

Introducción

Los niveles de resistencia antimicrobiana en cepas bacterianas de origen clínico en Perú son preocupantes, destacando las especies *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. De forma particular, las cepas multidrogo-resistente (MDR) o extremadamente drogo-resistente (XDR) de estas especies son de difícil tratamiento, puesto que hay pocas opciones en la práctica clínica para lidiar con infecciones por estos microorganismos.

El secuenciamiento del genoma completo es una poderosa herramienta que brinda una gran cantidad de información para propósitos de vigilancia epidemiológica molecular, sobre todo en el área de resistencia antimicrobiana. Un ejemplo es la capacidad de realizar genómica comparativa, al analizar genomas completos para establecer relaciones filogenómicas entre cepas de una misma especie, con la finalidad de establecer si están altamente relacionadas; ello puede establecer si dichas cepas provienen de un mismo brote o no.

Por los motivos antes expuestos, el presente estudio tuvo como objetivo realizar árboles filogenómicos de *A. baumannii*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* MDR/XDR aislados de cepas clínicas de Perú.

Metodología

Se seleccionaron 23 cepas clínicas en total de *Acinetobacter baumannii* (5), *Klebsiella pneumoniae* (7) y *Pseudomonas aeruginosa* (11). Las cepas fueron recolectadas principalmente en el periodo 2021-2022, provenientes de seis centros de salud diferentes en Lima, Piura y Arequipa; siendo todas clasificadas como MDR/XDR según las definiciones de Magiorakos et al. [1]. Se realizó extracción de ADN a partir de cultivos axénicos mediante el kit ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit (Zymo Research, California, Estados Unidos de América).

Las librerías genómicas se obtuvieron con el kit Illumina DNA Prep (Illumina, California, Estados Unidos de América) y el secuenciamiento se llevó a cabo en una plataforma NextSeq 550 (Illumina, California, Estados Unidos de América), con una longitud de lectura 2x150 y utilizando las especificaciones sugeridas por el fabricante. El control de calidad de las reads se realizó con FastQC. El ensamblaje *de novo* se realizó usando SPAdes y la anotación de genes se obtuvo con Prokka. La determinación del Multi-Locus Sequence Typing (MLST) y los genes de resistencia antimicrobiana se realizaron mediante la herramienta MLST tool y AMRfinderplus, respectivamente.

Para la obtención de los árboles filogenómicos, el 19 de marzo de 2024 se descargaron los genomas disponibles de cepas aisladas en Perú de *A. baumannii* (4), *K. pneumoniae* (70) y *P. aeruginosa* (19), desde el portal web NCBI Isolates Browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates>). Luego se obtuvo por especie un *core-gene alignment* incluyendo las cepas del estudio mediante Roary. Se eliminaron los sitios no informativos mediante SNP-sites, La construcción *per se* de los árboles filogenómicos se realizó con IQ-TREE, con selección automática del modelo y Bootstrap ultra rápido con 1000 repeticiones. La visualización se realizó mediante FigTree.

Tabla 1. Características generales de las cepas del estudio

Cepa	Especie	Ciudad	Año	Secuenciotipo	β-lactamasas
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Lima	2021	79	<i>bla</i> _{OXA-23} , <i>bla</i> _{OXA-65} , <i>bla</i> _{ADC}
2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Lima	2021	1056	<i>bla</i> _{OXA51-like} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{ADC}
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Piura	2021	2	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{ADC-73} , <i>bla</i> _{TEM-1}
4	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Lima	2021	2	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{ADC-73} , <i>bla</i> _{TEM-1}
5	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Lima	2021	2	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{ADC-73} , <i>bla</i> _{TEM-1}
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	2604	<i>bla</i> _{OXA-1028} , <i>bla</i> _{PDC-8}
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piura	2021	111	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{PDC-3} , <i>bla</i> _{OXA-395}
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	1621	<i>bla</i> _{OXA-848} , <i>bla</i> _{PDC-12}
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	1621	<i>bla</i> _{OXA-848} , <i>bla</i> _{PDC-12}
10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Arequipa	2021	179	<i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{IMP-74} , <i>bla</i> _{OXA-396} , <i>bla</i> _{PDC-8}
11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	111	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{PDC-3} , <i>bla</i> _{OXA-395}
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	111	<i>bla</i> _{IMP-18} , <i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{VIM-2} , <i>bla</i> _{PDC-3} , <i>bla</i> _{OXA-395}
13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	357	<i>bla</i> _{AER} , <i>bla</i> _{IMP-74} , <i>bla</i> _{OXA-848} , <i>bla</i> _{PDC-11}
14	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	260	<i>bla</i> _{OXA-2} , <i>bla</i> _{PDC-117} , <i>bla</i> _{OXA-804}
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2022	357	<i>bla</i> _{AER} , <i>bla</i> _{IMP-74} , <i>bla</i> _{OXA-848} , <i>bla</i> _{PDC-11}
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lima	2021	309	<i>bla</i> _{PDC-19a} , <i>bla</i> _{OXA-1035}
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lima	2021	13	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Piura	2021	11	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-11}
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lima	2021	147	<i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-28} , <i>bla</i> _{NDM-1}
20	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lima	2021	15	<i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}
21	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lima	S.F.	147	<i>bla</i> _{SHV-11} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{TEM-26} , <i>bla</i> _{NDM-1}
22	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lima	2022	15	<i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}
23	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lima	S.F.	15	<i>bla</i> _{SHV-28} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-1}

S.F.: Sin fecha.

Resultados y discusión

A partir de los árboles filogenómicos se puede apreciar una agrupación de las cepas del estudio con los genomas publicados en Perú, consistente a nivel de secuenciotipo. Aparte del ST-2 y ST-79 en *A. baumannii*, se pudo encontrar el ST-1056, un hallazgo inusual.



Fig. 1. Árboles filogenómicos de *Acinetobacter baumannii* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) y *Klebsiella pneumoniae* (C). Las cepas propias del estudio están resaltadas en recuadro rojo.

En *P. aeruginosa* es notoria la presencia de ST-111, un clon considerado de alto riesgo que posee las carbapenemasas VIM/IMP [2]. En *K. pneumoniae*, es preocupante la presencia del clon ST-147, el cual es resistente a múltiples antibióticos y que es considerado una amenaza emergente para la salud pública [3]. En general para las tres especies, al evaluar los árboles filogenómicos se pudo apreciar una distribución variada de las cepas; y que éstas no se encontraban asociadas con únicos clusters.

Conclusiones

- En las tres especies, se encontró una diversidad de secuenciotipos a partir de las cepas secuenciadas, comprobándose además la presencia de varios genes de resistencia a carbapenemes.
- Al comparar con los genomas publicados por especie en Perú se pudo apreciar que las cepas del estudio no se agrupaban en un mismo cluster, lo cual sugiere que no provienen de un único brote. Ello soporta la hipótesis de múltiples clones resistentes co-circulantes en el país de las especies referidas.

Referencias

1. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

2. Molina-Mora JA, Chinchilla-Montero D, García-Batán R, García F. Genomic context of the two integrons of ST-111 *Pseudomonas aeruginosa* AG1: A VIM-2-carrying old-acquaintance and a novel IMP-18-carrying integron. Infect Genet Evol. 2021;89:104740. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104740.

3. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JDD. Emerging Antimicrobial-Resistant High-Risk *Klebsiella pneumoniae* Clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother. 2020;64(10):e01148-20. doi: 10.1128/AAC.01148-20.