



TESÁI HA TEKÓ  
PORÁVE  
Moteromochá  
Ministerio de  
SALUD PÚBLICA  
Y BIENESTAR SOCIAL



TETÃ REKUÁI  
GOBIERNO NACIONAL

Paraguay  
de la gente



OPS

# Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente

Reunión bienal de la Red Latinoamericana y del Caribe para la Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA)  
Brasilia, Brasil, 21 -23 octubre 2019

Nancy Lorena Melgarejo Touchet  
Dpto. Bacteriología y Micología  
Laboratorio Central de Salud Pública  
Asunción, Paraguay





36 Años  
Laboratorio Central de Salud Pública





TESÁI HA TEKO  
PORÁVE  
Merenondcha  
Ministerio de  
SALUD PÚBLICA  
Y BIENESTAR SOCIAL



TETÃ REKUÁI  
GOBIERNO NACIONAL

Paraguay  
de la gente

## Laboratorio Central de Salud Pública:

Dpto. Bacteriología y  
Micología:

Coordinador de redes de  
vigilancia en Paraguay

### Laboratorios del:

- \* Hosp. Nacional (ATM-SIREVA-ENT)
- \* IMT (ATM-SIREVA)
- \* Hosp. de Clínicas (ATM)
- \* IPS (ATM-SIREVA)
- \* H.G. Pediátrico (ATM-ENT-SIREVA)
- \* Cruz Roja Paraguaya (ATM)
- \* Meyerlab (ATM- ENT)
- \* Díaz Gill (ATM)
- \* Hosp. Bautista (ATM)
- \* Hosp. Militar (ATM)
- \* Hosp. Policial (ATM)
- \* CEM (ATM)
- \* Lab. Curie (ATM)
- \* La Costa (ATM)

\* Hosp. Filadelfia (ATM-ENT)

\* Hosp. Loma Plata (ATM)

\*Lab. HR C. del Este (ATM-SIREVA)

\*HR AP, Tesai (SIREVA)

Enteropatógenos:  
Lab. Riera, S. Italiano, La Costa  
H. Militar, CNTox,  
INAN, INTN, SENACSA  
Munic. Asunción, SENAWE

Lab. Universidad de Itapúa (Encarnación) ATM

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

### INTRODUCCION...

La RAM es un fenómeno de defensa que ocurre naturalmente en muchos microbios en varios nichos ecológicos (Martin y Liras 1989), y se detecta en microorganismos de diferentes orígenes, humano, animal, vegetal, y medio ambiente.

Grandes preocupaciones generadas por el impacto de la RAM en el medio ambiente: Uso generalizado de antimicrobianos en la agricultura y ganadería (consumo humano); la liberación de antimicrobianos al medio ambiente (compañías productoras o instituciones que utilizan)...antibióticos que expiran; eliminación de aguas residuales de hospitales, frigoríficos, etc, sin tratamiento previo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha declarado que la RAM es una de las amenazas mundiales más urgentes para la salud pública.

# Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

## OBJETIVOS...

### ● General:

Relacionar aislamientos de *Escherichia coli* de las infecciones en humanos con los aislamientos de muestras de agua de los sitios seleccionados.

### ● Específicos:

- Estudiar los genes de resistencia en los aislamientos de *E. coli* estudiados.
- Evaluar los recuentos de *E. coli* en las muestras ambientales de los distintos puntos de toma de muestra.
- Analizar secuencia de genoma completo de las cepas de *E. coli* estudiadas.

# Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

## MATERIALES Y METODOS



## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- \* **CEPAS A ESTUDIAR:** *Escherichia coli*
- \* **CARACTERÍSTICAS:** R a cefalosporinas (BLEE)  
R a quinolonas  
R a carbapenemes (carbapenemasa)
- \* **ORIGEN:** medio ambiente (agua)  
humano (ambulatorio)  
humano (hospitalario)



## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **COORDINADOR:** Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Dpto. Bacteriología y Micología. Sección Antimicrobianos. Asunción. Paraguay
- **COLABORADORES:** Laboratorios de Bacteriología de 5 centros. Asunción Paraguay
  - Clínica Nanawa- Instituto de Previsión Social
  - Hospital Central – Instituto de Previsión Social
  - Instituto de Medicina Tropical
  - Instituto de Enfermedades Respiratorias y del Ambiente
  - Centro Médico La Costa

<https://www.mspbs.gov.py/lcsp/19086/socializacion-del-protocolo-de-investigacion-vigilancia-de-la-diseminacion-de-bacterias-con-resistencia-a-los-antimicrobianos-ram-en-el-medioambiente.html>



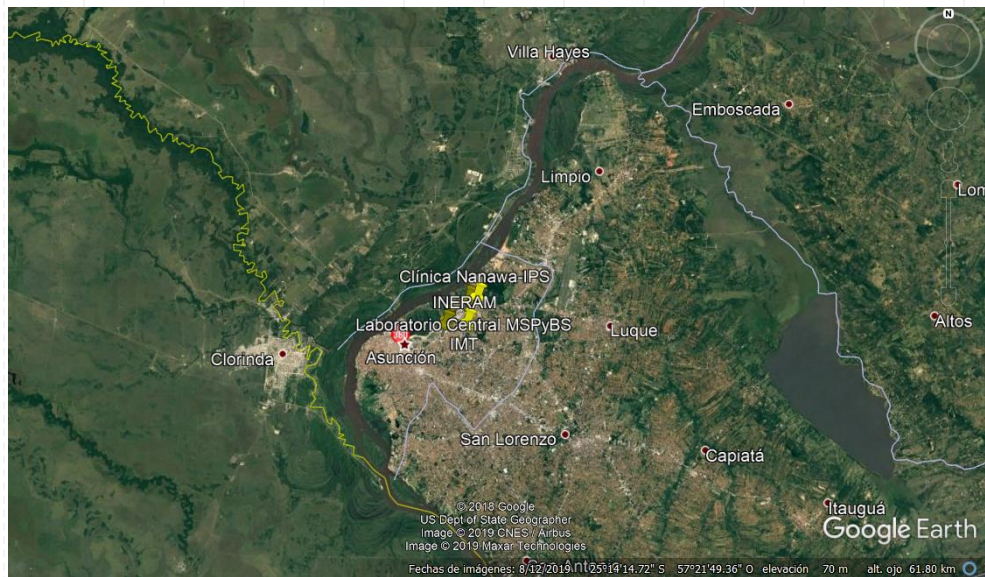
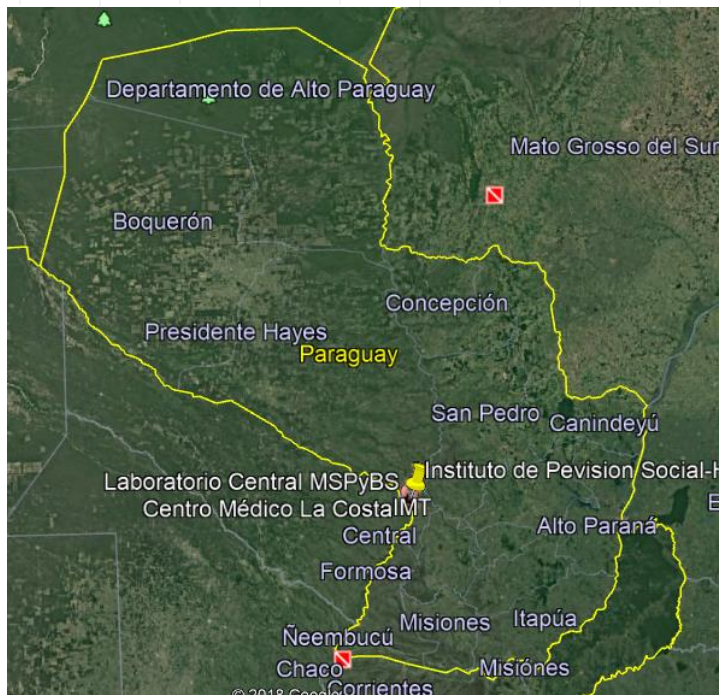
Fecha: 06 Ago, 2019  
Socialización Del Protocolo De Investigación "Vigilancia De La Diseminación De Bacterias Con Resistencia A Los Antimicrobianos (RAM) En El Medioambiente"





## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:** medio ambiente (agua)...
  - Cauce del arroyo Mburicao,
  - desembocadura Mburicao-río Paraguay,
  - río Paraguay cuesta abajo



- Paraguay: 406.752 Km<sup>2</sup> y 7.053.000 hbs.
- Central: 2.465 Km<sup>2</sup> y 2.100.000 hbs.
- Asunción: 117 Km<sup>2</sup> y 525.000 hbs.



TESÁI HA TEKO  
PORÁVE  
Moromoncha  
Ministerio de  
SALUD PÚBLICA  
Y BIENESTAR SOCIAL

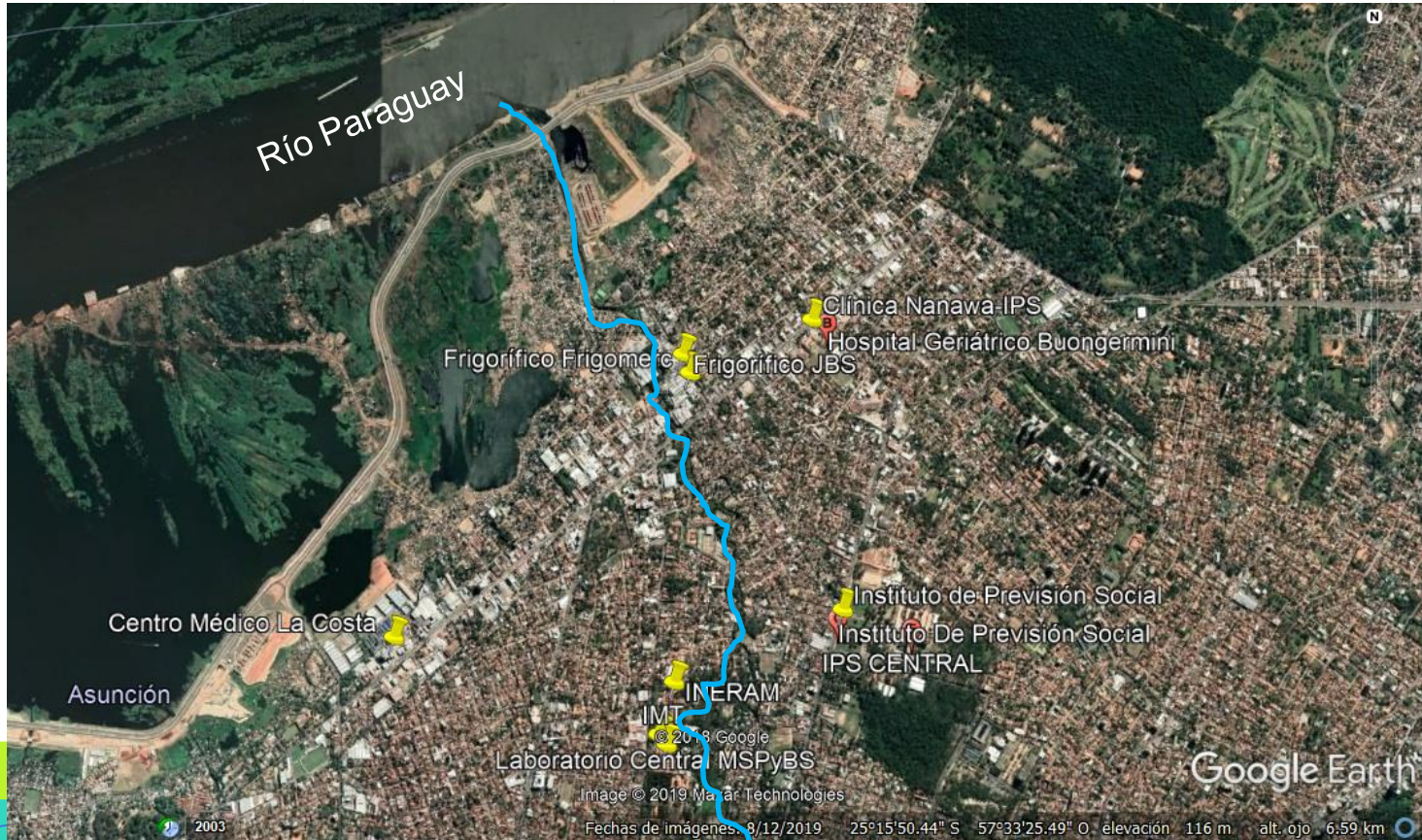


TETÃ REKUÁI  
GOBIERNO NACIONAL

Paraguay  
de la gente



OPS



## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:**

medio ambiente (agua)...

- Tomar 20-30 cm. por debajo de la superficie
- Registrar temperatura y pH
- Durante el transporte al laboratorio, almacene las muestras a 2-8 ° C
- Procesar en un plazo de 24 horas.
- Referenciar sitio de toma de muestra
- Se puede encontrar más información en la norma ISO 19458:2007.

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:**  
medio ambiente (agua)...

**Cuadro 1 - resumen de elementos del proyecto**

Organismos diana y medios de cultivo bacteriológico	
Organismos diana	<i>E. coli</i> productor de BLEE, de Cmasa o resistente a FQ
Medio selectivo para <i>E. coli</i>	Agar triptona bilis glucurónico (TBX) sin suplementar
Medio selectivo para <i>E. coli</i> productor de BLEE	TBX suplementado con 4ug/ml cefotaxima (CTX)
Medio selectivo para <i>E. coli</i> productor de carbapenemasa	TBX suplementado con 1 ug/ml meropenem (MEM)
Medio selectivo para <i>E. coli</i> resistente a fluoroquinolonas	TBX suplementado con 0.25 ug/ml ciprofloxacina (CIP)

Procedimientos microbiológicos para el aislamiento de *E. coli* productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas y resistentes a fluoroquinolonas en aguas superficiales y residuales

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:** medio ambiente (agua)...

La recomendación del fabricante del TBX sobre la apariencia de las colonias requiere incubación a 37° C durante 18-24 horas.

Agar tipo	Microorganismo	Apariencia
Agar TBX con o sin CTX/MEM o CIP	<i>E. coli</i>	Colonias <b>verdeazuladas</b>
	No- <i>E. coli</i>	Colonias <b>blancas</b>

Procedimientos microbiológicos para el aislamiento de *E. coli* productor de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, carbapenemasas y resistentes a fluoro quinolonas en aguas superficiales y residuales

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

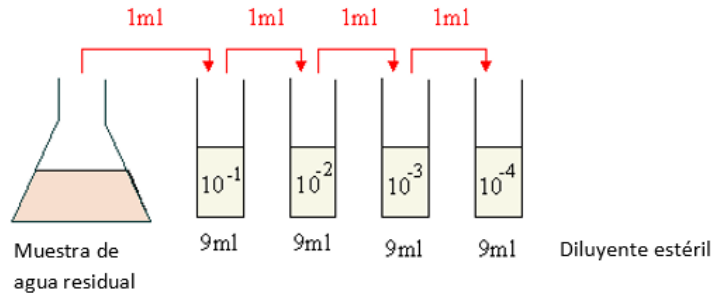
- **ORIGEN:**  
medio ambiente (agua)...

Análisis	
Análisis cuantitativo	<p>Análisis cuantitativo por cultivo en placa por extensión o métodos de filtrado con membrana.</p> <p>Concentraciones de todas las <i>E. coli</i> y las <i>E. coli</i> productoras de BLEE, Cmasa o resistentes a FQ (UFC / 100 ml)</p> <p>Proporciones de <i>E. coli</i> que son presuntamente portadoras de BLEE, Cmasa o resistentes a FQ (<u>BLEE</u>: concentración de <i>E. coli</i> productor de BLEE; o <u>Cmasa</u>: concentración de <i>E. coli</i> productor de Cmasa; o resistente a FQ: concentración de <i>E. coli</i> resistentes a FQ. Cada una dividida por la concentración de <i>E. coli</i> total)</p>
Purificación y aislamiento de presuntos organismos diana.	<p>Seleccione 5 colonias representativas de las placas TBX/cefotaxima/meropenem/ciprofloxacina y subcultive hasta purificación. Para obtener aislamientos puros, las colonias se deben rayar en el mismo medio en el que se seleccionó la colonia original, o en agar sangre.</p>

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:**  
medio ambiente (agua)...

Figura 2: procedimiento para hacer las diluciones seriadas al décimo.



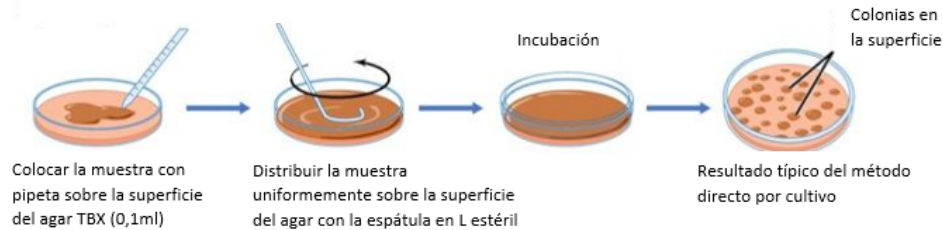


## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:**  
medio ambiente (agua)...

Siembre todas las diluciones de cada muestra en todas las placas indicadas anteriormente (ver Medios de cultivo sólido). Las placas se incubarán invertidas en una estufa de 35-37° C por 18 a 24 horas. Para ver más detalles del método de cultivo directo en placa por extensión consultar la norma ISO 8199:2005.

Figura 4: Método de cultivo directo en placa por extensión



## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:**  
medio ambiente (agua)...

Confirmación de <i>E. coli</i>	Identificación bioquímica convencional o automatizada. Todos los aislamientos confirmados como <i>E. coli</i> serán almacenados a $-70^{\circ}\text{C}$ .
Confirmación de BLEE, Cmasa o resistencia a FQ	Según las normas CLSI:  <b>Difusión por disco:</b> <i>BLEE</i> : prueba de sinergia de doble disco o prueba de difusión de discos combinados; <i>Cmasa</i> : prueba de sinergia de doble disco (inh con ac. Borónico y EDTA), Método de mCIM. <i>FQ</i> : ensayo por disco de ciprofloxacina, ac. nalidíxico y levofloxacina.  <b>Microdilución en caldo incluyendo sistemas automatizados o ensayo de blue carba.</b>

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

- **ORIGEN:**  
medio ambiente (agua)...

Cuadro 3: Control de calidad interno de las placas de siembra

Resultados esperados del control de calidad de las placas de TBX

	TBX sin ATB	TBX con CIP	TBX con CTX	TBX con MEM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	+	+	+	-
<i>K. pneumoniae</i> BAA1705	+	+	+	+

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

\* **Secuenciación de genoma completo:** *Escherichia coli*

**ORIGEN:** medio ambiente (agua)  
humano (ambulatorio)  
humano (hospitalario)

100 aislamientos

## Vigilancia de la diseminación de bacterias con resistencia a los antimicrobianos en el medioambiente.

### RESULTADOS ESPERADOS

- Aislamientos (*E. coli*) resistentes a los ATM.
- Relación genética entre las cepas de *E. coli* de origen humano y ambiental (?).



TESÁI HA TEKO  
PORÁVE  
Moteromochá  
Ministerio de  
SALUD PÚBLICA  
Y BIENESTAR SOCIAL



■ TETÃ REKUÁI  
■ GOBIERNO NACIONAL

Paraguay  
de la gente



OPS



Muchas Gracias !!

Contacto: antimicrobiano@lensp.gov.py