sánchez Romero, I., Sánchez Benito, R., *et al* (2020). Emergence of blood infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75(11), 3402–3405. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa301> .

- Oxford Nanopore Technologies. (2018). Medaka, corrección de secuencias suministrado por ONT research. In *Github* (v1.6.0). Oxford Nanopore Technologies. <https://github.com/nanoporetech/medaka> .
- Oxford Nanopore Technologies. (2022). *Community* - Chemistry Technical Document. [https://community.nanoporetech.com/docs/sequence/sequencing\\_software/chemistry-technical-document/v/cthd\\_500\\_v1\\_revae\\_07jul2016](https://community.nanoporetech.com/docs/sequence/sequencing_software/chemistry-technical-document/v/cthd_500_v1_revae_07jul2016) .
- Pulido, M. R., García-Quintanilla, M., Martín-Peña, R., Cisneros, J. M., & McConnell, M. J. (2013). Progress on the development of rapid methods for antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(12), 2710–2717. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt253> .
- Rang, F. J., Kloosterman, W. P., & de Ridder, J. (2018). From squiggle to basepair: computational approaches for improving nanopore sequencing read accuracy. *Genome Biology*, *19*(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1462-9> .
- Sakai, J., Tarumoto, N., Kodana, M., Ashikawa, S., Imai, K., Kawamura, T., *et al.* (2019). An identification protocol for ESBL-producing Gram-negative bacteria bloodstream infections using a MinION nanopore sequencer. *Journal of Medical Microbiology*, *68*(8), 1219–1226. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001024> .
- Schmidt, K., Mwaigwisya, S., Crossman, L. C., Doumith, M., Munroe, D., Pires, C., *et al.* (2017). Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(1), 104–114. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw397> .
- She, R. C., & Bender, J. M. (2019). Advances in Rapid Molecular Blood Culture Diagnostics: Healthcare Impact, Laboratory Implications, and Multiplex Technologies. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, *3*(4), 617–630. <https://doi.org/10.1373/jalm.2018.027409> .
- Sidstedt, M., Hedman, J., Romsos, E. L., Waitara, L., Wadsö, L., Steffen, C. R., *et al.* (2018). Inhibition mechanisms of hemoglobin, immunoglobulin G, and whole blood in digital and real-time PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(10),

2569–2583. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0931-z> .

- Sweeney, T. E., Liesenfeld, O., & May, L. (2019). Diagnosis of bacterial sepsis: why are tests for bacteremia not sufficient?. *Expert review of molecular diagnostics* 19(11), 959–962. <https://doi.org/10.1080/14737159.2019.1660644> .
- Taxt, A. M., Avershina, E., Frye, S. A., Naseer, U., & Ahmad, R. (2020). Rapid identification of pathogens, antibiotic resistance genes and plasmids in blood cultures by nanopore sequencing. *Scientific Reports*, 10(1), 7622. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64616-x> .
- Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., Brisse, S., Passet, V., Bonura, C., *et al.* (2017). Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microbial Genomics*, 3(4), e000110. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000110> .
- Vincent, J.-L., Marshall, J. C., Namendys-Silva, S. A., François, B., Martin-Loeches, I., Lipman, J., *et al.* (2014). Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. *The Lancet. Respiratory Medicine*, 2(5), 380–386. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70061-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70061-X) .
- Wick, R. R., Judd, L. M., & Holt, K. E. (2019). Performance of neural network basecalling tools for Oxford Nanopore sequencing. *Genome Biology*, 20(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1727-y> .
- Xu, L., Sun, X., & Ma, X. (2017). Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0191-3> .
- Yoon, E.-J., & Jeong, S. H. (2021). MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology as a Tool for the Rapid Diagnosis of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Antibiotics*, 10(8), 982. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080982> .
- Zhang, H. (2016). Overview of Sequence Data Formats BT. In E. Mathé & S. Davis (eds.), *Statistical Genomics: Methods and Protocols* (pp. 3–17). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_1) .

Zhou, M., Wu, Y., Kudinha, T., Jia, P., Wang, L., Xu, Y., *et al.* (2021). Comprehensive Pathogen Identification, Antibiotic Resistance, and Virulence Genes Prediction Directly From Simulated Blood Samples and Positive Blood Cultures by Nanopore Metagenomic Sequencing. *Frontiers in Genetics*, (12), 620009. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2021.620009> .