

**Secuenciación y Análisis de Datos Genómicos para la
Detección Microbiológica
de Enfermedades transmitidas por Alimentos y Aguas**

**Coproducción de Metallo- β - lactamasas tipo blaVIM-2, blaIMP-18
en *Pseudomonas aeruginosa* en un hospital de la Red RAM-
Ecuador, año 2023**

Ecuador

Ing. Wladimir Javier Enríquez Villacreses

Caracas, Noviembre 2023

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos, es un problema de salud a nivel mundial que afecta a países en vías de desarrollo y altamente desarrollados(1). La aparición y reaparición de mecanismos de resistencia en entornos hospitalarios tiene como consecuencia elevadas tasas de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud (IAAS), causantes de aumento en la morbilidad y mortalidad de las pacientes y reducidas opciones terapéuticas para su tratamiento(2)

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio estricto y oxidasa positiva; considerado como el patógeno oportunista más representativo de su género debido a su capacidad de causar infecciones en personas inmunodeprimidas y la resistencia intrínseca y natural descrita. Posee la habilidad de formar biopelículas que le permiten adherirse fácilmente a distintas superficies hospitalarias (3) .

Dentro de los sistemas de vigilancia de Resistencia a los antimicrobianos (RAM) a nivel mundial es considerado de alta prioridad de control, debido a los altos porcentajes de resistencia a los carbapenémicos(4).

Instituto Nacional de Investigación
en Salud Pública INSPI
"Dr. Leopoldo Izquieta Pérez"



En Ecuador, el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública “Dr. Leopoldo Izquiereta Pérez (INSPI) a través del Centro de Referencia a los Antimicrobianos (CRN-RAM) es el encargo de la confirmación de patrones inusuales de resistencia asociados a mecanismos circulantes y sus combinaciones a nivel hospitalario. En abril de 2023, se notificó el hallazgo de una nueva combinación de carbapenemasas de tipo blaIMP-18 y blaVIM-2 en un aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

El presente estudio se realizó en coordinación del CRN-RAM y el Centro de Referencia Nacional de Genómica, Secuenciación y Bioinformática (CRN-GENSBIO) para describir las características fenotípicas y genotípicas de este nuevo hallazgo.

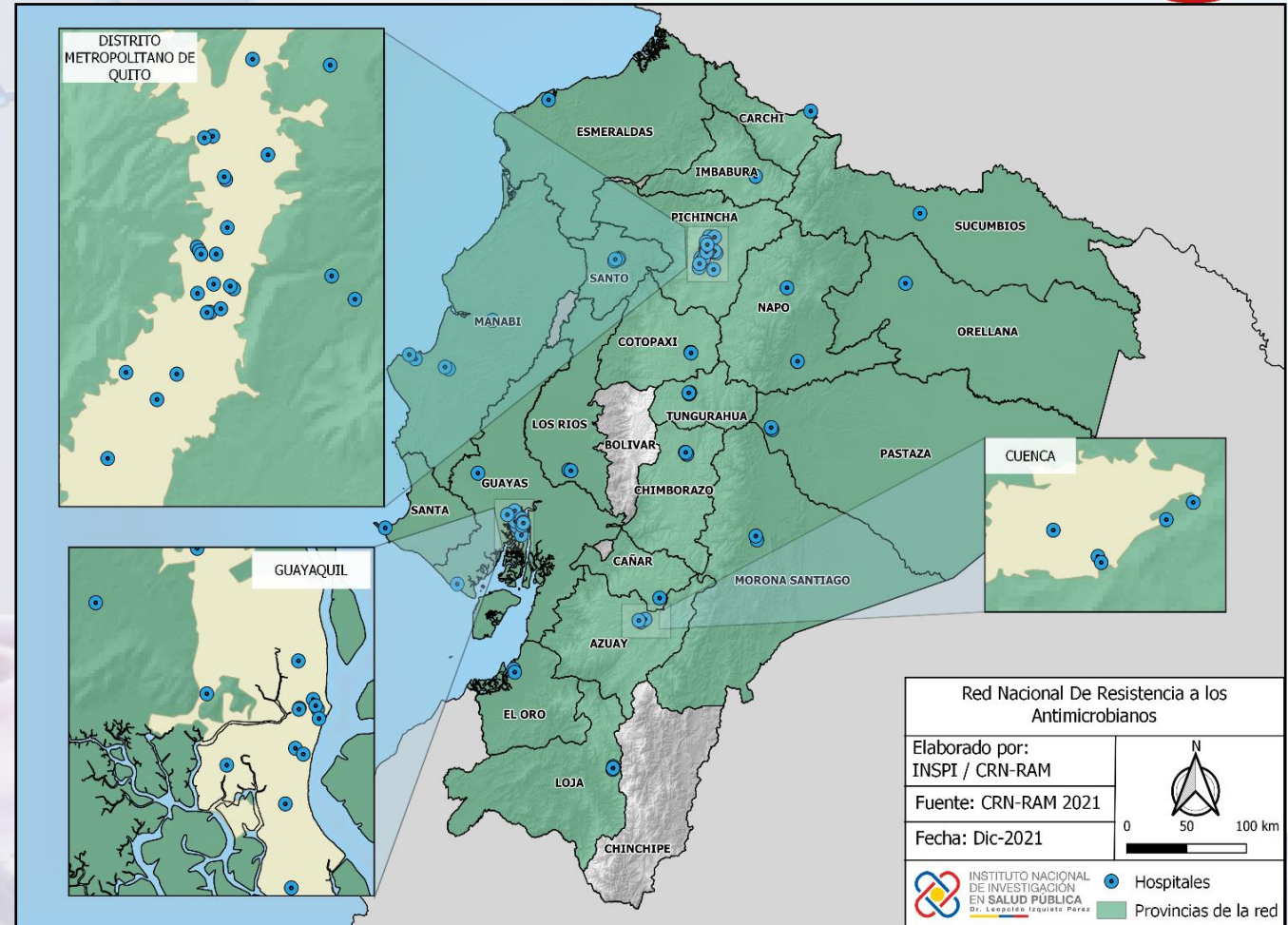


Imagen 1. Red Nacional de Vigilancia RAM
RED RAM Ecuador 78 unidades de salud MSP, ISFA, ISPOL, IESS y privadas

2. MATERIALES Y MÉTODOS

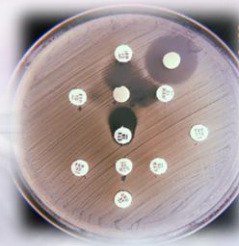
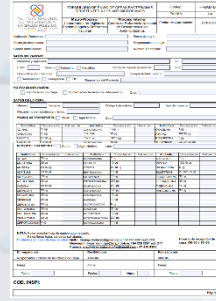
a. Diseño

Se trata de un estudio descriptivo del aislamiento bacteriano de *P. aeruginosa* productora de carbapenemasas de tipo blaIMP-18 y blaVIM-2. Este microorganismo fue remitido al CRN-RAM, procedente de un hospital de la Red RAM Ecuador, aislado de **una muestra de orina de un paciente de sexo femenino de 44 años de edad con una herida en el muslo derecho.**

b. Identificación bacteriana y pruebas de susceptibilidad

La recuperación del aislamiento se realizó en agar base sangre de cordero al 5% y en el medio de cultivo diferencial y selectivo McConkey a 37°C por 24 horas. La identificación bacteriana se realizó mediante pruebas bioquímicas del sistema Vitek 2 Compact.

Los perfiles de susceptibilidad se determinaron por disco difusión y microdilución en caldo con el sistema semi-automatizado Sensititre para determinar la concentración mínima inhibitoria. Además se efectuaron pruebas complementarias fenotípicas para la identificación de carbapenemasas; entre ellas, ácido etilen-diaminotetraacético (EDTA), el método de inactivación del carbapenémico (mCIM/ eCIM) e inmunocromatografía.



Para la interpretación de los resultados se utilizaron los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 edición 2023.

c. Detección de genes codificantes de MBL por PCR.

La confirmación molecular para determinar los genes de resistencia a carbapenémicos se realizó mediante PCR pentaplex de punto final (panel de carbapenemasa bla-*KPC*, bla-*NDM*, bla-*VIM*, bla-*IMP*, bla-*OXA48*)(7).

d. Genotipificación

Se prepararon las librerías genómicas siguiendo el protocolo de Illumina DNAPrep que permite la secuenciación del genoma completo en fragmentos de 600 pares de bases (pb) paired-end, amplificados por PCR. Se realizó la genotipificación para identificar la identidad de la bacteria, genes de resistencia específicos y el perfil alélico.





3. RESULTADOS

Este aislamiento bacteriano se identificó como *Pseudomonas aeruginosa*.

El perfil de susceptibilidad obtenido lo categorizan como “*extensively drug-resistance*” (XDR), presentó resistencia a Cefepime, Ceftazidima, Piperacilina/Tazobactam, Gentamicina, Imipenem, Meropenem y Ciprofloxacina. A continuación, se describen los resultados del perfil de susceptibilidad, junto con las pruebas fenotípicas realizadas (Tablas 1 y 2).

En cuanto a los resultados de PCR punto final, se obtuvo amplificación de bandas en el panel completo de carbapenemasa de blaIMP con un tamaño de 232 pb y blaVIM de 390 pb y confirmando con la amplificación individual de cada gen (Tabla 3).

Tabla 1. Pruebas fenotípicas para identificación de coproducción de carbapenemasas

Microorganismo identificado	Perfil fenotípico: Pruebas fenotípicas complementarias		
	Método de inactivación del carbapenémico: mCIM/ eCIM	Sinergia EDTA-IMI	Inmunocromatografía de flujo lateral
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	VIM (+) IMP (+)

Tabla 2. Perfil de susceptibilidad por microdilución en caldo de aislamiento de *Pseudomonas aeruginosa* blaVIM/ blaIMP

Perfil de susceptibilidad (Microdilución en caldo)										
Antibiótico/ Resultado	AMK	ATM	FEP	CAZ	TPZ	CN	IPM	MEM	CIP	CT
CMI(μg/ml)	≤16	16	>32	>32	>64	>16	>8	>16	>2	1
Interpretación	S	I	R	R	R	R	R	R	R	I

Tabla 3. Resultados de genes identificados por genotipificación

Perfil genotípico	
Genes	Familia de antibióticos hidrolizada
aac(6')-29a,b; lb-Hangzhou; aph(3')-IIb	Aminoglucósidos
blaIMP-18	β- lactámicos
blaVIM-2	

4. RESULTADOS

Con la genotipificación, se determinó la secuencia tipo (ST) a la que corresponde el microorganismo de estudio (Tabla 4). Este ST se encuentra relacionado con el varios países de Europa (Figura 2).

Tabla 4. Perfil alélico del análisis de cgMLST

ST	Perfil alélico						
111	acsA	aroE	guaA	mutL	nuoD	ppsA	trpE
	17	5	5	4	4	4	3

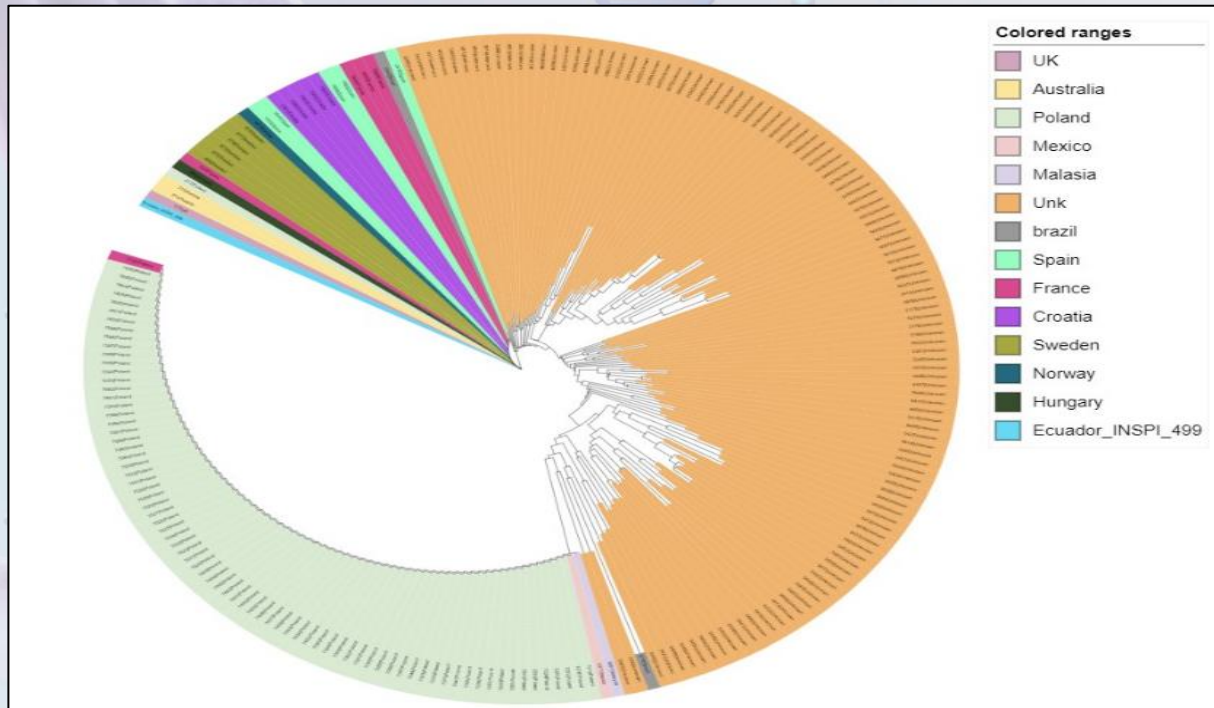


Figura 2. Relación cgMLST con otros países. Fuente y elaboración: CRN-GENSBIO 2023

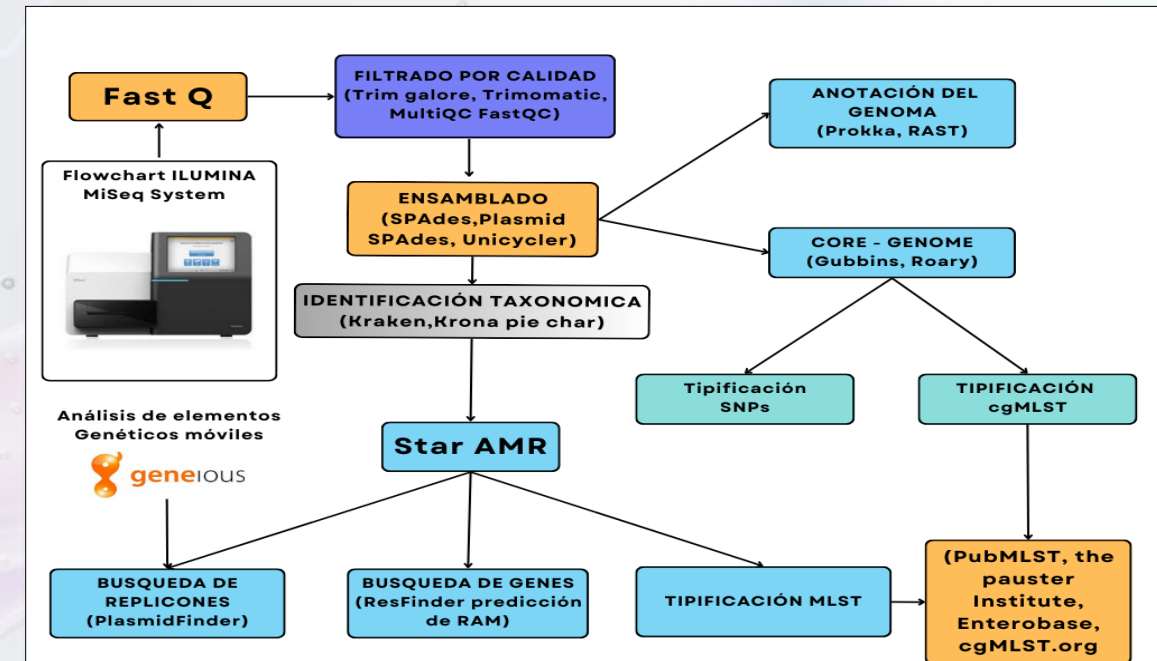


Figura 3. Software y algoritmos utilizados para el proceso de secuenciación dividido en categorías que describen el proceso de análisis de secuencias de lectura corta.

4. DISCUSIÓN

El hallazgo de la coproducción de blaIMP-18 y blaVIM-2 notificado en Ecuador en abril 2023. La detección de *P. aeruginosa* portadora de MBL es de gran importancia debido a su papel en infecciones graves, como septicemia y neumonía, que contribuyen significativamente a la morbilidad y mortalidad en diversas regiones del mundo.

Se ha detectado a nivel mundial, específicamente en países asiáticos (1). No obstante, en Latinoamérica, en Perú en el año 2019 se reportó por primera vez la coproducción de carbapenemasas bla_{IMP} y bla_{VIM} en cepas de *P. aeruginosa* en las regiones de Lima, Loreto y Callao (CITA)(9).



5. CONCLUSIONES

El presente estudio determina la presencia de un aislamiento bacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* que muestra coproducción de carbapenemasas de tipo bla_{IMP-18} y bla_{VIM-2}. Esta combinación de mecanismos no ha sido reportada antes en el país y representa un potencial riesgo de brote a nivel intrahospitalario.

De acuerdo al perfil antibiótico analizado y reportado para este aislamiento bacteriano, se lo ha categorizado como “Extremadamente resistente” XDR, ya que solo tiene 2 o 3 opciones terapéuticas disponibles para su tratamiento.

Por la presencia de los genes antes mencionados, esta diseminación se asocia a la transmisión por elementos genéticos móviles y procesos de conjugación in vivo debido a las condiciones del medio intrahospitalario. Este microorganismo pertenece a la ST-111, asociado a la coproducción de carbapenemasas.

6. BIBLIOGRAFÍA:

1. Yoon EJ, Jeong SH. Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol*. 2021;12(February).
2. Wang MG, Liu ZY, Liao XP, Sun RY, Li RB, Liu Y, et al. Retrospective data insight into the global distribution of carbapenemase-producing *pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2021;10(5).
3. Méndez AS, Sarmiento AC. Caracterización de β -lactamasas de espectro extendido tipo GES en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas a partir de aislados clínicos de hospitales de la ciudad de Quito [Internet]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador; 2018. Available from: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/15241/TESIS-25-07-2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. World Health Organization. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. *Saudi Med J* [Internet]. 2017 [cited 2023 Aug 8];38(4):444–5. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
5. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y, et al. VIM- and IMP-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(7):868–71.
6. Sarhangi M, Motamedifar M, Sarvari J. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing blaIMP1, blaVIM2, blaSIM1, blaSPM1 in Shiraz, Iran. *Jundishapur J Microbiol*. 2013;6(7):3–7.
7. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2011;70(1):119–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>
8. Satan Salazar C. Identificación de procesos críticos en el manejo de la resistencia a los antibióticos y su evolución en las Unidades de Cuidados Intensivos de tres Hospitales de la Red Pública Integral de Salud de Ecuador en el periodo 2019- 2021 [Internet]. Universidad Andina Simón Bolívar; 2023. Available from: <https://repositorio.uasb.edu.ec/bitstream/10644/9442/1/T4128-MESC-Satan-Identificación.pdf>
9. Mayta-Barrios MM, Ramirez-Illescas JJ, Pampa-Espinoza L, Alfredoyagui-Moscoco MJ. Molecular characterization of carbapenemases in Peru during 2019. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2021;38(1):113–8.



Instituto Nacional de Investigación
en Salud Pública INSPI
"Dr. Leopoldo Izquieta Pérez"

Gracias



GUILLERMO LASSO
PRESIDENTE