



Rev.
Costarricense de Salud Pública, 2017, vol. 26(1): 67-73

Artículo Original

Primer aislamiento de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-1 en el Hospital de San Carlos durante el 2011

First isolation of a type KPC-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain in the San Carlos Hospital during 2011.

Wendy Ordóñez Varela, Laura Blanco Quirós

1 Wendy Ordóñez Varela, Licenciada en Microbiología y Química Clínica, Hospital Los Chiles, Caja Costarricense de Seguro Social. correo: wendyov@yahoo.com (Responsable de correspondencia) Dirección de trabajo: Los Chiles, Alajuela. Apartado postal 333-1000 San José.

2 Laura Blanco Quirós, Especialista en Bacteriología Clínica, Hospital de San Carlos, Caja Costarricense de Seguro Social. correo: lblancoq@gmail.com

Recibido: 9 de diciembre del 2013 Aceptado: 12 de agosto del 2014

RESUMEN

Objetivo Demostrar el aislamiento de una *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo 1 a partir de una paciente femenina de 1 año con historial de problemas hepáticos e infecciones renales a repetición.

Métodos Se realizó la identificación bacteriana y la prueba de resistencia a antibióticos por medio del sistema Vitek 2. La determinación fenotípica de carbapenemasas se realizó por medio de la prueba de ácido borónico y Hodge modificado. La confirmación molecular se hizo utilizando PCR-RT para el gen *blaKPC*.

Resultados Por la prueba de sensibilidad a antibióticos, se sospecha de una

betalactamasa de espectro ampliado con sensibilidad reducida a carbapenémicos

(imipenem 4 µg/mL, meropenem 1 µg/mL). Las pruebas de ácido borónico y Hodge modificado sugieren la presencia de carbapenemasas. La confirmación molecular es positiva para carbapenemasas tipo 1.

Discusión La emergencia y diseminación de cepas con carbapenemasas constituye un riesgo para pacientes hospitalizados y la comunidad. Estas cepas usualmente son resistentes a múltiples antibióticos y los mecanismos de resistencia diseminan con facilidad. Los hospitales constituyen escenarios que favorecen la diseminación de



estas bacterias. Las opciones terapéuticas en estos casos son reducidas, por lo que se insta a un uso consciente de los antibióticos, la higiene intrahospitalaria y vigilancia epidemiológica interdisciplinaria.

Conclusiones Se confirma la presencia de *Klebsiella pneumoniae* KPC-1 como aislamiento de una infección del tracto urinario en una niña con problemas hepáticos. Los lineamientos del Centro Nacional de Referencia en Bacteriología para sospechar de carbapenemasas, las pruebas fenotípicas y la confirmación molecular permitieron corroborar la carbapenemasa.

Palabras clave: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemasas, KPC, resistencia a antibióticos

ABSTRACT

Objective to demonstrate the finding of a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-1 positive, isolated from a 1-year-old female patient with liver illness and kidney recurrent infections.

Methods Bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing was performed with Vitek 2 systems. Phenotypic determination of carbapenemas was performed using boronic acid test and Hodge modified test. Molecular confirmation was done using PCR-RT for gene *blaKPC*.

Results Antimicrobial susceptibility testing suggested an extended spectrum betalactamase with reduced sensitivity to carbapenems (imipenem 4 µg/mL, meropenem 1 µg/mL). Boronic acid test and Hodge modified test were consistent with carbapenemase production. Molecular confirmation was positive for carbapenemase-1.

Discussion The emergence and spread of carbapenemase-positive strains constitutes a risk for patients and community. These strains are usually resistant to multiple

antimicrobials and the resistance mechanisms easily spread. Hospitals are scenarios that favor the spread of these bacteria. Therapeutic options in these cases are reduced, so it is necessary a conscious use of antibiotics, hospital hygiene and interdisciplinary epidemiological surveillance.

Conclusions It is confirmed the presence of *Klebsiella pneumoniae* KPC-1, isolated from a girl with urinary tract infection and liver illness. The guidelines of Centro Nacional de Referencia en Bacteriología, phenotypic tests and molecular confirmation made possible the confirmation of this finding.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemasas, KPC, drug resistance

INTRODUCCIÓN

Los carbapenémicos son antimicrobianos que pertenecen a la familia de las betalactamas. Son de uso extendido en la clínica debido a su estabilidad, amplio espectro y a que pueden utilizarse en variedad de infecciones, ya sea en sistema nervioso central, tracto respiratorio inferior, piel, tracto urinario y tejidos blandos, entre otros (1).

Las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) son betalactamasas de clase A capaces de inactivar penicilinas, cefalosporinas, aztreonam y carbapenémicos. Los genes que codifican estas enzimas usualmente están localizados en elementos genéticos móviles, como plásmidos y transposones, lo cual aumenta el riesgo de transferencia lateral a otras bacterias, incluso a nivel interespecie (2,3).

El primer reporte de KPC en aislamientos de *K.pneumoniae* se dio en Estados Unidos en el 2001. Posteriormente se ha documentado



la diseminación de *K.pneumoniae* productoras de KPC hacia Israel, Colombia, Brasil, Argentina, China y Europa (3,4). En Costa Rica la primera alerta de confirmación se dio el 28 de octubre del 2011 por el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología y corresponde a la cepa del presente estudio.

En este trabajo, se encontró una cepa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenemasas aislada de una paciente pediátrica que presentaba un cuadro de sepsis urinaria en el Servicio de Pediatría del Hospital de San Carlos. Se analizaron los mecanismos de resistencia y se confirmó la primera alerta a nivel nacional de una KPC-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas. La cepa a estudiar fue aislada de una paciente con infección urinaria del Servicio de Pediatría del Hospital San Carlos. La identificación del aislamiento fue confirmado utilizando el Vitek 2, Biomerieux. La cepa utilizada como control positivo para la corrida de PCR fue la KPC (ATCC BAA-1705) y la utilizada como control negativo la KPN (ATCC 700603). La cepa control positivo para la prueba con ácido borónico utilizada fue la *K. pneumoniae* OPS161 suministrada por el Centro Nacional de Referencia en Bacteriología (CNRB) del INCIENSA. La cepa utilizada para la prueba de Hodge es la *E. coli* ATCC 25922

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Se realizó por medio del Vitek 2 (Biomerieux, Francia).

Detección fenotípica de carbapenemasas clase A por ácido borónico. Se utilizó el método recomendado por Jiménez, Tijerino y Vargas (5). La confirmación estuvo a

cargo del Centro Nacional de Referencia en Bacteriología (CNRB) del INCIENSA.

Test de Hodge Modificado. Se utilizó el método recomendado por el Centro de Control de Enfermedades (CDC). Esta prueba estuvo a cargo del CNRB del INCIENSA. (6)

Confirmación molecular de la presencia de KPC mediante PCR-RT. La identificación genotípica se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Nacional de Niños. Para la extracción de ADN se preparó una suspensión en 500 µl de PBS a partir de una colonia en cultivo puro. Se extrajo el ADN utilizando tecnología de partículas magnéticas mediante el equipo MagNAPure (Roche), a un volumen de elución de 100 µl. Para la amplificación se realizó en un cicladador Veriti (Applied Biosystems) a un volumen de 25 µl, con TaqPol (Fermentas) 1.25 U, 200 nM de dNTPs (Master Mix 2X), primers (Applied Biosystems) al 0,5 µM cada uno, y 1 µL del ADN extraído en el punto anterior. Para la detección, los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1.5% con Bromuro de Etidio. Se utilizó marcador de peso molecular (50 pb) y el peso esperado del gen es de 331 pb.

Los primers utilizados para el blaKPC fueron dos. El 1 (Secuencia 5'-TGT CAC TGT ATC GCC GTC-3') y el 2 (Secuencia 5'-TAT TTT TCC GAG ATG GGT GAC-3').

RESULTADOS

Prueba de sensibilidad a los antibióticos
El hallazgo más importante fue la sensibilidad reducida a carbapenémicos (imipenem 4 µg/mL, meropenem 1 µg/mL), lo cual hace sospechar de una carbapenemasa, como se indica en la Tabla



1. Además, se observa que la cepa es resistente a múltiples antibióticos.

Detección fenotípica de carbapenemasas clase A por ácido borónico La prueba de ácido borónico muestra deformación de los halos de inhibición de carbapenemes en presencia de ácido borónico, lo cual sugiere la presencia de carbapenemasas (Figura 1).

Test de Hodge Modificado En el Test de Hodge Modificado se observa la formación de las rosetas y el crecimiento de la cepa control en torno a discos de carbapenemes, sugiriendo la producción de carbapenemasas por la cepa en estudio (Figura 2).

Confirmación molecular de la presencia de KPC mediante PCR La PCR confirmó la presencia del gen blaKPC, lo cual ratificó que el aislamiento corresponde a una *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa positiva de tipo 1 (Figura 3).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se confirmó la primera alerta a nivel nacional de *Klebsiella pneumoniae* KPC-1, como aislamiento de una infección del tracto urinario en una niña con problemas hepáticos. Esto se pudo realizar luego de la sospecha de una cepa KPC positiva, según los lineamientos sugeridos por el CNRB, así como la confirmación fenotípica y genotípica descrita.

La emergencia y diseminación de *Klebsiella pneumoniae* KPC es una amenaza para los pacientes internados y un posible riesgo para los de la comunidad. Estas bacterias usualmente son resistentes a múltiples antibióticos y los mecanismos de resistencia son de fácil diseminación por medio de plásmidos (3).

Los hospitales constituyen un escenario que permite la propagación de estos mecanismos de resistencia. Factores que contribuyen a este proceso son estadía prolongada de pacientes de alto riesgo como extremos etarios, respiración mecánica asistida, inmunosupresión, cateterización, hospitalizaciones recurrentes y previas terapias antimicrobianas, así como la posibilidad de contaminación cruzada o diseminación a otros sitios en pacientes trasladados o que se dan de alta (7, 8, 9). Este es el caso de la paciente en cuestión, la cual tenía 1 año de edad y hospitalizaciones recurrentes por su problema hepático, además de previas terapias antimicrobianas a causa de las infecciones urinarias a repetición.

Cepas de *Klebsiella pneumoniae* y otras Enterobacterias sospechosas de KPC han sido estudiadas en diferentes hospitales del mundo y se ha reportado la presencia de carbapenemasas en porcentajes variables de los aislamientos que van desde menos del 1% hasta más de 40% (8, 10, 11). Además, la diseminación de bacterias con enzimas KPC ha desencadenado serios problemas terapéuticos y aumento de la mortalidad hasta en un 47% de los casos (12).

Los carbapenémicos, debido a su amplio espectro de actividad contra la mayoría de β -lactamasas, generalmente representan el último recurso para el tratamiento de infecciones nosocomiales producidas por bacterias Gram negativas multi-droga-resistente (13). En el caso de encontrarse resistencia a estos antibióticos, se recurre a tigeciclina y colistina. Sin embargo, es preocupante la reciente emergencia de cepas resistentes también a estos antibióticos (14). Para evitar la emergencia y diseminación de cepas resistentes se recomienda un uso consciente de los antibióticos, buena higiene hospitalaria, aislamiento en casos sospechosos y vigilancia epidemiológica por parte de grupos interdisciplinarios.



Además, debe tenerse en cuenta el papel de la educación continua, tanto de los profesionales involucrados en el diagnóstico y tratamiento, como de los pacientes que reciben estas terapias.

CONCLUSIONES

Se confirmó la primera alerta a nivel nacional de *Klebsiella pneumoniae* KPC-1, como aislamiento de una infección del tracto urinario en una niña con problemas hepáticos.

Los lineamientos del CNRB para sospechar de KPC, las pruebas fenotípicas de ácido borónico Y Hodge modificado y la confirmación molecular fueron útiles como protocolo para corroborar la carbapenemasa

AGRADECIMIENTOS

Al Centro Nacional de Referencia en Bacteriología y al Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Nacional de Niños, por su colaboración en la confirmación del hallazgo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Lo TS, Welch JM, Alonto AM, Vicaldo-Alonto, EA. A review of the carbapenems in clinical use and clinical trials. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2008; 3:123-131.

Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Zawidzka E, Sulikowska A, Wardak S, *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA Methylase Arma in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55:443-446.

Kaiser RM, Castanheira M, Jones RN, Tenover F, Lynfield R. Trends in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-positive *K. pneumoniae* in US hospitals: report from the

2007 – 2009 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Micr Infect Dis.* 2013; 76:356-360.

Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -Lactamase bla_{KPC-2} Gene. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:1349-1356.

Jiménez A, Tijerino A y Vargas J. Mecanismos de resistencia a los antibióticos de importancia clínica en enterobacterias. II Curso Avanzado WHO- Global Foodborne Infections Network. 2011; 1-18.

Modified Hodge Test for Carbapenemase Detection in Enterobacteriaceae: Disponible en: http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/hodgetest_carbapenemase_enterobacteriaceae.pdf Consultado Marzo del 2014.

Mathers AJ, Cox HL, Bonatti H, Kitchel B, Brassinga AKC, Wispelwey B, Sawyer RG, Pruett TL, Hazen KC, Patel JB *et al.* Fatal cross infection by carbapenem-resistant *Klebsiella* in two liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2009; 11:257-265.

Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis.* 2011; 53:532–540.

Savita J, Rabindranth M, Nageswari G, Mahadev U, Purbasha G, Kalpana A, Chanda V. Increasing incidence of multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* infections in hospital and community settings. *Int J of Micr Res.* 2012; 4:253-257.

Poirel L, Ros A, Carrer A, Fortineau N, Carricajo A, Berthelot P *et al.* Cross-border



transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66: 1181-1182.

Wartiti MA, Bahmani FZ, Elouennass M, Benouda A. Prevalence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a University Hospital in Rabat, Morocco: A 19- months prospective study. *IAJAA.* 2012; 2: 1-8.

Livermore D, Woodford N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol.* 2006; 14: 413-420.

Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T, Cera G, Mussi M, Morán-Barrio J, Vila A, Viale A, Limansky A. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 336-344.

Lin YT, Wang FD, Chan YJ, Fu YC, Fung CP. Clinical and microbiological characteristics of tigecycline non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in Taiwan. *BMC Infect Dis.* 2014; 14: 1-8.

Tabla 1. Prueba de sensibilidad a los antibióticos

Antibiótico	Concentración Mínima Inhibitoria	Caracterización
Amicacina	≥ 64	Resistente
Ampicilina	≥ 32	Resistente
Ampicilina/Sulbactam	≥ 32	Resistente
BLEA	Positivo	Positivo
Cefalotina	≥ 64	Resistente
Cefepima	≥ 64	Resistente
Cefotaxima	≥ 64	Resistente
Cefoxitina	≤ 4	Resistente
Ceftazidima	16	Resistente
Ciprofloxacino	$\leq 0,25$	Sensible
Colistina	$\leq 0,5$	Sensible
Gentamicina	≥ 16	Resistente
Imipenem	4	Intermedio
Meropenem	1	Intermedio
Nitrofurantoína	≤ 16	Sensible

Se muestra el fenotipo de resistencia a antibióticos de la cepa aislada, resaltando las concentraciones mínimas inhibitorias que hacen sospechar de una KPC

Figura 1. Halos de inhibición con forma ovoide debido a la acción del ácido borónico. I) Meropenem. II) Imipenem. III) Ertapenem.

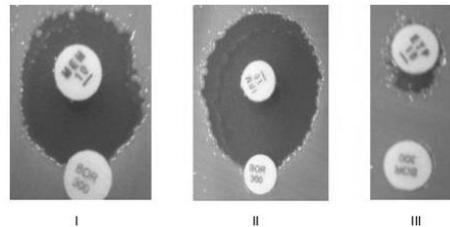


Figura 2. Formación de rosetas de la prueba de Hodge utilizando Imipenem (A), Meropenem (B) y Ertapenem (C).

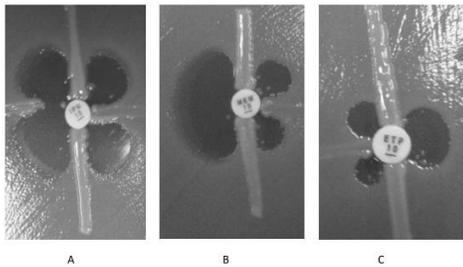


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% con Bromuro de Etidio de los productos amplificados por PCR. 1. Marcador de Peso Molecular de 50 pb. 2. Aislamiento de *K. pneumoniae*. 3. Control negativo KPN (ATCC 700603) 4. Control positivo KPC (ATCC BAA-1705).

