

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección Metagenómica de patógenos causantes de
Enfermedades Febriles en la Población de la Costa Ecuatoriana.**

Lesly Daniela Simbaña Vivanco

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 14 de mayo de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN

DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

Detección Metagenómica de patógenos causantes de Enfermedades Febriles en la Población de la Costa Ecuatoriana.

Lesly Daniela Simbaña Vivanco

Nombre del profesor, Título académico

Gabriel Trueba, PhD

Quito, 14 de mayo de 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Lesly Daniela Simbaña Vivanco

Código: 00137927

Cédula de identidad: 1727247387

Lugar y fecha: Quito, 14 de mayo de 2021

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El diagnóstico correcto de enfermedades febriles representa un problema en la Salud Pública debido a que los métodos de diagnóstico tradicionales empleados solo pueden detectar un patógeno a la vez. Estas enfermedades están dadas por una gran variedad de patógenos y su detección temprana permite el empleo de tratamientos oportunos. Frente a esto, se ha visto como una alternativa de diagnóstico a la metagenómica, que a través del secuenciamiento directo, puede detectar una gran variedad de microorganismos presentes en una muestra. El método de secuenciación que se utilizó es el MinION que permite obtener lecturas más largas y en tiempo real. Mediante esta tecnología se identificó al patógeno principal en un tiempo de corrida de 18 horas en muestras de pacientes febriles de la Costa Ecuatoriana previamente negativos a arbovirus endémicos. El uso de esta tecnología como una nueva prueba de diagnóstico permite resultados en corto tiempo y de manera precisa.

Palabras clave: Enfermedades febriles, metagenómica, MinION, malaria, lecturas, asignación taxonómica.

ABSTRACT

The correct diagnosis of febrile illnesses represents a problem in Public Health since traditional diagnostic methods used can only detect one pathogen at a time. These illnesses are caused by a variety of pathogens and the early detection allows the use of timely treatments. In view of this, it has been seen as a diagnostic alternative to metagenomics, which, through direct sequencing, can detect a lot of microorganisms present in a sample. The sequencing method used is the MinION, which allows to obtain longer and real-time reads. Using this technology, the main pathogen was identified in a running time of 18 hours in samples from febrile patients from the Ecuadorian Coast previously negative for endemic arboviruses. The use of this technology as a new diagnostic test allows results in a short time and accurately.

Key words: Febrile illnesses, metagenomic, MinION, malaria, reads, taxonomic assignment.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción.....	11
Metodología.....	13
Consideraciones Éticas Metodología	13
Colección de muestras de pacientes febriles	13
Extracción de ARN y selección de muestras.....	13
DNAc y Cuantificación	14
Preparación de las librerías genómicas	14
Secuenciamiento Oxford Nanopore MinION y asignación taxonómica.....	15
Mapeo de las lecturas y BLAST	15
Resultados.....	16
Secuenciamiento y asignación taxonómica	16
Mapeo de lecturas y BLAST	17
Discusión	18
Conclusiones.....	21
Tablas	22
Figuras	23
Referencias bibliográficas	25
Anexos.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla # 1: Total de lecturas clasificadas en cada muestra de suero.....	22
--	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura # 1	Krona charts de los organismos presentes en la muestra 24B	23
Figura # 2	Krona charts de los organismos presentes en la muestra 102M	23
Figura # 3	Krona charts de virus patógenos presentes en la muestra 24B	24
Figura # 4	Krona charts de virus patógenos en la muestra 102M	24

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Metadata de los pacientes de donde se extrajo el suero.....	27
Anexo 2: Patógenos representativos causantes de enfermedades febriles y de sintomatología de fiebre presentes en suero.....	28
Anexo 3: Patógenos representativos causantes de enfermedades febriles y de sintomatología de fiebre presentes en suero.....	29

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de enfermedades febriles tropicales presenta varios desafíos debido a la diversidad de microorganismos que producen estas enfermedades. Frente a esto, el análisis metagenómico podría ser una solución atractiva para la vigilancia y diagnóstico de diversos patógenos bacterianos, eucariotas y virales (Greninger et al., 2015). Las enfermedades febriles son un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una elevación de la temperatura corporal a un valor mayor o igual a 38°C en áreas tropicales, que constituyen un motivo de consulta frecuente en Hospitales (Cortés et al., 2017). No existe una clasificación exacta de estas enfermedades febriles, sin embargo, podemos agruparlas según su enfoque sindrómico: por ejemplo: los que producen exantema, hemorragia, problemas respiratorios, ictericia, adenopatías y síntomas inespecíficos. Pero debido a que varias comparten y pueden ser clasificadas en más de una categoría complica aún más diagnóstico (Cortés et al., 2017).

Principalmente en Latinoamérica se han detectado ciertos patógenos que son responsables de enfermedades febriles tales como malaria causado por el parásito *Plasmodium*, virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) donde su prevalencia se debe a las altas temperaturas, humedad y el saneamiento deficiente que permite la proliferación de mosquitos que transmiten estas enfermedades (Forshey et al., 2010). En Ecuador, regularmente se detecta el virus del dengue (DENV), el virus del chikungunya (CHIKV), virus del mayaro (MAYV), virus de la fiebre amarilla (YFV), virus del Zika (ZKV) y virus de Oropuche (OROV) y *Plasmodium* (Wise et al., 2020). Hasta la semana 16 del año 2021, se han reportado 7.810 casos de Dengue, 691 casos de Malaria y por el momento ningún caso de Zika, Chikungunya, Fiebre amarilla y Mayaro (Ministerio de Salud Pública, 2021).

Además, existen patógenos que son frecuentemente ignorados debido a la dificultad en su diagnóstico tales como *Leptospira spp*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella spp*, *Rickettsia spp*,

Hantavirus, *Tripanosoma cruzi*, *Histoplasma spp*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Coccidioides immitis* (Moreira et al., 2018).

La tecnología Oxford MinION Nanopore, es un dispositivo portátil de bajo costo que permite un secuenciamiento directo, obtención de lecturas largas (5 kbp a 10 kbp) y capacidad de análisis en tiempo real con una precisión del 70% a 90% dentro de 24 horas (Ghurye et al., 2016). En esta tecnología se ligan adaptadores a los extremos de los fragmentos de ADN (o ADNc), los cuales facilitan la captura de la hebra de ADN que se desplaza unidireccionalmente por el nanoporo (400 bases por segundo) (Oxford Nanopore Technologies, 2019). Cuando el ADN atraviesa el poro, el sensor detecta cambios en la corriente iónica dado por las diferencias en las secuencias de nucleótidos, luego estas corrientes son interpretadas en un programa computacional (Jain et al., 2016). Esta tecnología puede ser empleada para diagnóstico de patógenos, superando las limitaciones de técnicas tradicionales debido a sus dos ventajas claves: la obtención de lecturas más largas y la capacidad de realizar análisis de secuencias en tiempo real (Breitwieser et al., 2018).

En este proyecto se usó la tecnología MinION para identificar patógenos causantes de enfermedades febriles en muestras de suero humano, negativos a varios de los arbovirus endémicos, en comunidades remotas de la provincia de Esmeraldas.

METODOLOGÍA

Consideraciones Éticas Metodología

Este estudio usó sueros de pacientes febriles de las comunidades en el Norte de la provincia de Esmeraldas. La aprobación ética de todas las muestras fue otorgada por CEISH USFQ (Comité de ética de investigación en seres humanos – USFQ).

Colección de muestras de pacientes febriles

Los sueros de pacientes febriles fueron colectados a partir de una muestra de sangre periférica, fueron almacenados y transportados en nitrógeno líquido hasta el laboratorio de virología del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito para el análisis.

Extracción de ARN y selección de muestras

Se utilizó el kit de extracción de ARN viral QIAvac, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se pipetearon 560 µl del buffer AVL-carrier RNA en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, luego se añadió 140 µl de las muestras, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó, posteriormente se añadió 560 µl de etanol (96 y 100%) y se mezcló con un vortex. Con cuidado se añadió 630 µl de la solución obtenida anteriormente a la columna QIAamp mini, esta se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto, luego se colocó la columna QIAamp en un tubo de 2 ml y se desechó el tubo que contiene el filtrado, este último paso se repitió dos veces. Luego se agregó 500 µl del buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm durante 1 minuto, luego se colocó la columna en otro tubo y se añadió 500 µl del buffer AW2 y se centrifugó a 14.000 rpm durante 3 minutos. Se desechó el tubo que contenía el filtrado y en la columna se añadió 40 µl del buffer AVE y se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto. Se centrifugó a 8000 rpm por un minuto.

DNAc y Cuantificación

Se siguió el protocolo RNA Viral Metagenomic MinION One-Pot Sequencing donde se utilizó el método SISPA (Sequence-Independent Single-Primer Amplification). Se mezcló en un tubo de 0.2 ml: 4 μ l RNA extraído y 1 μ l de Primer A- Sol, luego para el Annealing las condiciones fueron (65°C por 5 minutos y luego 21°C por 5 minutos). Posteriormente, se preparó la reacción donde se utilizó 5 μ l Annealed sample, luego se incubó a 42°C por 1 hora y se prepararon 3 reacciones en total y se obtuvo las siguientes concentraciones: 39.8 μ l de 24B, 53.4 μ l de 102M, 5.32 μ l de 27M, 12.6 μ l de 31SD y 13.6 μ l de 38B.

Preparación de las librerías genómicas

Para la preparación de las librerías genómicas, se usó 2 muestras con concentraciones de ADN superiores a 11 ng/ μ l en el paso de native barcoding. (17.3 ng/ μ l en la muestra 102M y 11.2 ng/ μ l en la muestra 24B). Primero, se verificó la flow cell (Flow Cell Mk I R9 Version) para el secuenciamiento mediante el Software MinKNOW, posteriormente se realizó la preparación de la biblioteca de ADNc MinION utilizando el kit Native barcoding genomic DNA (SQK-LSK109) siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo de PCR se añadió 48 μ l de ADNc, 3.5 μ l NEBNext FFPE DNA Repair Buffer, 3.5 μ l Ultra II End-prep reaction buffer, 3 μ l Ultra II End-prep enzyme mix y 2 μ l de NEBNext FFPE DNA Repair Mix. Luego fueron colocadas en un termociclador a 22°C por 15 minutos y 65°C por 15 minutos, luego incubamos en hielo por 1 minuto.

Para realizar el ligamiento de los barcodes a las muestras se utilizó el kit Native Barcoding NVD 114, siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo de PCR se coloca: 10 μ l de la reacción anteriormente preparada, 2.5 μ l del Native Barcode y 12.5 μ l NEB Blunt /TA Ligase Master Mix. Luego se incubó a 25°C por 10 minutos. Luego colocamos 25 μ l del mix anterior y 25 μ l de beads para la limpieza, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y se lo

coloca en el rack magnético. Se añadió 200 µl de etanol y cuantifica en el fluorómetro Qubit, la cuantificación del pool de barcodes de fue 11.8 ng/ µl. Para el siguiente paso de ligación de adaptadores, en un tubo de PCR se colocó 65 µl del pool de barcodes, 20 µl del NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer, 5 µl Adapter Mix AMX y 10 µl de Quick T4 DNA Ligase, luego se incubó a 22°C por 20 minutos. Finalmente se realizó una segunda limpieza para posteriormente una segunda cuantificación. La cuantificación de adaptadores fue de 5.72 ng/ µl. La biblioteca resultante se cargó en una celda de flujo Oxford MinION junto con los buffers de carga, y se secuenció usando MinKNOW versión 4.05, durante 18 horas.

Secuenciamiento Oxford Nanopore MinION y asignación taxonómica

Los adaptadores y barcodes fueron removidas de la lectura de MinION utilizando Porechop (versión 0.2.4) y la clasificación taxonómica se realizó utilizando la plataforma Kaiju, donde se cargó las secuencias fastq comprimidas en formato .zip y este web server comparó con la base de datos NCBI y mostró las asignaciones taxonómicas a través de un navegador interactivo visual, Krona chart.

Mapeo de las lecturas y BLAST

Se utilizó el programa Minimap2 para el mapeo de lecturas, luego se las extrajo en formato BAM para ser visualizados en el programa Tablet y ser comparados con una secuencia de referencia, por consiguiente, se escogió regiones con un número significativo de lecturas y se realizó BLAST en la base de datos del NCBI.

RESULTADOS

Secuenciamiento y asignación taxonómica

En la Tabla 1 se muestran las lecturas obtenidas del secuenciamiento, la muestra con mayor número de lecturas fue 102M (47%) mientras que la muestra 24B un 39%. Dado que con la opción run mode MEM se obtuvo un mayor porcentaje de clasificación que la opción Greedy, la cual permite mismatches al momento de la asignación taxonómica, se eligió esta opción para ambas muestras en el programa Kaiju.

En la Figura 1 y 2, se muestra los porcentajes de cada organismo presente en el suero con respecto al número de lecturas clasificadas mediante el navegador interactivo, Krona chart. Además, bajo los criterios de: presencia en el suero y causante de enfermedad febril y sintomatología febril se clasificó a los patógenos presentes en la muestra, cabe señalar que la información presentada en el Anexo 1 y 2 está basada en el número de lecturas otorgadas por el programa Kaiju.

Como se muestra en la Figura 1 y 2 los microorganismos más representados tienden a ser similares en ambas muestras, mayormente pertenecen al Dominio Bacteria, seguido por Eucaria.

Nuestro análisis no encontró presencia de arbovirus o virus relacionados a enfermedades febriles; sin embargo, cabe resaltar que dentro de los microorganismos más representativos en ambas muestras se encontró el género *Plasmodium*.

Partiendo de todas estas asignaciones taxonómicas y el número de lecturas, se identificó como patógenos de importancia al género *Plasmodium* (4% para ambas muestras) (Figura 1 y 2) y al virus de Inmunodeficiencia Humana 1 con un 0.005% en la muestra 102M y 0.006% en la muestra 24B (Figura 3) y también al virus Linfotrófico T-1 con un 0.005% en la muestra 102M y 0.003% en la muestra 24B (Figura 4).

Mapeo de lecturas y BLAST

Como paso confirmativo se decidió utilizar programas bioinformáticos tales como Minimap2 y Tablet para la extracción de lecturas más largas y selección de segmentos con lecturas significativas respectivamente y comparar con respecto a un genoma de referencia, el genoma de referencia utilizado fue *Plasmodium falciparum* que se encuentra en la base de datos del NCBI.

Con respecto a la asignación taxonómica de los virus de Inmunodeficiencia Humana 1 y Linfotrófico T-1, estos presentaban pocas lecturas y no se mapeó con ningún genoma de referencia, por tanto, no se confirmó tal asignación.

Por otro lado, se logró mapear al género *Plasmodium* debido a que presentaba un número importante de lecturas y al momento de realizar BLAST, se confirmó la asignación taxonómica dado por Kaiju, sin embargo, no podemos afirmar específicamente las asignaciones de especie como *Plasmodium ovale wallikeri*, *Plasmodium falciparum* Palo Alto/Uganda y *Plasmodium vivax*.

El porcentaje de identidad para la confirmación del género *Plasmodium* fue de 86.51% en la muestra 24B mientras que en la muestra 102M fue de 82.73%.

DISCUSIÓN

Debido a que un gran porcentaje de muestras provenientes de pacientes febriles ecuatorianos son clasificados como fiebres de origen desconocido, el empleo de métodos metagenómicos de detección de patógenos que permita hacer un análisis de múltiples microorganismos en forma simultánea sería ideal (Chiriboga et al., 2015). En este estudio, se analizó el potencial del secuenciamiento metagenómico como herramienta de diagnóstico para pacientes febriles. Para ello, se realizó la asignación taxonómica de cada suero. En la muestra 24B, recolectada en Borbón se obtuvo un 39% de lecturas clasificadas y un total de 89.373 lecturas mientras que para la muestra 102M proveniente de Maldonado un 47% de lecturas clasificadas y 39.511 de lecturas totales (Tabla 1). A pesar que el tiempo de corrida del MinION Secuencing generalmente dura de 24 a 48 horas (Ghurye et al., 2016), la cantidad de tiempo transcurrido para la obtención de las lecturas en este estudio fue de 18 horas, debido a un alto porcentaje de lecturas obtenidas (Tabla 1). Estudios de metagenomas similares empleando esta tecnología muestran que en menos de 6 horas y en tiempo de real es factible el análisis informático con secuenciamiento nanopore (Greninger et al., 2015).

Por otro lado, las enfermedades febriles reportados generalmente en zonas tropicales como Ecuador están asociados a arbovirus como Dengue, Zika, Chikungunya, Fiebre Amarilla, Mayaro, Oropuche, e incluso bacterias como *Leptospira* (Moreira et al., 2018). Sin embargo, al descartar estas opciones, como se lo hizo en este proyecto de investigación previamente, se pudo observar que el patógeno con más lecturas asignadas taxonómicamente fue *Plasmodium* (Figura 1 y 2), un parásito transmitido por el mosquito del género *Anopheles*, donde la forma clásica de manifestación es la fiebre después de 10 a 15 días de la picadura (Jadan-Solis et al., 2019). El último informe mundial de OMS de malaria, el cual fue publicado en diciembre de 2019, se reportó 867.00 casos en el continente americano en el año 2018, en Ecuador las

infecciones principalmente están dadas por *P. falciparum* y *P. vivax* (Ministerio de Salud Pública, 2021).

Específicamente en el territorio ecuatoriano en el año 2019, año en el que fueron colectadas las muestras, el total de casos confirmados de malaria fue 2.081, en el cual la provincia de Esmeraldas presentó 135 casos relacionados a *P. falciparum* y 11 asociados a *P. vivax* (Ministerio de Salud Pública, 2019). Además, la especie de *Plasmodium* que circula mayoritariamente en la costa del Ecuador es *P. falciparum* (Valenzuela et al., 2019).

Actualmente en el año 2021, hasta la semana 16 se han notificado 691 confirmados de malaria, con respecto a la provincia de Esmeraldas se registra 62 casos que representa el 8.97% dentro del territorio (donde 52 casos están relacionados a malaria no complicada por *Plasmodium falciparum*, 1 casos de malaria complicada por *Plasmodium falciparum* y 9 casos de malaria no complicada por *Plasmodium vivax*) (Ministerio de Salud Pública, 2021), confirmando así la prevalencia de este parásito en la población afroecuatoriana.

Por otro lado, la confirmación de las asignaciones taxonómicas con respecto a especie, a través programas bioinformáticos como lo es Tablet, permite corroborar dicha asignación dada por el programa Kaiju en relación a una secuencia de referencia (The James Hutton Institute, 2021). La utilización de este programa, aseguró la asignación del género *Plasmodium* en las muestras con un número de lecturas significativas al momento de alinear ciertos fragmentos respecto a la secuencia de referencia de *Plasmodium* del NCBI, con un 82.73% de porcentaje de identidad en el caso de la muestra 102M y 86.51% con la muestra 24B.

A pesar de que a lo largo de todo el año exista la transmisión de este parásito, se ha visto que durante la estación lluviosa (mayo a junio) en la región costa, se han reportado más casos de esta enfermedad (Krisher et al., 2016), permitiendo confirmar una vez más la prevalencia de

este parásito, ya que las muestras fueron colectadas durante este período: 102M (Maldonado) el 27 de mayo de 2019 mientras que 24B (Borbón) el 26 de junio de 2019 (Anexo 1).

Finalmente, la malaria representa un importante problema de salud pública. A pesar de que Ecuador haya reducido la incidencia de malaria en más del 90%, durante estos años se han reportado un incremento de casos y a pesar de los logros en eliminar esta enfermedad, Ecuador tiene focos de transmisión activos, como es el caso del cantón San Lorenzo igualmente ubicado en la provincia de Esmeraldas con una tasa del 0.22%, donde los servicios de salud y aspectos eco-epidemiológicos influyen en esta incidencia (Mosquera-Romero et al., 2018). Además, el incremento de estos datos principalmente se deba principalmente a la migración regular que existe en las áreas fronterizas entre Colombia y Ecuador, relacionado a actividades de minería y agricultura de aceite de palma donde se encontró un 68.3% de similitud genética con muestras circulantes en Colombia (Vera-Arias et al., 2019).

Los métodos de detección para esta enfermedad, como son la microscopía y el RDT (prueba rápida para malaria) retrasan la eliminación de este parásito debido a que muestran una sensibilidad muy limitada para detectar casos asintomáticos (Sáenz et al., 2015). Por tanto, se presenta a esta tecnología como una buena alternativa más específica.

A futuro se recomienda, el análisis de un mayor número de muestras para comprender mejor este tipo de enfermedades ya que a través del secuenciamiento y la metagenómica se puede obtener una gran cantidad de información en cuanto a variedad de patógenos posibles que se encuentren circulando en poblaciones de riesgo y de esta manera implementar tratamientos efectivos. Igualmente, se utilice muestras recién recolectadas para evitar el degradamiento de material genético.

CONCLUSIONES

En conclusión, la identificación de las secuencias correspondientes al género *Plasmodium* en ambas muestras como causante principal de la enfermedad febril a través del secuenciamiento de tercera generación nanopore permite ser usada como alternativa potencial en lugar de métodos de diagnóstico comúnmente utilizados.

Con respecto al tiempo para la obtención de resultados, el cual es uno de los factores importantes a considerar, en este proyecto de investigación con 18 horas de corrida se observó mayor clasificación de lecturas y por ende una mayor precisión al momento de la asignación taxonómica.

Dado que las enfermedades febriles están asociadas a varios patógenos, el empleo de la tecnología de secuenciamiento para la realización de metagenómica permite realizar un screening general de todos los organismos presentes en una muestra y ser evaluados mediante programas informáticos. Esta es una herramienta de diagnóstico eficaz capaz de reemplazar métodos tradicionales y generar tratamientos específicos frente a enfermedades que amenacen la Salud Pública en poblaciones vulnerables.

TABLAS

Tabla # 1. Total de lecturas clasificadas en cada muestra de suero

Muestra	Flow cell	Porcentaje de lecturas clasificados (%)	Tiempo de corrida (horas)	Lecturas totales
24B	Mk I R9 Version	39	18	89373
102M	Mk I R9 Version	47	18	39511

Esta información fue extraída del programa Kaiju con la base de datos NCBI BLAST *nr + euk*, run mode MEM respecto al número de lecturas.

FIGURAS

Figura # 1 Krona charts de los organismos presentes en la muestra 24B

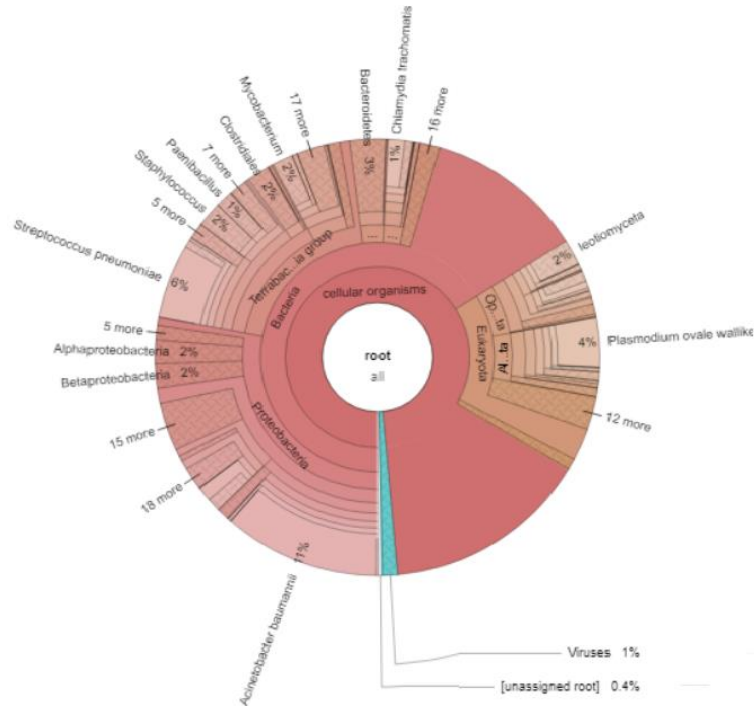


Figura # 2 Krona charts de los organismos presentes en la muestra 102M

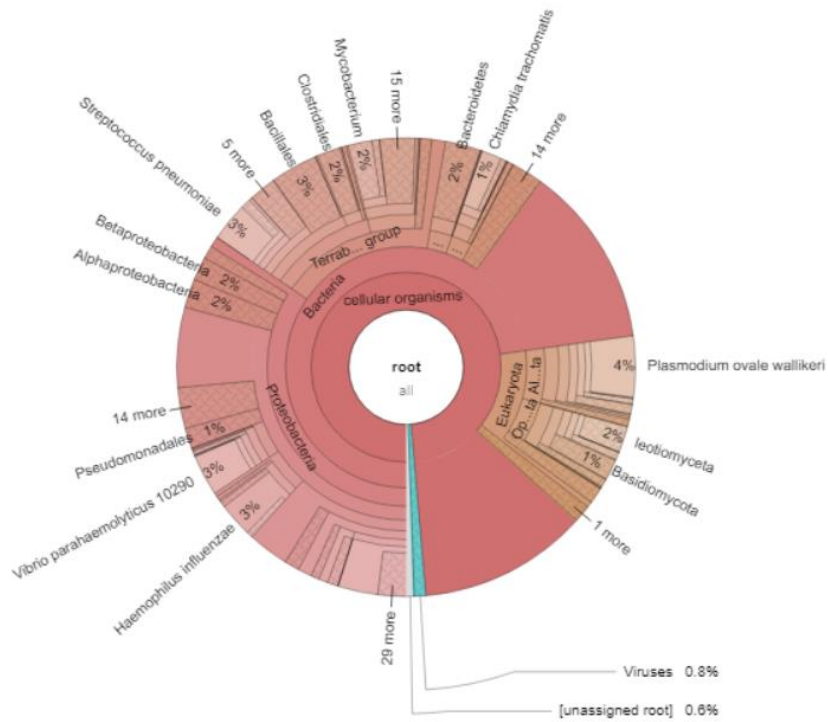


Figura # 3 Krona charts de virus patógenos presentes en la muestra 24B

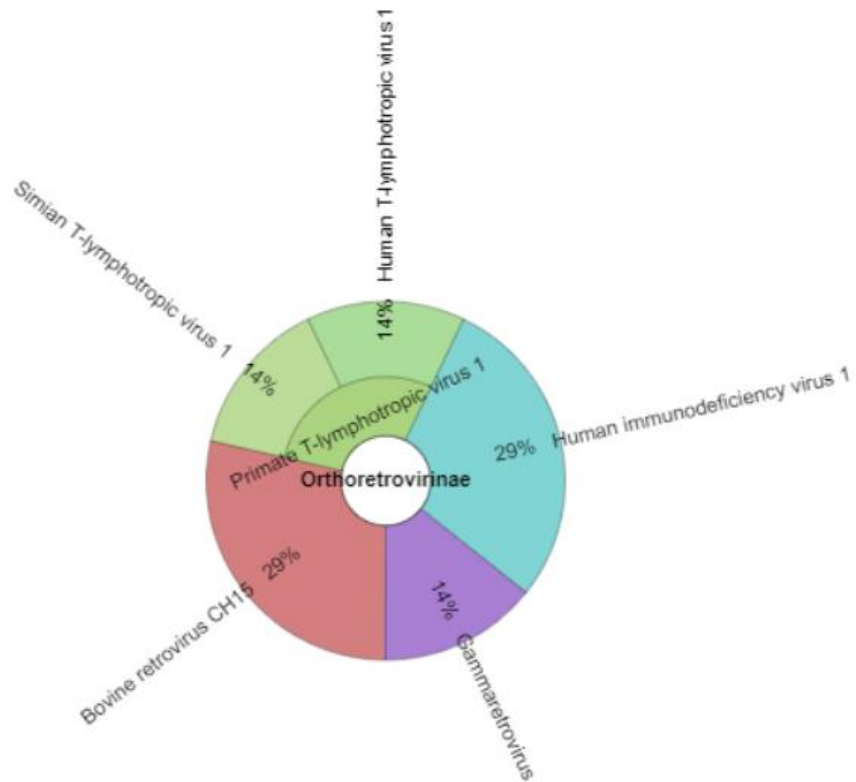
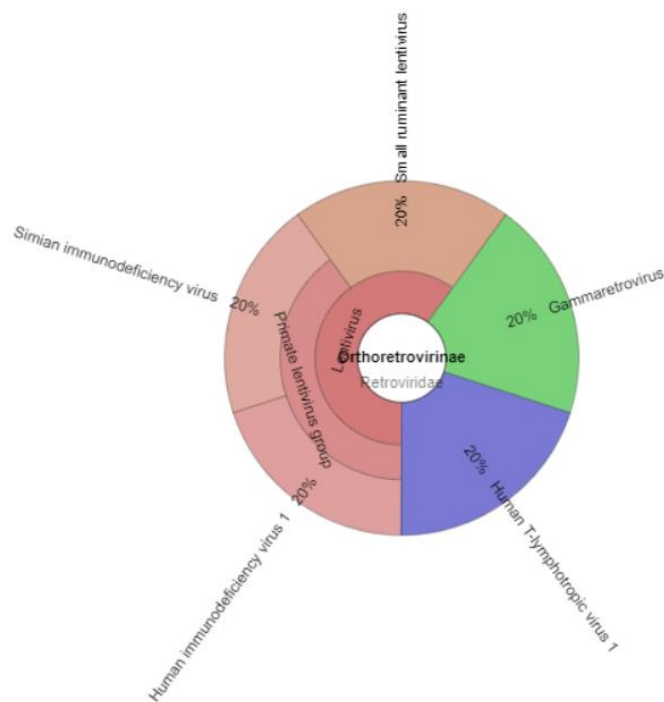


Figura # 4 Krona charts de virus patógenos en la muestra 102M



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Breitwieser, F. P., Lu, J., & Salzberg, S. L. (2018). A review of methods and databases for metagenomic classification and assembly. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1125–1139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx120>
- Chiriboga, J., Barragan, V., Arroyo, G., Sosa, A., Birdsell, D. N., España, K., Mora, A., Espín, E., Mejía, M. E., Morales, M., Pinargote, C., Gonzalez, M., Hartskeerl, R., Keim, P., Bretas, G., Eisenberg, J. N. S., & Trueba, G. (2015). *Chiriboga 2015*. 21(12), 2141–2147.
- Cortés, J. A., Romero-Moreno, L. F., Aguirre-León, C. A., Pinzón-Lozano, L., & Cuervo, S. I. (2017). Enfoque clínico del síndrome febril agudo en Colombia. *Infectio*, 21(1), 39–50. <https://doi.org/10.22354/in.v21i1.640>
- Forshey, B. M., Guevara, C., Laguna-Torres, V. A., Cespedes, M., Vargas, J., Gianella, A., Vallejo, E., Madrid, C., Aguayo, N., Gotuzzo, E., Suarez, V., Morales, A. M., Beingolea, L., Reyes, N., Perez, J., Negrete, M., Rocha, C., Morrison, A. C., Russell, K. L., ... Kochel, T. J. (2010). Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in western south America, 2000-2007. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(8), 2000–2007. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000787>
- Ghurye, J. S., Cepeda-Espinoza, V., & Pop, M. (2016). Metagenomic assembly: Overview, challenges and applications. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(3), 353–362.
- Greninger, A. L., Naccache, S. N., Federman, S., Yu, G., Mbala, P., Bres, V., Stryke, D., Bouquet, J., Somasekar, S., Linnen, J. M., Dodd, R., Mulembakani, P., Schneider, B. S., Muyembe-Tamfum, J. J., Stramer, S. L., & Chiu, C. Y. (2015). Rapid metagenomic identification of viral pathogens in clinical samples by real-time nanopore sequencing analysis. *Genome Medicine*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0220-9>
- Jadan-Solis, K. P., Alban-Meneses, C. de J., Salazar-Carranza, A., Cruz-Fonseca, L. de los Á., Torres-Céspedes, I., & Scrich-Vázquez, A. J. (2019). Caracterización del paludismo como enfermedad endémica en Ecuador. *Revista Archivo Médico de Camagüey*, 23(4), 540–558.
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1103-0>
- Krisher, L. K., Krisher, J., Ambuludi, M., Arichabala, A., Beltrán-Ayala, E., Navarrete, P., Ordoñez, T., Polhemus, M. E., Quintana, F., Rochford, R., Silva, M., Bazo, J., & Stewart-Ibarra, A. M. (2016). Successful malaria elimination in the Ecuador-Peru border region: epidemiology and lessons learned. *Malaria Journal*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12936-016-1630-x>

- Ministerio de Salud Pública. (2019). ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES ECUADOR, SE 1-52/2019. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2020/02/GACETA-VECTORES-SE-52.pdf>
- Ministerio de Salud Pública. (2021). ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR VECTORES ECUADOR, SE 16-2021. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2021/05/Vectores-SE-16.pdf>
- Moreira, J., Bressan, C. S., Brasil, P., & Siqueira, A. M. (2018). Epidemiology of acute febrile illness in Latin America. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(8), 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.001>
- Mosquera-Romero, M., Zuluaga-Idárraga, L., & Tobón-Castaño, A. (2018). Challenges for the diagnosis and treatment of malaria in low transmission settings in San Lorenzo, Esmeraldas, Ecuador. *Malaria Journal*, 17(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12936-018-2591-z>
- Oxford Nanopore Technologies. (2019). *A nanopore is a very small hole*. <https://nanoporetech.com/how-it-works>
- Sáenz, F. E., Morton, L. C., Okoth, S. A., Valenzuela, G., Vera-Arias, C. A., Vélez-Álvarez, E., Lucchi, N. W., Castro, L. E., & Udhayakumar, V. (2015). Clonal population expansion in an outbreak of *Plasmodium falciparum* on the northwest coast of Ecuador. *Malaria Journal*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-1019-2>
- The James Hutton Institute. (2021). Tablet. Recuperado de <https://ics.hutton.ac.uk/tablet/>
- Valenzuela, G., Castro, L. E., Valencia-Zamora, J., Vera-Arias, C. A., Rohrbach, P., & Sáenz, F. E. (2019). Genotypes and phenotypes of resistance in Ecuadorian *Plasmodium falciparum*. *Malaria Journal*, 18(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-3044-z>
- Vera-Arias, C. A., Castro, L. E., Gómez-Obando, J., & Sáenz, F. E. (2019). Diverse origin of *Plasmodium falciparum* in northwest Ecuador. *Malaria Journal*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12936-019-2891-y>
- Wise, E. L., Márquez, S., Mellors, J., Paz, V., Atkinson, B., Gutierrez, B., Zapata, S., Coloma, J., Pybus, O. G., Jackson, S. K., Trueba, G., Fejer, G., Logue, C. H., & Pullan, S. T. (2020). Oropouche virus cases identified in Ecuador using an optimised qrt-pcr informed by metagenomic sequencing. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007897>

ANEXOS**Anexo 1:** Metadata de los pacientes de donde se extrajo el suero

MUESTRA	FECHA DE COLECTA	GÉNERO	SÍNTOMA	COMUNIDAD
24B	26 de junio de 2019	Femenino	Fiebre	Borbón
102M	27 de mayo de 2019	Masculino	2 días de fiebre	Maldonado

Anexo 2: Patógenos representativos causantes de enfermedades febriles y de sintomatología de fiebre presentes en suero.

Muestra 24B		
Dominio	Organismo	Lecturas
Bacteria	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1906
Eucariota	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	1271
Bacteria	<i>Chlamydia trachomatis</i>	423
Bacteria	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	270
Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	184
Bacteria	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	166
Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	99
Bacteria	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	75
Eucariota	<i>Plasmodium vivax</i>	62
Bacteria	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	58
Eucariota	<i>Plasmodium falciparum</i> Palo Alto/Uganda	53
Bacteria	<i>Haemophilus influenzae</i>	46
Bacteria	<i>Clostridioides difficile</i>	42

Anexo 3: Patógenos representativos causantes de enfermedades febriles y de sintomatología de fiebre presentes en suero.

Muestra 102M		
Dominio	Organismo	Lecturas
Eucariota	<i>Plasmodium ovale wallikeri</i>	803
Bacteria	<i>Vibrio parahaemolyticus 10290</i>	544
Bacteria	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	507
Bacteria	<i>Haemophilus influenzae</i>	450
Bacteria	<i>Chlamydia trachomatis</i>	265
Bacteria	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	139
Bacteria	<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	114
Bacteria	<i>Enterococcus faecium</i>	106
Bacteria	<i>Staphylococcus aureus</i>	89
Bacteria	<i>Haemophilus influenzae</i> HK1212	64
Bacteria	<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	59
Eucariota	<i>Plasmodium falciparum</i> Palo Alto/Uganda	58
Eucariota	<i>Plasmodium vivax</i>	50