ARTÍCULO ORIGINAL

Enterobacteriaceae PRODUCTORAS DE DOBLE CARBAPENEMASA: SECUENCIACIÓN DEL GENOMA COMPLETO DE AISLAMIENTOS EN HOSPITALES DE PARAGUAY, 2021

Nancy Melgarejo Touchet[1,a], Natalie Weiler[1,a], Sofía Busignani[1,a], Verónica Orrego[1,a], María José Duarte[1,a], Jazmin Martínez[1,a], Pamela Dunjo[1,a], Mario Martínez Mora[1,a], Aníbal Kawabata[2,a], Juan Irala[3,a], Mariel Brítez[4,a], Federico Escobar[5,a], Fátima Gonzalez[6,a], Carmen Riquelme[7,a], Beatriz Soilan[8,a]

[1] Laboratorio Central de Salud Pública, Asunción, Paraguay.
[2] Hospital del Trauma "Dr. Manuel Giani", Asunción, Paraguay.
[3] Laboratorio ANALIZA, Asunción, Paraguay.
[4] Sanatorio AMSA, Asunción, Paraguay.
[5] Instituto de Previsión Social. Hospital Central, Asunción, Paraguay.
[6] Hospital Regional de Ciudad del Este. Ciudad del Este, Paraguay.
[7] Hospital General de Luque. Luque, Paraguay.
[8] Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente. Asunción, Paraguay.
[a] Bioquímico, bacteriólogo.

RESUMEN

Objetivos. Describir la secuenciación del genoma completo de aislados de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas circulantes en Paraguay. **Materiales y métodos.** Se realizaron estudios genómicos en siete aislamientos de Enterobacterales, previamente confirmados como dobles productores de carbapenemasas por PCR, de pacientes con estadías hospitalarias prolongadas y tratamiento antimicrobiano de amplio espectro en siete hospitales de Paraguay. La secuenciación del genoma incluyó el ensamblaje de Unicycler, la tipificación de secuencias multilocus (MLST). **Resultados.** De los siete aislamientos de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas, seis fueron de *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* y uno de *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*. En *K. pneumoniae* se confirmó la coproducción de bla_{KPC-2}/ bla_{NDM-1} y bla_{KPC-2}/ bla_{NDM-5}. En *E. cloacae* se observó la coproducción de bla_{NDM-1} /$bla_{OXA-163}$, junto con otros genes de resistencia a los antimicrobianos de origen cromosómico y plásmido. Los tipos de secuencia MLST de los aislados de *K. pneumoniae* fueron ST11, ST15, ST133, ST273 y ST1303, y de *E. cloacae* fue ST976. Dos de los seis aislados de *K. pneumoniae* ST11, procedentes de dos hospitales diferentes de la capital, estaban genéticamente relacionados, y ambos portaban bla_{KPC-2} y bla_{NDM-5}. **Conclusiones.** Se presenta la primera secuenciación del genoma de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas, de pacientes con estancias hospitalarias prolongadas en Paraguay. El análisis reveló diversos perfiles de resistencia y clones, portación de múltiples carbapenemasas y otros genes de resistencia de origen cromosómico y plasmídico. Estos hallazgos enfatizan la necesidad de fortalecer el control de infecciones hospitalarias y realizar intervenciones terapéuticas efectivas.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter cloacae*; resistencia a carbapenemes; doble producción de carbapenemasas; secuenciación de genoma completo; *Illumina Miseq*; Paraguay (fuente: DeCS BIREME).

Citar como: Melgarejo-Touchet N, Weiler N, Busignani S, Orrego V, Duarte MJ, Martínez J, *et al*. *Enterobacteriaceae* productoras de doble carbapenemasa: secuenciación del genoma completo de aislamientos en hospitales de Paraguay, 2021. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2025;42(2):138-46. doi: 10.17843/rpmesp.2025.422.14293.

Correspondencia. Mario Fabián Martinez Mora, mfmarmora@gmail.com

Recibido: 30/08/2024
Aprobado: 12/03/2025
En línea. 23/06/2025

Esta obra tiene una licencia de Creative Commons Atribución 4.0 Internacional

DOUBLE-CARBAPENEMASE-PRODUCING *Enterobacteriaceae*: COMPLETE GENOME SEQUENCING OF ISOLATES FROM HOSPITALS IN PARAGUAY, 2021

ABSTRACT

Objectives. To describe the whole genome sequencing of double-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates circulating in Paraguay. **Materials and methods.** We conducted genomic studies on seven *Enterobacteriaceae* isolates, previously confirmed as double-carbapenemase producers by PCR, from patients with extended hospital stays and broad-spectrum antimicrobial treatment in seven hospitals in Paraguay. Genome sequencing included Unicycler assembly and multilocus sequence typing (MLST). **Results.** Of the seven *Enterobacterales isolate*s producing dual carbapenemases, six were *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* and one was *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*. The co-production of bla_{KPC-2}/bla_{NDM-1} and bla_{KPC-2}/bla_{NDM-5} was confirmed in *K. pneumoniae*. We found co-production of bla_{ND}M-1/$bla_{OXA-163}$ in *E. cloacae*, along with other antimicrobial resistance genes of chromosomal and plasmid origin. The MLST sequence types of the K. pneumoniae isolates were ST11, ST15, ST133, ST273, and ST1303, and that of *E. cloacae* was ST976. Two of the six *K. pneumoniae* ST11 isolates, from two different hospitals in the capital, were genetically related and both carried bla_{KPC-2} and bla_{NDM-5}. **Conclusions**. We report the first genome sequencing of double-carbapenemase-producing Enterobacterales from patients with extended hospital stays in Paraguay. The analysis revealed diverse resistance profiles and clones, carriage of multiple carbapenemases, and other resistance genes of chromosomal and plasmid origin. These findings emphasize the need to strengthen hospital infection control and implement effective therapeutic interventions.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae; Enterobacter cloacae;* carbapenem resistance; dual production of carbapenemases; Whole genome sequencing; Illumina Miseq; Paraguay (source: MeSH NLM).

https://doi.org/10.17843/rpmesp.2025.422.14293

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, la resistencia a los antimicrobianos (RAM) tomó predominio, por su aumento evidenciado a nivel mundial en la mayoría de los microorganismos. Durante la pandemia por COVID-19 dicha situación empeoró, debido al uso excesivo e indebido de antimicrobianos de amplio espectro, observándose el incremento en la incidencia de infecciones asociadas a la atención en salud, reportados por varios países, tanto de bajos como de altos ingresos [1]. Los microorganismos más afectados por la adquisición de resistencia a múltiples fármacos, incluso de amplio espectro, son los bacilos gramnegativos, especialmente los miembros del orden *Enterobacterales* [2].

Las Enterobacterias resistentes a los carbapenémicos (ERC) están asociadas a mayor morbilidad y mortalidad. En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud, publicó un listado de patógenos prioritarios resistentes a los antimicrobianos; el cual fue actualizado en el 2024; incluyendo a este grupo bacteriano entre las 12 familias más peligrosas para la salud humana, ubicándolas en la prioridad 1 (crítica) [3]; siendo *Klebsiella pneumoniae*, reconocido oportunista, el agente más importante dentro del grupo, causante de infecciones nosocomiales graves, como sepsis, neumonías, infecciones del tracto urinario, entre otros; desempeñando un papel preponderante en las infecciones hospitalarias, aumentando el tiempo de hospitalización, costo y mortalidad [4].

El principal mecanismo responsable de la resistencia es por producción de carbapenemasas, enzimas que destruyen los carbapenémicos, agentes β-lactámicos de amplio espectro utilizados para el tratamiento de las infecciones bacterianas ocasionadas por bacilos gramnegativos resistentes a múltiples fármacos [5]. En la actualidad, según la clasificación de Ambler, son conocidas tres clases de enzimas: la de clase A, serin carbapenemasas, cuya representante más importante es la KPC; la de clase B, metalo-β-lactamasas, que incluye la NDM, IMP y VIM y la de clase D, serin enzimas de tipo OXA (OXA-48-like) [6].

En Paraguay, la enzima prevalente en este grupo bacteriano es la de tipo metalobetalactamasa genotipo NDM [7], confirmada en año 2012 en aislamientos de *Acinetobacter pittii* [8], la cual desplazó a KPC, confirmada en el 2009 en aislamientos de *Enterobacter cloacae*; ambas endémicas en todos los hospitales [9].

Investigadores de diferentes partes del mundo publicaron la portación de más de un tipo de carbapenemasa en un solo aislamiento de enterobacteria. Con la pandemia por COVID-19 este tipo de hallazgos se incrementó y fue motivo de una alerta regional en el año 2021 [10].

En Paraguay, en el mes de junio del 2021, el Laboratorio Central de Salud Pública (LCSP); laboratorio de referencia nacional; comunicó el incremento en el número de aislamientos de bacilos gramnegativos resistentes a antimicrobianos de amplio espectro, y en septiembre del mismo año, confirmó la circulación de *Enterobacterales* dobles productores de carbapenemasas en varios hospitales del país [11, 12].

Ante estos hallazgos de relevancia nacional, se llevaron a cabo los estudios genómicos de algunos aislamientos de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas, a fin de generar conocimientos detallados sobre la naturaleza de los genes involucrados en la resistencia a los antimicrobianos de amplio espectro.

MENSAJES CLAVE

Motivación para realizar el estudio. Generar conocimientos sobre la situación actual de la resistencia antimicrobiana en Enterobacterales, utilizando secuenciación de genoma completo.

Principales hallazgos. Se presenta la primera secuenciación del genoma de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas, de pacientes con estancias hospitalarias prolongadas en Paraguay. De los siete aislamientos de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas, seis fueron de *Klebsiella* subsp *pneumoniae*.

Implicancias. Los hallazgos resaltan la urgencia de fortalecer las medidas de prevención y control de las infecciones asociadas a la atención de la salud, para prevenir la diseminación de estas bacterias altamente resistentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio retrospectivo llevado a cabo en el departamento de Bacteriología y Micología del LCSP, en 7 aislamientos de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas, provenientes de 7 centros hospitalarios colaboradores de la Red de Vigilancia Laboratorial de la Resistencia a los Antimicrobianos. En la Tabla 1 se detallan las fechas de aislamiento y las características de los centros remitentes.

Confirmación de la identificación bacteriana

Las identificaciones bacterianas fueron confirmadas por comparación de espectros proteicos, generados por la técnica de espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), utilizando el Sistema BD™ Bruker MALDI Biotyper ® CA, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Confirmación molecular de doble producción de carbapenemasas

Se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple de punto final utilizando cebadores específicos para la

Tabla 1. Características de los centros remitentes de aislamientos de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas sometidos a secuenciación de genoma completo en Paraguay 2021.

Número de cepa	Fecha de toma de muestra	Región de procedencia	Característica del centro
1	13/03/2021	Capital	Hospital Privado
2	24/07/2021	Capital	Hospital Privado
3	17/08/2021	Capital	Hospital de Referencia
4	17/09/2021	X Región Sanitaria	Hospital Regional
5	25/08/2021	XVIII Región Sanitaria	Hospital General
6	12/07/2021	Capital	Hospital de Referencia
7	3/03/2021	Capital	Hospital de Referencia

detección de los genes bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP}, bla_{VIM} y $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ [13].

Para la obtención del ADN se utilizó el método de lisis bacteriana por ebullición durante 10 minutos de una suspensión bacteriana de aproximadamente 0,5 *Mac Farland* en 300 uL de agua libre de RNAsa y centrifugada posteriormente a 10.000 rpm por 10 minutos. Las reacciones de amplificación de los genes se realizaron en un termociclador TC-PRO (BOECO Germany) y los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE buffer (PanReac AppliChem – ITW Reagents). Las imágenes de los patrones electroforéticos fueron obtenidas con el equipo fotodocumentador Gel Doc™ EZ Imager (*BIO-RAD*) y analizadas con el programa Image Lab 6.0 (*BIO-RAD*).

Estudios genómicos por secuenciación masiva de moléculas cortas

Las lecturas cortas se realizaron utilizando la plataforma *Illumina Miseq* con el kit Miseq Reagent Kit V2. Las librerías fueron preparadas utilizando el DNA library prep kit (*Illumina*) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Análisis bioinformático

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a control de calidad con el programa Fastqc y posteriormente ensambladas con el programa Unicycler (SPAdes) [14]. Los genomas fueron anotados con prokka (versión 3.2.1) [15].

La tipificación por multilocus sequence typing (MLST) se realizó con el software ariba (versión 2.14.4) [16] utilizando la base de datos PubMLST (https://pubmlst.org). Los genes analizados fueron los siguientes: (*adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, and recA*). La búsqueda de mecanismos de resistencia se realizó utilizando las siguientes bases de datos: Res_Finder (v.4.1) [17] y Point_fonder [18] mediante los softwares ariba y Staramr [19]; con requerimientos de umbral de 95% de identidad y cobertura mínima del 80%, además de la base de datos AMRfinder, con el programa AMRfinder [20], utilizando los mismos parámetros.

La búsqueda de plásmidos de incompatibilidad se realizó utilizando el programa Staramr con la base de datos Plasmid_finder (versión 2021-07-12) utilizando los parámetros de 95% de identidad y 60% de cobertura mínima.

Finalmente se construyó un árbol filogenético por máxima verosimilitud con el programa RAxML [21] basado en el estudio del pangenoma para establecer la relación entre los aislamientos estudiados. La visualización del árbol filogenético se realizó con el programa FigTree (versión 1.4.4) desarrollado por Andrew Rambaut. La integración de los resultados junto con la metadata asociada se llevó a cabo por el programa Microreact [22].

Consideraciones éticas

El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación del LCSP del MSPyBS, y cuenta con dictamen favorable CEI-LCSP N°187/2021.

RESULTADOS

De los 7 aislamientos de Enterobacterales dobles portadores de carbapenemasas, 6 correspondieron a *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (*K. pneumoniae*) y 1 a *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (*E. cloacae*), todos provenientes de pacientes con estancia hospitalaria de más de 30 días en diferentes centros sanitarios del país. Todos los aislamientos de *K. pneumoniae* resultaron ser portadores de bla_{NDM} + bla_{KPC}, y el de *E. cloacae* de bla_{NDM} + $bla_{OXA\ 163}$. La Tabla 2 describe las características epidemiológicas de los aislamientos estudiados.

Cinco aislamientos provinieron de centros asistenciales de la capital del país; 1 del Dpto. Central y 1 del departamento Alto Paraná, distantes a 20 y 350 km de la capital del país respectivamente.

Los resultados del estudio del perfil de susceptibilidad a los antimicrobianos estudiados, reveló la resistencia de los aislamientos a múltiples drogas, incluso 2 de los 7 aislamientos estudiados con CIM de colistina mayor a 8 ug/mL. En lo que respecta a la tigeciclina, sólo 1 presentó CIM ≥8 ug/mL. La Tabla 3 detalla los resultados de la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos.

Los resultados de secuenciación de genoma completo están resumidos en la Tabla 4, en donde se pueden observar los secuenciotipos (ST), factores de virulencia, plásmidos y los

https://doi.org/10.17843/rpmesp.2025.422.14293

Tabla 2. Características de los aislamientos de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas sometidos a secuenciación de genoma completo en Paraguay, 2021.

Cepa Nro.	Centro de internación	Edad en años (sexo)	Tiempo de internación en días	Patología/ diagnóstico	Tratamiento antimicrobiano	Muestra (infección o colonización)	Resultado genotípico de PCR convencional múltiple	Desenlace
1	Capital	61 (Mujer)	150	Complicaciones post COVID-19	SCF, VAN, TGC, COL, AMK, LVX, ERT, CIP, MEM, FLU.	secreción purulenta de piel (infección)	*K. pneumoniae* bla_{NDM} + bla_{KPC}	Fallecido
2	Capital	59 (Hombre)	37	Neumonía asociada a SARS-CoV-2	CRO, LVX, TZP, VAN, MEM, TGC.	esputo (infección)	*K. pneumoniae* bla_{NDM} + bla_{KPC}	Alta médica
3	Capital	35 (Mujer)	73	Traumatismo por accidente de tránsito.	CFZ, AMX, CIP, TZP, VAN, COL, AMK, MEM, TGC, CAZ.	secreción abdominal (infección)	*K. pneumoniae* bla_{NDM} + bla_{KPC}	Alta médica
4	Alto Paraná	46 (Hombre)	70	Paro cardiorrespiratorio post asfixia por cuerpo extraño	COL, MEM, OTR.	secreción purulenta de piel (infección)	*K. pneumoniae* bla_{NDM} + bla_{KPC}	Alta médica
5	Central	57 (Hombre)	48	Tumor rectal	VAN, MEM, LIN, COL, TGC.	punta de cateter (infección)	*E. cloacae* bla_{NDM} + $bla_{OXA\ 163}$	Fallecido
6	Capital	49 (Mujer)	35	Neumonía asociada a SARS-CoV-2	CRO, COL, AMK, MEM, FLU.	secreción traqueal (infección)	*K. pneumoniae* bla_{NDM} + bla_{KPC}	Fallecido
7	Capital	76 (Mujer)	33	Insuficiencia cardiaca crónica	CRO, MEM, IMI, TGC, COL.	hisopado rectal (colonización)	*K. pneumoniae* bla_{NDM} + bla_{KPC}	Fallecido

SCF: cefoperazona/sulbactam, VAN: vancomicina, TGC: tigeciclina, AMK: amicacina, LVX: levofloxacina; ERT: ertapenem; CFZ: cefazolina; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; MEM: meropenem; FLU: fluconazol; CRO: ceftriaxona; TZP: piperacilina/tazobactam; COL: colistina; OTR: otros no registrados.

genes de resistencia a los antimicrobianos de los aislamientos estudiados.

Solo 2 de los 6 aislamientos de *K. pneumoniae* presentaron el mismo secuenciotipo (ST11), y mostraron una estrecha relación genética con 18 SNP de diferencia, ambos provenientes de 2 centros hospitalarios de la capital del país, en los que se confirmaron la doble producción de las carbapenemasas bla_{KPC-2} y bla_{NDM-5}. Un aislamiento del interior del país (ST15), resultó ser portador de los genes bla_{NDM-5} y bla_{KPC-2}; otro (ST273), con portación de bla_{NDM-1} y bla_{KPC-2}; y los 2 restantes (ST133 y ST1303) de bla_{NDM-5} y bla_{KPC-2}. El único aislamiento de *E. cloacae* (ST976), doble productor de carbapenemasas, resultó ser portador de los genes bla_{NDM-1} + $bla_{OXA-163}$. La relación clonal entre los aislamientos se visualiza en la Figura 1.

Las β-lactamasas de espectro extendido identificadas en las cepas estudiadas fueron $bla_{CTX-M-15}$ y bla_{SHV-12}; encontrándose $bla_{CTX-M-15}$ en 6 de las 7 estudiadas y coexistiendo con SHV-12 en 4 de ellas.

Fueron identificados varios mecanismos de resistencia a las quinolonas, tanto de naturaleza cromosómica como plasmídica. Todos los aislamientos resultaron ser portadores de la combinación de varios de ellos.

El 100% de los aislamientos fueron resistentes a trimetoprim y sulfametoxazol por la portación de *sul (sul_1, sul_2)* y *dfrA (dfrA_2, dfrA_12, dfrA_14, dfrA_27)*; y la resistencia a los aminoglucosidos por la presencia de genes transferidos horizontalmente, evidenciándose en todos ellos la portación de *aac-(6´)-Ib-cr_1*, en combinación con otros, tales como *aac_3_II, aadA, aph y rmtB.*

Ninguno de los aislados resultó ser portador del gen *mcr*, sin embargo 2 de ellos (cepa 1 y 2) con CIM de colistina >8 ug/mL fueron positivos para al menos 2 mutaciones (mgrB_W20R/pmrB_R256G y pmrB_R256G/phoQ_L96P), lo cual podría ser la causa de la resistencia a la colistina.

El único factor de virulencia identificado en 4 aislamientos fue yersiniabactin (ybt); siendo todos negativos para los factores de virulencia asociados a la hipermucoviscosidad (RmpA/rmpA2).

DISCUSIÓN

La identificación de dos aislados relacionados de *K. pneumoniae* ST11, a pesar de su origen en la capital de Paraguay, sugiere una posible propagación clonal, pero limita las conclusiones definitivas sobre la transmisión dentro de los

Tabla 3. Resultados de las pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos de los aislamientos de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas sometidos a secuenciación de genoma completo en Paraguay, 2021.

Aislamiento	Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) (ug/mL)												Halo de inhibición (mm)
	CTX	CAZ	SAM	PTZ	ERT	IMI	MEM	GEN	SXT	CIP	TGC	COL*	AMK
1	≥64	≥64	≥32	≥128	4	4	8	≥16	≥16	≥4	≥8	>8	18
2	≥64	≥64	≥32	≥128	≥8	8	≥16	≥16	≥16	≥4	≤1	>8	6
3	≥64	≥64	≥32	≥128	≥8	≥16	≥16	≥16	≥16	2	≤0,5	0,5	6
4	≥64	≥64	≥32	≥128	≥8	≥16	≥16	≥16	≥16	≥4	1	0,5	17
5	≥64	≥64	≥32	≥128	≥8	≥16	≥16	≥16	≥16	2	1	≤0,25	17
6	≥64	≥64	≥32	≥128	≥8	≥16	≥16	≥16	≥16	≥4	2	0,5	6
7	≥64	≥64	≥32	≥128	≥8	≥16	≥16	≥16	≥16	1	≤0,5	≤0,25	6

Metodologías: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por automatizado VITEK 2C y microdilución en caldo (*); halos de inhibición por Kirby Bauer.

CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; SAM: ampicilina/sulbactam; ERT: ertapenem; PTZ: piperacilina/tazobactam; IMI: imipenem; MEM: meropenem; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; TGC: tigeciclina; SXT: trimetoprim/sulfametoxazol; COL: colistina; AMK: amicacina.

centros de salud. De manera similar, el aislado único de *E. cloacae* restringe nuestra capacidad para sacar conclusiones sobre la diversidad de carbapenemasas en esta especie. El enfoque exclusivo del estudio en los productores de dobles carbapenemasas puede pasar por alto otros mecanismos de resistencia significativos o productores de carbapenemasas simples que circulan en Paraguay.

Este estudio presenta el primer análisis de secuenciación del genoma completo de aislados de Enterobacterales dobles productores de carbapenemasas en Paraguay, recuperados de pacientes con estadías hospitalarias prolongadas en 2021. Los hallazgos muestran la circulación de diversos clones de Enterobacterales portadores de múltiples enzimas hidrolizadoras de carbapenémicos y varios genes de resistencia a los antimicrobianos, adquiridos a través de mecanismos tanto cromosómicos como plasmídicos.

Todos los aislamientos pertenecían a pacientes con hospitalizaciones prolongadas, con una alta tasa de mortalidad, y todos recibieron terapia combinada antimicrobiana de amplio espectro. Se observó la coproducción de bla_{KPC-2} / bla_{NDM-1} y bla_{KPC-2} / bla_{NDM-5} en *K. pneumoniae*, y bla_{NDM-1}/ $bla_{OXA-163}$ en *E. cloacae*. Los tipos de secuencia incluyeron ST11, ST15, ST133, ST273 y ST1303 para *K. pneumoniae*, y ST976 para *E. cloacae*. El análisis filogenético reveló especies genéticamente no relacionadas, con solo dos aislados de ST11 de la capital que exhiben clonalidad, compartiendo plásmidos, factores de virulencia y genes de resistencia. Es probable que esto se deba a que se trata de un hospital de referencia para COVID-19.

La cepa ST15 de *K. pneumoniae*, coproductora de bla_{KPC-2} y bla_{NDM-5}, fue aislada de un hospital de nivel terciario de referencia en el departamento de Alto Paraná, en la frontera con Brasil. Este tipo de secuencia ha sido ampliamente reconocido como un clon de alto riesgo debido a su propensión a adquirir plásmidos híbridos portadores de genes de resistencia e hipervirulencia [23]. En particular, estudios brasileños han documentado la circulación de *K. pneumoniae* ST15 en varias regiones. Por ejemplo, en 2020, Martins *et al.* informaron de un brote en São Paulo en el que participaron aislados de ST15 que albergaban bla_{KPC-2}, $bla_{CTX-M-15}$, bla_{SHV-28} y otros determinantes de resistencia [24]. Del mismo modo, Rodríguez *et al.* describieron la diseminación de ST15 portadora de bla_{KPC-2} en el estado de Pará en 2021 [25]. Por el contrario, estudios europeos han asociado ST15 con el transporte de bla_{NDM-1} y bla_{OXA-48}, junto con otros genes de resistencia [26].

El único aislado de *E. cloacae* (ST976), doble productor de carbapenemasas bla_{NDM-1} y $bla_{OXA-163}$, se remitió de un hospital del Departamento Central y exhibió una amplia gama de determinantes de resistencia a los antimicrobianos. Cabe destacar que esta es la primera detección reportada del gen $bla_{OXA-163}$, una variante de bla_{OXA-48}, en Enterobacterales en Paraguay. Este genotipo se ha documentado en varios entornos regionales [27,28] y mundiales, asociados a brotes [29]. Además, se confirmó la presencia de bla_{CMH-3}, una betalactamasa de tipo AmpC recientemente descripta, cuyas características no fueron completamente descifradas aun, aunque hay antecedente de asociación con la carbapenemasa bla_{NDM-1} [30].

La estabilidad de los aislados dobles productores de carbapenemasas ha sido reportada por varios investigadores. Por ejemplo, Gao *et al.* demostraron una alta estabilidad en aislados de *K. pneumoniae* coproductores de bla_{KPC-2} y

https://doi.org/10.17843/rpmesp.2025.422.14293

Tabla 4. Resultados de la secuenciación del genoma completo de aislamientos de Enterobacterales dobles portadores de carbapenemasas en Paraguay 2021.

	Cepa 1	**Cepa 2**	**Cepa 3**	**Cepa 4**	**Cepa 5**	**Cepa 6**	**Cepa 7**
Cepa	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*	*E. cloacae*	*K. pneumoniae*	*K. pneumoniae*
ST	273	11	1303	15	976	11	133
Plásmidos	IncFII (K) IncC IncFIB (pNDM-Mar) IncFIB(K) IncHI1B (pNDM-MAR) IncFIB(pQiI) Col(pHAD28)	IncFII(K) Col(pHAD28) Col440I IncFIB(K) Inc(pQil) IncFII	IncFIA(HI1) IncFIB(pNDM-Mar) IncX3 IncFIB(K) IncHI1B (pNDM-MAR)	IncFIB(pQil) IncFII(K) IncFIB(pNDM-Mar) IncHI1B (pNDM-MAR)	IncFII(Yp) IncFIB(pECLA) IncR	IncFII IncFIB(pQil) IncFIB(K) IncFII(K) Col(pHAD28) Col4401 IncFIB(pNDM-Mar) IncHI1B (pNDM-MAR)	FIA (pBK30683) IncC IncFIB(K) IncM1 IncR
Factores de virulencia RmpADC/rmpA2	N	N	N	N	N	N	N
Factor Yersiniabactin	ybt 9, ICEKp3 YbST 183	ytb, ICEKp3 YbST 183-1LV	N	ytb 1, ICEKp4 YbST 28-1LV	N	ytb 9, ICEKp3 YbST 183-1LV	N
R a β-lactámicos	bla_{KPC_2}	bla_{KPC_2}	bla_{KPC_2}	bla_{KPC_2}	--	bla_{KPC_2}	bla_{KPC_2}
	bla_{NDM_1}	bla_{NDM_5}	bla_{NDM_5}	bla_{NDM_5}	bla_{NDM_1}	bla_{NDM_5}	bla_{NDM_5}
	bla_{OXA_1} bla_{OXA_5}	bla_{OXA_1} bla_{OXA_5}	bla_{OXA_1} bla_{OXA_5}	bla_{OXA_1} bla_{OXA_5}	bla_{OXA_1} bla_{OXA_5} bla_{OXA_163}	bla_{OXA_1} bla_{OXA_5}	--
	$bla_{CTX_M_15}$	$bla_{CTX_M_15}$	$bla_{CTX_M_15}$	$bla_{CTX_M_15}$	$bla_{CTX_M_15}$	$bla_{CTX_M_15}$	--
	bla_{TEM_1C}	bla_{TEM_1B}	bla_{TEM_1B}	--	bla_{TEM_1B}	bla_{TEM_1B}	bla_{TEM_1B}
	bla_{SHV_11} bla_{SHV_67}	bla_{SHV_12}	bla_{SHV_12}	bla_{SHV_12} bla_{SHV_28} bla_{SHV_100}	--	bla_{SHV_12} bla_{SHV_187}	bla_{SHV_75}
	--	--	--	--	bla_{CMH-3}	--	--
R a quinolonas	qnrB_1	qnrB_1	qnrB_7	qnrB_1	--	qnrB_1	--
	--	--	--	--	--	--	qnrB_3
	--	--	--	--	--	--	qnrB_6
	oqxA	oqxA	--	OqxA	OqxA	OqxA	OqxA
	oqxB	oqxB	--	OqxB	OqxB	OqxB	OqxB
	--	--	--	--	oqxR_V113I	--	--
	qnrS_1	qnrS_1	qnrS_1	qnrS_1	qnrS_1	qnrS_1	--
	gyrA_S83I	gyrA_S83I	--	gyrA_S83I gyrA_S83F gyrA_D87A	--	gyrA_S83I	--
	parC_S80I	parC_S80I	--	parC_S80I	--	parC_S80I	--
R a fosfomicina	fosA_5	fosA_1 fosA_6	fosA_1 fosA_6	fosA_1 fosA_6	fosA_7	fosA_1 fosA_6	fosA_1 fosA_6
R a sulfametoxazol	sul_1	sul_1	sul_1	sul_1	--	sul_1	sul_1
	sul_2		sul_2	sul_2	sul_2	--	sul_2
R a aminoglucosidos	aac(6')-Ib-cr_5	aac(6')-Ib-cr_5	aac(6')-Ib-cr_5	aac(6')-Ib-cr_5	aac(6')-Ib-cr_5	aac(6')-Ib-cr_5	aac(6')-Ib-cr_5
	aph(3")-Ib	aph(3')-Ia	aph(3")-Ib	aph(3")-Ib	aph(3")-Ib	--	aph(3")-Ib
	aph(6)-Id	--	aph(6)-Id	aph(6)-Id	aph(6)-Id	--	aph(6)-Id
	aac_3_II	-	aac_3_II	aac_3_II	aac_3_II	--	--
	aadA_2	aadA_2	aadA_2	aadA_2	--	aadA_2	aadA_16
	--	rmtB_1	rmtB_1	--	--	rmtB_1	rmtB_1
R a trimetoprim	dfrA_12	dfrA_12	dfrA_12	dfrA_12	--	dfrA_12	--
	dfrA_14	--	dfrA_14	--	dfrA_14	--	--
	--	--	--	--	--	--	dfrA_2 dfrA_27
R a eritromicina/ clindamicina	erm_B	erm_B	--	--	--	erm_B	--
R a eritromicina/ azitromicina	mph_A	mph_A	--	mph_A	mph_A	mph_A	--
R a cloranfenicol	catB_3	catB_3	catB_3	catB_3	catA_2 catB_3	catB_3	--
R a tetraciclina	tet_A	--	--	--	--	--	tet_A tet_D
R a polimiximas	mgrB_W20R pmrB_R256G	pmrB_R256G phoQ_L96P	--	--	--	pmrB_R256G	--

ST: secuenciotipo, R: resistencia; N: negativo.

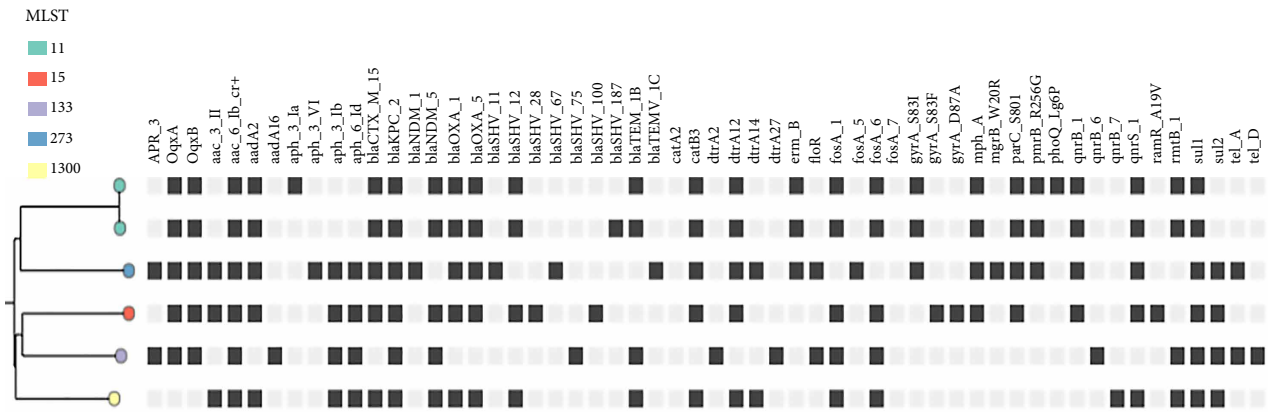

Figura 1. Relación clonal entre aislamientos de *K. pneumoniae* dobles productores de carbapenemasas aislados en hospitales de Paraguay. Año 2021.

bla$_{NDM-1}$ [31]. Esta estabilidad suscita preocupación en cuanto a la posible diseminación horizontal, lo que pone de relieve la necesidad crítica de reforzar la vigilancia continua y reforzar las medidas de prevención y control de infecciones asociadas a la atención de la salud.

En mayo de 2021, Ahmed *et al.* informaron del aislamiento de una cepa hipervirulenta de *K. pneumoniae* en un hospital egipcio, portadora del gen *bla*$_{NDM-1}$ carbapenemasa en un plásmido y *bla*$_{KPC-2}$ en otro [32]. De manera similar, investigadores chinos documentaron aislados hipervirulentos de *K. pneumoniae*, incluidas las cepas ST11, que albergan múltiples genes de resistencia, como *bla*$_{KPC-2}$ [33]. ST11 es un complejo clonal altamente epidémico conocido por facilitar la transferencia horizontal de bacterias Gram negativas multirresistentes. Estos hallazgos contribuyen a nuestra comprensión de la capacidad de estos microorganismos para albergar diversos plásmidos, vinculando varios determinantes de resistencia y virulencia.

En cuatro de los seis aislamientos examinados se detectó yersiniabactina, un sideróforo reconocido como factor de virulencia en *K. pneumoniae*, particularmente en infecciones pulmonares [34]. Sin embargo, ninguno de los aislados portaba rpmA/rpmA2, los genes responsables de la hipermucoviscosidad en cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* [35].

Los hallazgos de este estudio están limitados por el pequeño tamaño de muestra, lo que restringe su generalización a la población paraguaya en general. La naturaleza retrospectiva de este estudio, que se basa en aislamientos preexistentes, tuvo un acceso limitado a datos clínicos y epidemiológicos detallados. El enfoque en los aislamientos de pacientes con estadías hospitalarias prolongadas (más de 30 días) puede introducir un sesgo de selección, lo que podría representar en exceso las infecciones adquiridas en el hospital y subestimar los casos adquiridos en la comunidad. La distribución geográfica de los aislados, con una concentración en la ciudad capital, puede no reflejar con precisión la prevalencia y diversidad de los mecanismos de resistencia en todas las regiones del país. La resistencia observada a la colistina y la tigeciclina en un subconjunto de aislados requiere investigación con tamaños de muestra más grandes para determinar el alcance de la resistencia a estos antibióticos de última línea.

En conclusión, los hallazgos del estudio proporcionan información sobre los mecanismos de resistencia circulantes, destacando la utilidad de la secuenciación del genoma completo en la caracterización de bacterias resistentes a múltiples fármacos. Los datos podrían facilitar a las estrategias de control de infecciones y enfoques terapéuticos personalizados, especialmente en entornos hospitalarios de alto riesgo. Estos hallazgos enfatizan la necesidad de medidas de vigilancia y de prevención y control de infecciones asociadas a la atención de la salud, para mitigar la propagación de patógenos altamente resistentes.

Contribuciones de autoría. Todos los autores declaran que cumplen los criterios de autoría recomendados por el ICMJE.

Roles de CRediT. NMT: Conceptualización, Supervisión; Metodología; Administración del Proyecto; Validación; Visualización; Escritura - borrador original; Escritura - revisión y edición. MMM: Validación; Curación de datos; Visualización; Escritura - revisión y edición. NW, VO, SB, JM, MJD: Análisis formal; Software; Curación de datos; Validación; Escritura - revisión y edición, PD: Investigación; Análisis; formal; Validación; Escritura - revisión y edición; AK, JI, MB, FG, CR, BS: Investigación; Recursos; Escritura - revisión y edición.

Financiación. El trabajo fue llevado a cabo en el marco de la Vigilancia Laboratorial de la Resistencia a los Antimicrobianos, cuya coordinación está a cargo del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, institución rectora de la salud publica en el país. La compra de los insumos y reactivos utilizados para la secuenciación de genoma completo fueron provistos por el MSPyBS, según licitación pública, como ente rector.

Conflictos de interés. Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

 https://doi.org/10.17843/rpmesp.2025.422.14293

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Etienne C. Americas Report Surge in Drug-Resistant Infections due to Misuse of Antimicrobials During Pandemic; 2021. https://www.paho.org/en/news/17-11-2021-americas-report-surge-drug-resistant-infections-due-misuse-antimicrobials-during.
2. Lynch JP 3rd, Clark NM, Zhanel GG. Escalating antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae: focus on carbapenemases. Expert Opin Pharmacother. 2021 Aug;22(11):1455-1473. doi: 10.1080/14656566.2021.1904891. Erratum in: Expert Opin Pharmacother. 2021 Oct;22(14):i-ii. doi: 10.1080/14656566.2021.1981568.
3. WHO. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461.
4. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. Emerg Infect Dis. 2014;20(7):1170-5. doi: 10.3201/eid2007.121004.
5. Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β-lactamases: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2012 Dec;67(12):2793-803. doi: 10.1093/jac/dks301.
6. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2005;55(6):1050-1. doi: 10.1093/jac/dki130.
7. Melgarejo-Touchet N, Brítez CM, Busignani S, Falcón M, López E. Molecular characterization of carbapenemases in Gram-negative bacilli circulating in hospitals of Paraguay. First quarter of 2021. Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, 2021; 19(2): 49–58. doi: 10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.02.49.
8. Pasteran F, Mora MM, Albornoz E, Faccone D, Franco R, Ortellado J, *et al.* Emergence of genetically unrelated NDM-1-producing Acinetobacter pittii strains in Paraguay. J Antimicrob Chemother. 2014 Sep; 69(9): 2575-8. doi: 10.1093/jac/dku139. PMID: 24793901.
9. Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Falcón M. Enterobacteria Carbapenem-resistant KPC by production, isolated in hospitals and Asunción and Central Department. Revista de Salud Pública del Paraguay. 2013; 3(1): 30-5.
10. Organización Panamericana de la Salud. Alerta epidemiológica. Emergencia e incremento de nuevas combinaciones de carbapenemasas en Enterobacterales en Latinoamérica y el Caribe. 22 de octubre de 2021. Disponible en: https://www.paho.org/es/documentos/alerta-epidemiologica-emergencia-e-incremento-nuevas-combinaciones-carbapenemasas.
11. Ministry of Public Health and Social Welfare of Paraguay. Antimicrobial section, Bacteriology and Mycology Department, Central Laboratory of Public Health. Increase in the isolation of gram-negative bacilli resistant to broad-spectrum antimicrobials in hospitals in Paraguay. 2021 Jun. https://www.mspbs.gov.py/portal/23539/alerta-por-resistencia-antimicrobiana-a-todos-los-laboratorios-del-pais.html.
12. Melgarejo Touchet N, Busignani S, Dunjo P, Brítez M, Kawabata A, Silvagni, *et al.* First report of double carbapenemases-producing Enterobacterales in hospitals of Paraguay. Year 2021. Mem Inst Investig Cienc Salud. 2021;19(3):35–43. doi:10.18004/mem.iics/1812-9528/2021.019.03.35.
13. Servicio Antimicrobianos; Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas; Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán". Protocolo de PCR multiplex para detección de carbapenemasas. Disponible en: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2021/01/Deteccion-CBP-Multiplex.pdf. (13)
14. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. PLoS Comput Biol. 2017 Jun 8;13(6):e1005595. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
15. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30: 2068-2069. doi: 10.1093/bioinformatics/btu153, disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24642063.
16. Hunt M, Mather AE, Sánchez-Busó L, Page AJ, Parkhill J, Keane JA, *et al.* ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. Microb Genom. 2017 Sep 4;3(10):e000131. doi: 10.1099/mgen.0.000131.
17. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012 Nov;67(11):2640-4. doi: 10.1093/jac/dks261.
18. Zankari E, Allesøe R, Joensen KG, Cavaco LM, Lund O, Aarestrup F. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. J Antimicrob Chemother. 2017; 72(10): 2764–8. doi: 10.1093/jac/dkx217.
19. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, *et al.* PlasmidFinder and pMLST: in silico detection and typing of plasmids. Antimicrob. Agents Chemother. 2014;58(7):3895-903. doi: 10.1128/AAC.02412-14.
20. Feldgarden M, Brover V, Gonzalez-Escalona N, Frye JG, Haendiges J, Haft DH, *et al.* AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. Sci Rep. 2021 Jun 16;11(1):12728. doi: 10.1038/s41598-021-91456-0.
21. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014 May 1;30(9):1312-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033.
22. Argimón S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, Glasner C, *et al.* Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. Microb Genom. 2016 Nov 30;2(11):e000093. doi: 10.1099/mgen.0.000093.
23. Lam MMC, Wyres KL, Wick RR, Judd LM, Fostervold A, Holt KE, *et al.* Convergencia de virulencia y MDR en un solo vector de plásmido en MDR Klebsiella pneumoniae ST15. J Antimicrob Chemother. 2019 May 1;74(5):1218-1222. doi: 10.1093/jac/dkz028.
24. Martins WMBS, Nicolas MF, Yu Y, Li M, Dantas P, Sands K, *et al.* Clinical and Molecular Description of a High-Copy IncQ1 KPC-2 Plasmid Harbored by the International ST15 Klebsiella pneumoniae Clone. mSphere. 2020 Oct 7;5(5): e00756-20. doi: 10.1128/mSphere.00756-20.
25. Rodrigues YC, Lobato ARF, Quaresma AJPG, Guerra LMGD, Brasiliense DM. The Spread of NDM-1 and NDM-7-Producing Klebsiella pneumoniae Is Driven by Multiclonal Expansion of High-Risk Clones in Healthcare Institutions in the State of Pará, Brazilian Amazon Region. Antibiotics (Basel). 2021 Dec 14;10(12):1527. doi: 10.3390/antibiotics10121527.
26. Benulič K, Pirš M, Couto N, Chlebowicz M, Rossen JWA, Zorec TM, *et al.* Whole genome sequencing characterization of Slovenian carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae, including OXA-48 and NDM-1 producing outbreak isolates. PLoS One. 2020 Apr 13;15(4):e0231503. doi: 10.1371/journal.pone.0231503.
27. Pasteran F, Faccone D, Rapoport M, Veliz O, Guerriero L, Gomez S, *et al.* Rápida diseminación de OXA-163 carbapenemasa, una variante emergente de OXA-48, en especies de Enterobacteriaceae en múltiples hospitales de Argentina: clones múltiples y problemas de detección. Abstr 22th Eur Congress Clin Microbiol Infect D. 2012.
28. Scherer J de S, Calvetti RA. Descrição de casos de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases subtipos Oxa-48 e NDM em hospital público de Porto Alegre. Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção. 2017;7(2):1-6. doi: 10.17058/reci.v7i2.6273.
29. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. J Antimicrob Chemother. 2012 Jul;67(7):1660-5. doi: 10.1093/jac/dks124.
30. López-Hernández I, García Barrionuevo A, Díaz de Alba P, Clavijo E, Pascual A. Characterization of NDM-1- and CMH-3-producing Enterobacter cloacae complex ST932 in a patient transferred from Ukraine to Spain. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2020;38(7):327-330. doi: 10.1016/j.eimc.2019.10.007.

31. Gao H, Liu Y, Wang R, Wang Q, Jin L, Wang H. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing Klebsiella pneumoniae from clinical settings. EBioMedicine. 2020 Jan;51:102599. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.102599.
32. Ahmed MAEE, Yang Y, Yang Y, Yan B, Chen G, Hassan RM, *et al*. Emergence of Hypervirulent Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Coharboring a blaNDM-1-Carrying Virulent Plasmid and a blaKPC-2-Carrying Plasmid in an Egyptian Hospital. mSphere. 2021 May 19;6(3):e00088-21. doi: 10.1128/mSphere.00088-21.
33. Li P, Liang Q, Liu W, Zheng B, Liu L, Wang W, *et al*. Convergence of carbapenem resistance and hypervirulence in a highly-transmissible ST11 clone of K. pneumoniae: An epidemiological, genomic and functional study. Virulence. 2021 Dec;12(1):377-388. doi: 10.1080/21505594.2020.1867468.
34. Lawlor MS, O'connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for Klebsiella pneumoniae during pulmonary infection. Infect Immun. 2007 Mar;75(3):1463-72. doi: 10.1128/IAI.00372-06.
35. Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. The role of Klebsiella pneumoniae rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. Microbiology. 2011 Dec;157(Pt 12):3446-3457. doi: 10.1099/mic.0.050336-0.