



# Relación clonal y detección del gen $bla_{KPC}$ en cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, en un hospital de Venezuela

Dianny Martínez, Yasmína Araque, Hectorina Rodulfo, Luisa Caña, José García, Diorelis González, Lucy Rodríguez y Marcos De Donato

Hospital Universitario Antonio Patricio de Alcalá. Cumaná, Venezuela Laboratorio de Bacteriología (DM, LC, JG, DG, LR). Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Cumaná, Venezuela.

Postgrado en Biología Aplicada (YA).

Instituto de Biomedicina y Ciencias Aplicadas Dra. Susan Tai. Cumaná, Venezuela. Laboratorio de Genética Molecular (HR, MDD).

Los investigadores declaramos que no existe conflicto de intereses.

Esta investigación fue parcialmente financiada por el proyecto Misión Ciencia (G-2007001442).

Recibido: 29 de abril de 2016

Aceptado: 6 de septiembre de 2016

Correspondencia a:  
Dianny Martínez R.  
naitava@hotmail.com

## Clonal relationship and detection of $bla_{KPC}$ gene in strains of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems, at a hospital in Venezuela

In order to study the clonal relationship and  $bla_{KPC}$  gene detection in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems, we analyzed 22 clinical isolates of *K. pneumoniae* with resistance to imipenem and/or meropenem, isolated in the laboratory of bacteriology at the University Hospital “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) from the Cumaná city, Sucre state, Venezuela, for a period of five consecutive years. Susceptibility to different antimicrobials was determined, and the presence of carbapenemases was detected by modified Hodge method, phenyl boronic acid synergy and combination discs.  $bla_{KPC}$  gene detection was conducted by polymerase chain reaction and the clonal relationship was determined by pulsed field electrophoresis. High rates of antimicrobial resistance were found, five strains were negative, at least one phenotypic method, and all carried the  $bla_{KPC}$  gene. Clonal spread was observed only in the intensive care unit (ICU), while in other services, polyclonality was found. We concluded that  $bla_{KPC}$  gene is present in *K. pneumoniae* strains resistant to carbapenems isolated in the HUAPA and clonal spread it was only in the ICU.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, KPC, pulsed field electrophoresis.

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*, KPC, electroforesis de campo pulsado.

## Introducción

El empleo frecuente de carbapenémicos en las últimas dos décadas, sumado a la transmisibilidad de determinantes de resistencia mediada por elementos genéticos móviles como plásmidos o transposones, ha contribuido con la emergencia de enterobacterias resistentes a carbapenémicos. Actualmente estas bacterias se consideran un problema de salud pública mundial<sup>1,2</sup>.

La resistencia a carbapenémicos puede ocurrir cuando un aislado produce una  $\beta$ -lactamasa tipo AmpC o una  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE), en combinación con pérdida de porinas; sin embargo, la producción de enzimas hidrolizantes de carbapenémicos (carbapenemasas) es el principal mecanismo de resistencia<sup>1,3</sup>. En los últimos años, ha venido incrementándose en el mundo el reporte de enterobacterias productoras de carbapenemasas, principalmente *Klebsiella pneumoniae*<sup>4,5</sup>.

Las carbapenemasas clase A, grupo 2f, de acuerdo a la clasificación funcional<sup>6</sup>, son enzimas monoméricas que se denominan serino-carbapenemasas debido a que poseen un residuo de serina en su sitio activo. Estas enzimas son capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, carbapenémicos y monobactámicos, y la inhibición con

ácido clavulánico, tazobactam o sulbactam es variable. Dentro de las serino-carbapenemasas, las KPC, del inglés “*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*” son las más frecuentemente encontradas en todo el mundo y se han aislado principalmente en *K. pneumoniae*<sup>7</sup>. La primera cepa de *K. pneumoniae* productora de KPC fue aislada en 1996 en Carolina del Norte, E.U.A.<sup>8</sup>, posteriormente, se han reportado en otros países como China<sup>9</sup>, Francia<sup>10</sup> y Colombia<sup>11</sup>, entre otros. Las serino-carbapenemasas KPC están codificadas por el gen plasmídico  $bla_{KPC}$ . Este gen está localizado principalmente en el elemento transponible Tn4401, que facilita la transferencia entre plásmidos de bacterias de la misma o diferente especie<sup>4,10,12</sup>; actualmente existen reportes de este gen en otras localizaciones<sup>13,14</sup>. En Latinoamérica el primer reporte de *K. pneumoniae* con el gen  $bla_{KPC}$  fue en Colombia en el año 2006<sup>11</sup>. En Venezuela, el gen se encontró por primera vez en Caracas, en cepas de *K. pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* aisladas durante los años 2009 y 2010<sup>15</sup>. En Cumaná, la primera KPC informada, se encontró en una cepa de *K. pneumoniae* aislada en 2009 en una paciente internada en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA)<sup>16</sup>.

En las instituciones de salud donde han sido reportados



brotes de *K. pneumoniae* productoras de KPC, se ha encontrado, generalmente, la diseminación de un único clon; es por ello que además de la detección del gen, es necesaria la realización de estudios de tipificación molecular, utilizando técnicas como la electroforesis en campo pulsado (ECP), técnica estándar de referencia para la tipificación molecular de la mayoría de las bacterias de importancia clínica, por su elevado poder de discriminación y excelente reproducibilidad<sup>3,17,18</sup>.

Aunado a su capacidad de causar brotes, las bacterias productoras de carbapenemasa KPC han sido asociadas con alto porcentaje de falla terapéutica y tasas de mortalidad de hasta 50%, principalmente en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados por largos períodos en unidades de cuidados intensivos<sup>1,7</sup>. Por todas las razones antes descritas, se realizó esta investigación con el objetivo de evaluar la relación clonal, a través del método de ECP, y la presencia del gen *bla*<sub>KPC</sub> en aislados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, en el HUAPA, Cumaná, Estado Sucre, Venezuela.

## Material y Método

### Cepas bacterianas

Para la presente investigación se incluyeron 22 cepas no duplicadas de *K. pneumoniae* con resistencia o resistencia intermedia a imipenem y/o meropenem, aisladas a partir de diferentes muestras clínicas recibidas para cultivos, en el laboratorio de bacteriología del HUAPA, durante un período de cinco años continuos, comprendido entre junio de 2009 y junio de 2014. Las cepas fueron conservadas por el personal del mencionado laboratorio, en tubos con agar Luria Bertani a temperatura ambiente y fueron referidas al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Biomedicina y Ciencias Aplicadas Dra. "Susan Tai", a fin de realizar investigación molecular de resistencia a carbapenémicos.

### Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

Se determinó la susceptibilidad a los antimicrobianos de acuerdo al método de difusión con discos, siguiendo los lineamientos establecidos por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI)<sup>19</sup>. Los discos de antimicrobianos ensayados fueron: amoxicilina/ácido clavulánico (20/10 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), ertapenem (10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), cefepima (30 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), cefoxitina (30 µg), de la marca comercial OXOID, y aztreonam (30 µg), ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg) y ácido nalidíxico (30 µg) de la marca comercial BBL. De igual manera, se llevó a

cabo el procedimiento de dilución en agar descrito en el documento M07-A10 del CLSI<sup>20</sup>, para determinar la concentración inhibitoria mínima a imipenem (Merck Sharp & Dohme), meropenem (Astrazeneca S.A.) y ertapenem (Merck Sharp & Dohme).

### Detección de carbapenemasas por métodos fenotípicos

Se realizó mediante los métodos de Hodge modificado<sup>19</sup>, sinergia con ácido fenil borónico (AFB)<sup>21</sup> y combinación de discos<sup>22</sup>.

### Detección del gen *bla*<sub>KPC</sub> mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC)

La extracción de ADN genómico se llevó a cabo mediante el *kit* de purificación Wizard Genomic DNA, de Promega, siguiendo las especificaciones del fabricante. Para llevar a cabo la RPC, se preparó una mezcla de reacción con 3 µl de tampón de RPC 5X, 0,9 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1,5 µl de cada desoxirribonucleótido trifosfato, 0,15 µl de cada uno de los oligonucleótidos KPC- F 5'- CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' y KPC-R 5'- CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3', que permiten amplificar un producto de 798 pb, 0,12 µl de *Taq* polimerasa (PROMEGA), 1 µl de ADN genómico bacteriano y 8,18 µl de agua destilada estéril libre de nucleasas, para un volumen final de 15 µl. La desnaturalización inicial se llevó a cabo a 94 °C por 4 min, con 36 ciclos repetidos de desnaturalización a 94 °C por 30 seg, hibridación a 66 °C por 40 seg y extensión a 72 °C por 50 seg, con un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min, utilizando un termociclador Master Cycler<sup>23</sup>. Los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2%, luego se colorearon con bromuro de etidio (0,5 µg.ml<sup>-1</sup>) en tampón TBE 1X, durante 30 min a 10 V.cm<sup>-1</sup>. Para estimar el tamaño de los fragmentos de ADN resultantes, se utilizó un marcador de peso molecular con bandas de concentración definidas (INVITROGEN), finalmente fueron observados por transiluminación con luz ultravioleta y fotografiados.

### Determinación de la relación clonal mediante electroforesis en campo pulsado (ECP)

Se llevó a cabo en 22 cepas, utilizando el equipo Guefast-06 (NEURONIC S.A.) y siguiendo el protocolo para *K. pneumoniae* descrito por Garrido<sup>24</sup> con modificaciones.

### Preparación del ADN inmovilizado

Las cepas de *K. pneumoniae* se subcultivaron en agar Mueller Hinton (BBL) durante toda la noche. Luego se colectaron en 5 ml de una solución fría de NaCl al 0,5% y EDTA al 0,01 M pH 8 (solución de lavado) y se procedió a



ajustar cada inóculo a una densidad óptica entre 0,3 y 0,8 a una longitud de onda de 620 nm utilizando un turbidímetro (Smart2-La Motte), de tal manera que la concentración final de células bacterianas fuera de  $2,0 \times 10^9$  céls/ml<sup>-1</sup>, aproximadamente. Seguidamente, se centrifugó a 2.000 g por 10 min, se descartó el sobrenadante y el sedimento se re-suspendió en 1 ml de solución de lavado, se centrifugó nuevamente a las mismas condiciones anteriores y se descartó el sobrenadante; luego, el sedimento fue sometido a un calentamiento a 80 °C por 5 min y se mezcló rápidamente con 190 µl de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) al 1%, fundida y estabilizada a 50 °C. Utilizando el molde para la fabricación de mini bloques, se prepararon minibloques de 3 x 3 x 0,7 mm.

### Lisis y desproteínización

Posteriormente, las células bacterianas inmovilizadas en los mini-bloques, se sometieron a un proceso de lisis y desproteínización, colocándolas en 1 ml de solución que contenía Tris al 0,01 M; EDTA al 0,1 M; sarcosyl al 1%; nonidet P40 al 1% y urea al 4M pH 9,5. Se incubaron por 2 h a 45 °C, luego se eliminó esta solución y se lavaron los mini-bloques dos veces con 2 ml de agua destilada estéril atemperada a 45 °C y cuatro veces con 3 ml de una solución de Tris-HCL al 0,01 M; EDTA al 0,1 M pH 8,0, también atemperada a 45 °C. Posteriormente, los mini-bloques se conservaron en 3 ml de solución Tris-HCL al 0,01 M; EDTA al 0,1 M pH 8,0 y se mantuvieron a 4 °C hasta el momento de la digestión.

### Digestión del ADN inmovilizado con enzimas de restricción

Un mini-bloque de cada aislado en estudio se colocó, cuidadosamente, en un tubo de microcentrifuga y se incubó a temperatura ambiente por 10 min con 1 ml de solución Tris-HCL 0,01 M y EDTA 0,05 M pH 8,0 repitiendo dos veces este paso. Luego, se retiró la solución y se añadió 100 µl de tampón de digestión enzimático SH 1X, proporcionado por el fabricante (Sigma), para incubar a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente, se retiró el tampón y se añadió 100 µl de tampón de digestión enzimático SH 1X que contenía 1,5 µl de la enzima de restricción *Xba*I (Sigma) que reconoce la secuencia 5'T/CTAGA3'. La mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C en baño termoregulado. La reacción se detuvo reemplazando el tampón de digestión enzimático por 500 µl de Tris-HCL al 0,01 M; EDTA al 0,1 M pH 8,0 y se guardó en refrigeración hasta el día siguiente para la realización de la ECP.

### Separación de los fragmentos de restricción del ADN

La ECP se realizó en la cámara miniCHEF del equipo Guefast-06 (NEURONIC, S.A). Los fragmentos de ADN se separaron en un campo eléctrico de 10 V.cm<sup>-1</sup> durante

5 h, 30 min, en un gel de agarosa al 1,5% de 7 x 5 x 0,5 cm sumergido en tampón de electroforesis TBE 0,5X, a una temperatura de 20 °C. Se utilizó un marcador de peso molecular ADN lambda (Sigma), con bandas de 50-1.000 kb. Posteriormente, el gel se coloreó con bromuro de etidio 0,5 µg.ml<sup>-1</sup> (Sigma) durante 30 min, se visualizó en un transiluminador UV y se fotografió.

### Control de calidad

Para el control de calidad de los carbapenémicos se utilizó una cepa certificada de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 y para el resto de los discos de antimicrobianos se empleó *Escherichia coli* ATCC® 25922. Como control positivo de KPC se utilizó la cepa de *K. pneumoniae* 4238-09 HUAPA, confirmada molecularmente como portadora del gen *bla*<sub>KPC</sub> en el laboratorio de caracterización de mecanismos de resistencia bacteriana de la Escuela de Bioanálisis de la Universidad Central de Venezuela, Caracas.

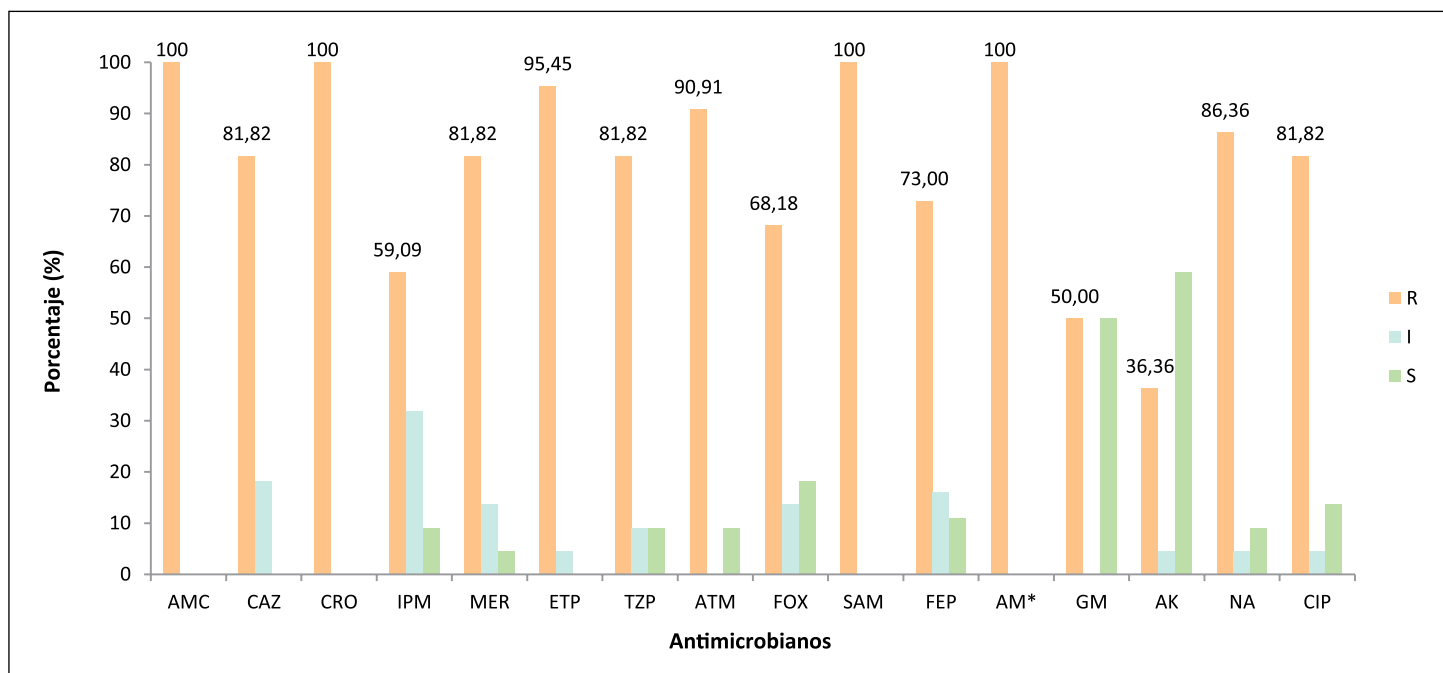
### Análisis de datos

Los resultados de susceptibilidad antimicrobiana, detección de carbapenemasas y del gen *bla*<sub>KPC</sub>, se expresaron de manera descriptiva a través de tablas y figuras<sup>25</sup>. El análisis de los perfiles obtenidos por ECP y la construcción del dendrograma fue realizado mediante análisis computarizado, utilizando el software GuefastScan® (NEURONIC S.A.), acorde con el coeficiente de similitud de Dice y el algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic averages*). La interpretación se realizó basándose en los criterios establecidos por Tenover y cols.<sup>17</sup>, por lo que aquellas cepas con porcentaje de similitud igual o mayor a 80% se consideraron clones relacionados genéticamente.

## Resultados

Las cepas presentaron 59,1% de resistencia y 32,0% de resistencia intermedia a imipenem. Con respecto a meropenem, se obtuvo 81,8% de resistencia y 14,0% de resistencia intermedia y ninguna de las cepas fue sensible a ertapenem. Además de los carbapenémicos, las cepas también presentaron resistencia al resto de los β-lactámicos, principalmente a ceftriaxona (100%) y aztreonam (91,0%). Con respecto a los antimicrobianos no β-lactámicos ensayados, los microorganismos presentaron 81,8% de resistencia a ciprofloxacina mientras que, la más baja resistencia en las cepas se obtuvo para gentamicina (50,0%) y amikacina (36,4%) (Figura 1).

La determinación de la CIM a carbapenémicos reveló la existencia de dos cepas (Kp10 y Kp19) sensibles a ertapenem y meropenem, no así a imipenem, para el cual,



**Figura 1.** Susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico, CAZ: ceftazidima, CRO: ceftriaxona, IPM: imipenem, MER: meropenem, ETP: ertapenem, TZP: piperacilina/tazobactam, FOX: ceftoxitina, ATM: aztreonam, SAM: ampicilina/ sulbactam FEP: cefepime, AM\*: ampicilina (marcador de resistencia natural en *K. pneumoniae*), AK: amikacina, GM: gentamicina, NA: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina.

todas las cepas fueron resistentes, obteniendo la CIM más elevada (128 µg/ml) (Tabla 1). En la detección fenotípica de carbapenemasas, 20/22 cepas resultaron positivas al método de Hodge modificado, 19/22 al método de sinergia con ácido fenil borónico y 18/22 al método de combinación de discos, destacándose que, por este último método, se detectó una cepa con fenotipo de metalo-β-lactamasa (Kp14). Una cepa (Kp20) mostró negatividad a los tres métodos ensayados. Por otra parte, en la totalidad de las cepas se detectó el gen *bla*<sub>KPC</sub> (Tabla 2).

El análisis de los patrones de bandas obtenidos por restricción del ADN genómico con *Xba*I y posterior electroforesis de campo pulsado, permitió obtener 18 pulsotipos designados con letras de la A a la R. El pulsotipo A estaba conformado por las tres cepas aisladas en 2009 (Kp1, Kp2, Kp3) en UCI pediátrica con 93% de similitud. En ese pulsotipo las cepas Kp1 y Kp2 mostraron 95% de similitud entre ellas. Por otra parte, las cepas Kp11 y Kp12 aisladas en UCI adultos en 2013, conformaban el pulsotipo K con 88% de similitud, mientras que, Kp15 y Kp16 pertenecían al pulsotipo N (aisladas en UCI de adultos el 17 de junio de 2013) y presentaban 94% de similitud. Los 15 pulsotipos restantes, mostraron < 80% de similitud (con un máximo de 59%) y estaban conformados por una cepa por pulsotipo y provenían de diversos servicios del HUAPA (Figura 2).

**Tabla 1.** Concentraciones inhibitorias mínimas de imipenem, meropenem y ertapenem en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Cumaná, Estado Sucre, Venezuela

n cepa	Valor CIM µg/ml		
	IMP	MER	ETP
Kp1	16 (R)	4 (R)	2 (R)
Kp2	16 (R)	8 (R)	8 (R)
Kp3	16 (R)	32 (R)	32 (R)
Kp4	32 (R)	16 (R)	8 (R)
Kp5	8 (R)	4 (R)	4 (R)
Kp6	16 (R)	8 (R)	4 (R)
Kp7	16 (R)	8 (R)	8 (R)
Kp8	16 (R)	16 (R)	16 (R)
Kp9	16 (R)	4 (R)	8 (R)
Kp10	4 (R)	0,5 (S)	0,5 (S)
Kp11	16 (R)	4 (R)	8 (R)
Kp12	64 (R)	8 (R)	16 (R)
Kp13	64 (R)	64 (R)	32 (R)
Kp14	16 (R)	4 (R)	8 (R)
Kp15	32 (R)	64 (R)	64 (R)
Kp16	16 (R)	8 (R)	8 (R)
Kp17	16 (R)	8 (R)	8 (R)
Kp18	64 (R)	32 (R)	32 (R)
Kp19	4 (R)	1 (S)	0,5 (S)
Kp20	2 (I)	4 (R)	16 (R)
Kp21	4 (R)	4 (R)	8 (R)
Kp22	128 (R)	64 (R)	64 (R)

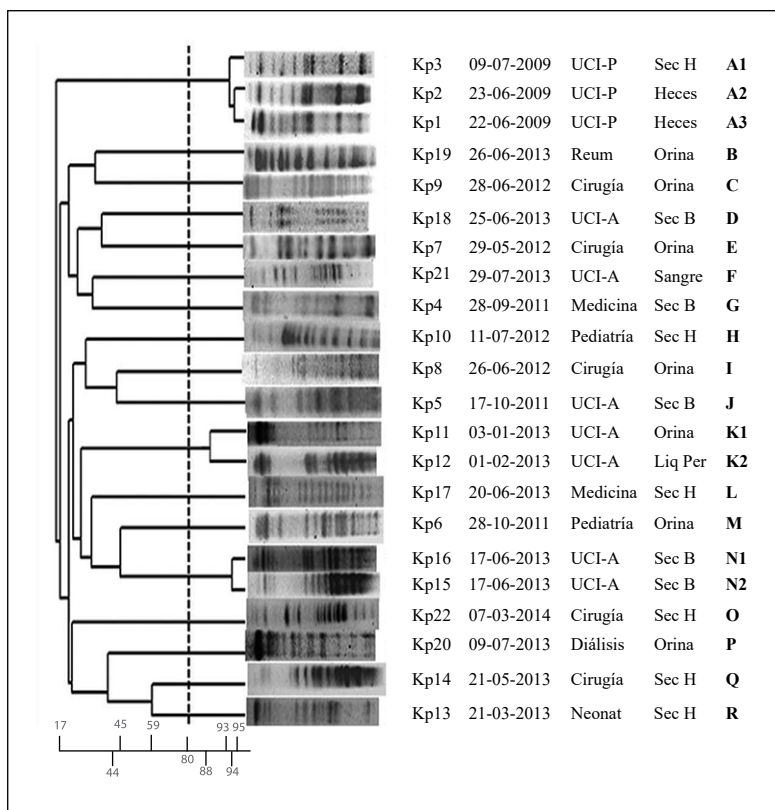
CIM: concentración inhibitoria mínima, R: resistente, I: resistencia intermedia, S: sensible.



**Tabla 2. Detección de carbapenemasas por métodos fenotípicos y del gen bla<sub>KPC</sub> por reacción de polimerasa en cadena, en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Cumaná, Estado Sucre, Venezuela**

n cepa	Métodos fenotípicos			GEN bla <sub>KPC</sub>
	Hodge	AFB	Comb discos	
Kp1	+	+	KPC	+
Kp2	+	+	KPC	+
Kp3	+	+	KPC	+
Kp4	+	+	KPC	+
Kp5	+	+	KPC	+
Kp6	+	+	KPC	+
Kp7	+	+	KPC	+
Kp8	+	+	KPC	+
Kp9	+	+	KPC	+
Kp10	+	-	Negativo	+
Kp11	+	+	KPC	+
Kp12	+	+	KPC	+
Kp13	+	+	Negativo	+
Kp14	+	-	MBL	+
Kp15	+	+	KPC	+
Kp16	+	+	KPC	+
Kp17	+	+	KPC	+
Kp18	+	+	KPC	+
Kp19	-	+	Negativo	+
Kp20	-	-	Negativo	+
Kp21	+	+	KPC	+
Kp22	+	+	KPC	+
Total positivas	20	19	18	22

AFB: ácido fenil borónico, Comb discos: combinación de discos, MBL: metalo-β-lactamasa.



**Figura 2.** Dendrograma basado en la similitud de los patrones de bandas obtenidos por electroforesis de campo pulsado y datos epidemiológicos correspondientes a cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos. Hospital Universitario "Antonio Patricio de Alcalá". Cumaná, Estado Sucre, Venezuela. UCI-P: Unidad de Cuidados Intensivos Pediátrica, UCI-A Unidad de Cuidados Intensivos Adultos, Reum: Servicio de Reumatología, Neonat: Servicio de Neonatología, Sec H: secreción de herida, Liq Per: líquido peritoneal, Sec B: secreción bronquial.

## Discusión

El aislamiento de bacterias productoras de KPC es considerado un importante problema de salud pública debido a su capacidad de diseminación y elevada mortalidad asociada<sup>12</sup>. En el presente estudio se observó que la resistencia de las cepas estudiadas no se limitó a carbapenémicos y otros β-lactámicos, sino también a otras familias de antimicrobianos como quinolonas y aminoglucósidos, situación que puede deberse a que estas cepas con frecuencia portan múltiples genes de resistencia plasmídicos de manera simultánea<sup>16,26</sup>. Por otro lado, se encontró que dos cepas de *K. pneumoniae* con carbapenemasa KPC, mostraron CIM de ertapenem y meropenem dentro de la categoría sensible. En la actualidad existen otros reportes similares al presente estudio, donde se han aislado cepas de *K. pneumoniae* con valores sensibles de CIM para carbapenémicos que posteriormente se han caracterizado como productoras de carbapenemasa KPC<sup>2,5</sup>. A pesar de que todas las cepas

resultaron portadoras del gen bla<sub>KPC</sub>, cinco mostraron resultados negativos en, al menos, uno de los ensayos fenotípicos empleados. Este hecho puede explicarse a la menor sensibilidad y especificidad de los métodos fenotípicos en comparación con los moleculares; sin embargo, también puede deberse a la presencia de un bajo número de copias del gen o a la represión genética del mismo<sup>27</sup>, lo cual se manifiesta en una baja o nula producción de la enzima, respectivamente, incapaz de ser detectada con los métodos fenotípicos ensayados en esta investigación. Otro método fenotípico recomendado actualmente por el CLSI para detectar carbapenemasas, es el Carba NP que no pudo ser realizado en el presente estudio. No obstante, otros investigadores han empleado este método junto al ensayo de combinación de discos para la detección de carbapenemasas en cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae*, encontrando que estos dos métodos fenotípicos rápidos detectaron todas las cepas portadoras de genes de carbapenemasas que se identificaron por RPC<sup>28</sup>.





Se destaca el hallazgo, a través del método de combinación de discos, de una cepa con metalo- $\beta$ -lactamasas; estas enzimas también confieren resistencia a carbapenémicos y otros  $\beta$ -lactámicos exceptuando aztreonam<sup>4</sup>. En este sentido, se ha reportado que la co-presencia de serino-carbapenemasas y metalo- $\beta$ -lactamasas, interfiere con la detección fenotípica de KPC. En una investigación<sup>29</sup>, se encontró que el ensayo con AFB era inefectivo en cepas de *K. pneumoniae* con co-producción del gen  $bla_{KPC}$  y  $bla_{VIM}$  atribuyendo este falso negativo con AFB, al efecto enmascarante de la metalo- $\beta$ -lactamasas tipo VIM. Esto podría explicar la negatividad obtenida con AFB para la cepa con fenotipo de metalo- $\beta$ -lactamasas hallada en la presente investigación; sin embargo, se tendrían que realizar pruebas moleculares para detectar el gen  $bla_{VIM}$  en esa cepa. Se destaca, que la combinación de métodos fenotípicos aumenta la probabilidad de detección de la enzima KPC.

De acuerdo a los resultados obtenidos por ECP, las tres cepas de *K. pneumoniae* aisladas en el año 2009 presentaron un patrón de bandas similar que las permitió agrupar en un pulstipo con > 80% de similitud (93% específicamente) por lo que se definen como clones estrechamente relacionados, tanto a nivel genético como epidemiológico debido a que provenían de pacientes recluidos en la UCI pediátrica (área común del hospital) durante los meses de junio-julio (período corto); además, no se habían reportado aislados previos de *K. pneumoniae* con carbapenemasas KPC en ese servicio del HUAPA. Los aislados estrechamente relacionados se consideran probablemente como parte de un brote<sup>17</sup>, por lo que se puede afirmar que en 2009 ocurrió un brote de *K. pneumoniae* KPC, durante los meses de junio-julio en la UCI pediátrica del HUAPA. Otros eventos de diseminación clonal ocurrieron en 2013 en UCI adultos, pero sin relación con el brote de 2009. La detección de diseminación de clones en un mismo servicio indica fallas en las medidas de control de infecciones como el lavado de manos cuyo riesgo es la diseminación de cepas al momento de la manipulación de los pacientes.

Por otra parte, el resto de cepas aisladas entre 2011 y 2014 mostró una notable policlonalidad debido a que presentaron diversidad de patrones de bandas que permitió categorizarlos como genéticamente no relacionados (< 80% de similitud). Estas 15 cepas fueron aisladas entre 2011 y 2014 en distintos servicios del HUAPA y a partir de diversas muestras. El hallazgo concuerda con lo señalado por Tenover y cols.<sup>17</sup>, quienes refieren que estas variaciones se observan entre aislados recolectados en períodos largos de seis meses o más. Este resultado es similar al obtenido en otra investigación realizada en Venezuela, donde se reportó un predominio de policlonalidad en cepas de *K. pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido<sup>30</sup>. La policlonalidad obtenida entre

2011 y 2014 puede deberse a la aparición de nuevos clones o a la adición sucesiva de eventos genéticos como la transferencia horizontal de genes mediante plásmidos y/o transposones o mutaciones puntuales, producto de la presión selectiva generada por el uso indiscriminado de antimicrobianos en los diferentes servicios del HUAPA, favorecido por la presencia en estas cepas del gen plasmídico  $bla_{KPC}$  que, como se ha señalado, se encuentra frecuentemente en un transposón<sup>10,13,14</sup>.

En conclusión, el análisis de la epidemiología molecular de *K. pneumoniae* KPC en el HUAPA durante el período 2009-2014, permitió identificar dos comportamientos: uno de diseminación clonal en UCI en 2009 y 2013, sin relación entre sí, y otro de elevada policlonalidad en el resto de las cepas, posiblemente por la aparición de nuevos clones o la transferencia horizontal de genes y/o la presencia de mutaciones, producto de la presión selectiva antimicrobiana existente en ese centro de salud.

El presente estudio permitió resaltar la importancia de conocer las características fenotípicas y moleculares de las cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos aisladas en el HUAPA. Para investigaciones posteriores, se sugiere realizar tipificación por secuenciación de locus múltiples (en inglés MLST) a fin de determinar el tipo clonal al cual pertenecen las cepas, siendo esta información de importante valor epidemiológico. Es mediante el conocimiento de la epidemiología local que se pueden establecer medidas que conduzcan al control y prevención de la diseminación de cepas multi-drogo-resistentes como el correcto lavado de manos, aislamiento del paciente, uso racional de antimicrobianos, por ejemplo mediante el uso de terapias rotativas, entre otras medidas, que deben ser aplicadas estrictamente y con urgencia en el HUAPA a fin de disminuir la morbilidad y mortalidad por estos patógenos.

*Agradecimientos.* A Luis Torres por suministrar la cepa utilizada como control positivo de KPC y a Esperanza Niubo Crespo de la empresa NEURONIC S.A por sus recomendaciones para llevar a cabo el procedimiento de electroforesis de campo pulsado en estas cepas.

## Resumen

Con el objetivo de estudiar la relación clonal y detección del gen  $bla_{KPC}$  en aislados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a carbapenémicos, se analizaron 22 cepas clínicas de *K. pneumoniae* con resistencia a imipenem y/o meropenem, aisladas en el laboratorio de bacteriología del Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá” (HUAPA) de la ciudad de Cumaná, Estado Sucre, Venezuela, durante un período de cinco años continuos. Se determinó la susceptibilidad a diversos antimicrobianos, y se detectó la presencia de carbapenemasas por los métodos de Hodge modificado,



sinergia con ácido fenil borónico y combinación de discos. La detección del gen *bla*<sub>KPC</sub> se llevó a cabo mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena y la determinación de la relación clonal se realizó por electroforesis de campo pulsado. Se encontraron elevados porcentajes de resistencia antimicrobiana, cinco cepas resultaron negativas, al menos, a un método

fenotípico y todas portaban el gen *bla*<sub>KPC</sub>. Se observó diseminación de clones únicamente en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI), mientras que, en otros servicios, se halló policlonalidad. Se concluye que el gen *bla*<sub>KPC</sub> se encuentra presente en cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenémicos aisladas en el HUAPA y que hubo diseminación clonal sólo en UCI.

## Referencias bibliográficas

- 1.- Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *Euro Surveill* 2011; 16: 19944-9.
- 2.- Rodríguez E, Saavedra S, Leal A, Álvarez C, Olarte N, Valderrama A, et al. Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un período de tres años. *Biomédica* 2014; 34: 224-31.
- 3.- Zhou T, Zhang X, Guo M, Ye J, Lu Y, Bao Q, et al. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* from a teaching hospital in Wenzhou, Southern China. *Jpn J Infect Dis* 2013; 66: 96-102.
- 4.- Queenan A, Bush K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58.
- 5.- Nicola F, Nieves J, Smayevsky J. Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Argent Microbiol* 2012; 44: 290-302.
- 6.- Bush K y Jacoby G. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76.
- 7.- Peirano G, Seki L, Val Passos V, Pinto M, Guerra L, Asensi, M. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 265-8.
- 8.- Yigit H, Queenan A, Anderson G, Domenech A, Biddle J, Steward C, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-61.
- 9.- Wei Z, Du Y, Yu P, Shen Y, Chen G, Li J. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 763-5.
- 10.- Naas T, Cuzon G, Villegas M, Lartigue M, Quinn J, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1257-63.
- 11.- Villegas M, Lolans K, Correa A, Suarez C, López J, Vallejo M, et al. First detection of the plasmid mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2880-2.
- 12.- Tzouveleki L, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios P, Daikos G. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: a evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 682-707.
- 13.- Barria C, Pincheira A, Quezada M, Vera A, Valenzuela P, Domínguez M, et al. Molecular typing and genetic environment of the *bla*<sub>KPC</sub> gene in Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Glob Antimicrob Resist* 2016; 4: 28-34.
- 14.- Sheppard A, Stoesser N, Wilson D, Sebra R, Kasarskis A, Anson L, et al. Nested Russian doll-like genetic mobility drives rapid dissemination of the carbapenem resistance gene *bla*<sub>KPC</sub>. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3767-78.
- 15.- Marcano D, De Jesús A, Hernández L, Torres L. Frequency of enzymes associated with reduced sensitivity to  $\beta$ -lactam antibiotics in enterobacteria isolates, Caracas, Venezuela. *Rev Panam Salud Pública* 2011; 30: 529-34.
- 16.- Luque J, Bohorquez P, Marcano D, Perdomo Y, Rodríguez C, Macero C, et al. Diseminación de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo KPC en Venezuela. *Bol Venez Infectol* 2012; 3: 13-9.
- 17.- Tenover F, Arbeit R, Goering R, Mickelsen P, Murray B, Persing D, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
- 18.- Fernández F. Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22: 355-60.
- 19.- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Document M100-S25. Pennsylvania, USA; 2015.
- 20.- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Document M07-A10. Pennsylvania, USA; 2015.
- 21.- Pasterán F, Méndez T, Guerrero L, Rapoport M, Corso M. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1631-9.
- 22.- Giske C, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 552-6.
- 23.- Poirel L, Walsh T, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 119-23.
- 24.- Garrido Y. Procedimientos normalizados de operaciones para subtipar cepas de *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. La Habana: Editorial Universitaria; 2010.
- 25.- Dawson S, Robert G. Bioestadística médica. Ciudad de México: Editorial El Manual Moderno S.A.; 1997.
- 26.- Zhao F, Zhang J, Fu Y, Ruan Z, Xie X. Dissemination of extensively drug-resistant and KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9: 1016-21.
- 27.- Peleg A, Franklin C, Bell J, Spelman D. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene *bla*<sub>IMP-4</sub> among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1549-56.
- 28.- Ho P, Cheung Y, Wang Y, Lo W, Lai E, Chow K, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from a healthcare region in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016; 35: 379-85.
- 29.- Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos A, Miriagou V, Zioga, A. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4048-50.
- 30.- Tedesco R, Guevara A. Epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Rev Soc Ven Microbiol* 2012; 32: 101-6.