

Detección de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa en un hospital del norte del Perú

Detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in northern Peru

Roberto Díaz-Sipi3n^{1,a}, Mirko Guerrero-Mendoza^{1,a}, Romel Carrillo-Liza^{1,a}, Roberto Ventura-Flores^{2,a}

RESUMEN

Objetivo. Comunicar el primer reporte de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas. **El estudio:** Diagn3stico microbiol3gico empleando m3todos fenot3picos: sinergia del doble disco, Test de Hodge modificado, inmunocromatograf3a y la inactivaci3n del carbapen3mico. **Hallazgos:** Se confirmaron cuatro aislamientos (orinas 3 y sangre 1) de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas que adem3s presentaron una CMI de 4 y ≥ 8 para el ertapenem y $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ a imipenem y meropenem. **Conclusiones:** los m3todos fenot3picos estandarizados son de utilidad en la confirmaci3n de carbapenemasas y con ello una alternativa para la mejor toma de opciones terap3uticas y vigilancia epidemiol3gica.

Palabras Clave: Enterobacteriaceae Resistentes a los Carbapen3micos; T3cnicas de Laboratorio Cl3nico; *Klebsiella pneumoniae* (**Fuente:** DeCS-BIREME).

ABSTRACT

Objective. Communicate the first report of *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemases. **The study:** Microbiological diagnosis using phenotypic methods: double disc synergy, modified Hodge test, immunochromatography and carbapenemic inactivation. **Findings:** Four isolates (urine 3 and blood 1) of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* were confirmed, which also presented a MIC of 4 and ≥ 8 for ertapenem and $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ at imipenem and meropenem. **Conclusion:** Standardized phenotypic methods are useful in the confirmation of carbapenemases and with it an alternative for the best taking of therapeutic options and epidemiological surveillance.

Keywords: Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae; Clinical Laboratory Techniques; *Klebsiella pneumoniae* (**Source:** DeCS-BIREME).

INTRODUCCI3N

La resistencia a los antimicrobianos por parte de microorganismos contin3a siendo una amenaza creciente para la salud p3blica mundial al ser responsables de muchas infecciones graves en los hospitales⁽¹⁾. As3 la emergencia de enterobacterias productoras de carbapenemasas (KPC) representan un gran problema por ser uno de los mecanismos enzim3ticos que hidroliza a la mayor parte de los antibi3ticos betalact3micos, entre ellos los carbapen3micos que constituyen la 3ltima l3nea de la familia de los betalact3micos^(2,3).

La detecci3n de carbapenemasas es un reto debido a que su detecci3n fenot3pica convencional no es f3cil para los laboratorios de Microbiolog3a, ya que los puntos de corte cl3nicos no son 3tiles, y pueden aparecer como sensibles en el antibiograma, m3s aun suelen presentar diferentes niveles de expresi3n y aparecer como heteroresistentes, y esto hace que las pruebas de sensibilidad tengan una baja reproducibilidad, que junto a la presencia de otros mecanismos de resistencia como las betalactamasas de espectro extendido (BLEE), cefalosporinas tipo C (AmpC) cromos3mico o plasm3dico pueden enmascarar la presencia de carbapenemasas⁽⁴⁾. Existiendo m3todos

1. Hospital Regional Lambayeque, Chiclayo, Per3.

2. Facultad de Ciencias Biol3gicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Per3.

a. Biol3gos Microbi3logos.

fenot3picos r3pidos como el ensayo Carba NP que permite la detecci3n de KPC en 2 horas mientras que las basadas en el crecimiento, como el disco combinado, hodge modificado (MHT) y el m3todo de inactivaci3n de carbapen3micos lo hacen en un tiempo m3s prolongado entre 18 a 24 horas⁽⁹⁾. Otras pruebas como el pcr en tiempo real tambi3n han sido implementada⁽⁶⁾.

Nuestro objetivo fue conocer y describir fenot3picamente las diferentes t3cnicas para la detecci3n de carbapenemasas en aislamientos cl3nicos. Las mismas que permitir3n establecer una estrategia en los laboratorios de microbiolog3a a fin de mejorar la vigilancia y control de bacterias productoras de estos mecanismos de resistencia.

EL ESTUDIO

La identificaci3n y determinaci3n de la concentraci3n m3nima inhibitoria (CMI) en *Klebsiella pneumoniae* fue realizada en el equipo automatizado vitex 2. Mientras que la susceptibilidad por disco difusi3n se realiz3 siguiendo las recomendaciones del documento M100: 2019 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)⁽⁷⁾, en la que se evalu3 la susceptibilidad a cefalosporinas, monobactamicos, aminogluc3sidos, quinolonas y carbapen3micos como el meropenem (MEM) e imipenem (IPM). El descarte enzim3tico a carbapenemasa fueron evaluadas mediante las metodolog3as:

- Sinergia a doble disco, empleando inhibidores como el 3cido fenilbor3nico (APB) que predice presencia de carbapenemasas tipo KPC (IMP-APB-MEM) y el 3cido etilendiamino tetraac3tico (EDTA), que predice presencia o ausencia de ampC en presencia de cefotaxima (CTX) y ceftoxitin (FOX). En ambos casos se sembr3 previamente una suspensi3n 0.5 Mc Farland del aislamiento de *K. pneumoniae* en Mueller Hinton y sobre ella se coloc3 en la parte central los inhibidores.
- Test de Hodge modificado (MHT) seg3n protocolo recomendado del CLSI 2017⁽⁸⁾, donde las cepas problemas de *K. pneumoniae* fueron estriados en forma longitudinal sobre Mueller Hinton que previamente fue sembrado con una suspensi3n 0.5 Mc Farland de *Escherichia coli* ATCC 25932;
- Test de inactivaci3n del carbapen3mico (mCIM)⁽⁷⁾, donde los carbapen3micos fueron expuestos durante 4 horas en caldo BHI conteniendo aislamientos de *K. pneumoniae* y luego cada disco fue colocado sobre Mueller Hinton en la que previamente fue sembrado una suspensi3n 0,5 Mc Farland de *Escherichia coli* ATCC 25932.
- Inmunocromatograf3a. Un m3todo r3pido que consisti3 en mezclar 10 gotas de buffer Ly-A con colonias bacterianas de *K. pneumoniae*. De la soluci3n preparada se agreg3 3 gotas al pocillo del caset inmunocromatografico para la lectura

durante 15 minutos como m3ximo.

HALLAZGOS

En nuestra investigaci3n comunicamos la presencia de tres aislamientos de orina y uno de sangre de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasas KPC, que presentaron CMI 4 y ≥ 8 para el ertapenem y ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ a imipenem y meropenem.

Los CMI activo la alarma para la b3squeda del perfil de susceptibilidad por disco difusi3n confirm3ndose la resistencia a cefalosporinas de tercera generaci3n, monobactan, aminogluc3sidos (figura 1a). Mientras que el mecanismo de resistentes por el m3todo de sinergia a doble disco present3 positividad con el disco APB (MEM-APB-IMP), clasific3ndose como posible carbapenemasa, tambi3n se evidencio presencia de betalactamasa tipo C por el sinergismo del EDTA con el ceftoxitin (figura 1b). los resultados del MHT, inmunocromatograf3a y mCIM tambi3n mostraron positividad (figura 2).



Figura 1. Antibiograma de *Klebsiella pneumoniae*: a) aislamiento multirresistente y b) sinergia de doble disco con detecci3n de KPC parte superior y AmpC parte inferior.

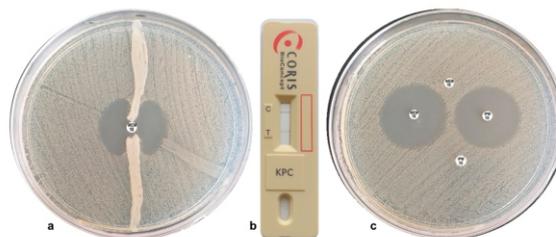


Figura 2. Tamizaje confirmatorio para KPC: a) test de hodge; b) inmunocromatograf3a y c) mCIM

DISCUSI3N

La resistencia a carbapen3micos en *K. pneumoniae* es una preocupaci3n importante, debido a tres mecanismos, aislados o combinados: bombas de eflujo, p3rdida de permeabilidad y producci3n de carbapenemasas. Siendo estas betalactamasas capaces de hidrolizar no solo carbapen3micos que en el 3mbito

clínico son una de las últimas opciones terapéuticas para infecciones graves por enterobacterias sino también degradan otros β-lactámicos y su diseminación suele estar mediada por plásmidos⁽⁵⁾.

Por otro lado, reportes de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos y productora de carbapenemasa denominada KPC-1 datan desde 1996 en Carolina del Norte Estados Unidos⁽⁹⁾. En Sudamérica, la enzima fue reportada en Colombia como KPC 2⁽¹⁰⁾. El primer reporte de *k. pneumoniae* KPC en Perú fue notificado en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza, aislado de hemocultivo de una paciente con lupus eritematoso sistémico⁽¹¹⁾. Mientras que en Huancayo fue aislado en muestra de orina⁽²⁾. Reporte de carbapenemasas tipo Nueva Delhi Metalo beta-lactamasas (NDM), también han sido informadas⁽³⁾.

La incidencia de carbapenemasas en enterobacterias es muy baja y se han descrito tres clases frente a carbapenémicos, la clase A como por ejemplo la KPC, suelen ser sensibles a la acción del ácido clavulánico y presentan una menor actividad frente a meropenem que a imipenem; la clase B como las metalo-betalactamasas (VIM o las IMP), no presentan actividad frente al aztreonam y su acción es inhibida con EDTA y el tercer tipo son de la clase D, la oxacilinasas OXA-48⁽¹²⁾.

La sinergia entre carbapenémicos y ácido Clavulánico, ácido borónico o EDTA pueden ser útiles para sospechar la presencia de betalactamasas de clase A o B en enterobacterias^(13,14). Otra alternativa excelente es el test de Hodge modificado en casos de bacterias productoras de KPC^(8,15) y finalmente el método de inactivación del carbapenémico⁽⁷⁾ que presenta sensibilidad y especificidad cercana al 100% demostrando su superioridad en comparación a otros métodos además de ser una alternativa costo efectiva para la detección de carbapenemasas al ser un método basado en la capacidad de la enzima carbapenemasa de hidrolizar la concentración de 10µg de Meropenem contenida en un disco de papel filtro mediante la elución del mismo en agua destilada estéril⁽¹⁶⁾.

El perfil de susceptibilidad de las cuatro cepas aisladas, mostraron ser multirresistentes, no productoras de BLEE, pero sí de AmpC. Este último mecanismo hace más complicado su detección fenotípica de las KPC por el enmascaramiento que produce⁽⁴⁾. El patrón descrito podría indicar que se trataría de la misma cepa circulante requiriendo la confirmación por estudios moleculares a fin de determinar si las cepas productoras de KPC corresponden al mismo clon. Sin embargo, dicha tecnología fue una limitante en nuestra realidad por lo que no se realizó.

Al realizar la lectura interpretada del antibiograma en las *K. pneumoniae* productoras de KPC, se acortan las opciones terapéuticas. En tal escenario la terapia

combinada es una opción al usar al menos dos de los siguientes antibióticos: colistin, tigeciclina, fosfomicina; Además de los recientemente aprobados por la FDA, ceftazidima/avibactam. No encontrándose este último dentro del petitorio del Ministerio de Salud del Perú, dificultando el manejo de pacientes infectados. Por tanto, la detección rápida de los mecanismos de resistencias empleando métodos replicables, económicos y fáciles son una alternativa en el programa de control de infecciones a fin de tomar las medidas preventivas contra la diseminación de enterobacterias productoras de KPC.

Como limitación del estudio fue no contar con mayor número de casos que hubiese permitido sincerar con mayor amplitud el análisis. Recomendando prestar mucha atención en la recolección y proceso de las diferentes muestras a fin de evitar errores que pudiesen influenciar en los resultados y en el análisis de métodos comparativos.

Se concluye que los métodos fenotípicos empleados, permitió la confirmación de la presencia de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae* aislados de usuarios hospitalizados en un hospital de tercer nivel.

Conflictos de interés: Los autores niegan conflictos de interés.

Financiamiento: Autofinanciado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tommasi R, Brown DG, Walkup GK, Manchester JJ, Miller AA. ESKAPEing the labyrinth of antibacterial discovery. [Nat Rev Drug Discov. 2015; 14\(8\):529-42.](#)
2. Pari JFQ, Rojas JOI, Mucha AMC, et al. *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas en Perú: reporte de caso y discusión de la resistencia a los antimicrobianos. [Medwave. 2018;18\(2\): e7191](#)
3. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo JJ, Chiappe-González A, Vargas-Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori DH, et al. *Klebsiella pneumoniae* nueva Delhi metalo-betalactamasa en el hospital nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. [Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2017; 34\(2\): 261-7.](#)
4. Mancilla EC. Detección de enterobacterias productoras de carbapenemasas en la rutina del laboratorio. [Rev Esp Quimioter. 2015 28\(1\), 8-11.](#)
5. Ho PL, Wang Y, Wing-Sze TC, Fung KS, Cheng VC, Lee R, et al. Rapid detection of carbapenemase production in Enterobacteriaceae by use of a modified paper strip Carba NP method. [J Clin Microbiol. 2018; 56: e01110-17.](#)
6. Pancotto LR, Nodari CS, Rozales FP, et al. Performance of rapid tests for carbapenemase

- detection among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. [Braz J Microbiol. 2018; 49\(4\): 914-918.](#)
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: 2019.
 8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: 2017.
 9. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenemhydrolyzing-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* [2001; 45\(4\):1151-61.](#)
 10. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez 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\(8\):2880-2.](#)
 11. Velasquez J, Hernandez R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsquispe R, et al. *Klebsiella pneumoniae* resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Per6. [Rev Soc Peru Med Interna. 2013; 26\(4\):192-6.](#)
 12. Navarro F, Miro E, Mirelis B. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. [Enferm Infec Microbiol Clin. 2010; 28\(9\):638 - 45](#)
 13. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. [Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. J clin Microbiol. 2009; 47\(6\): 1631-9.](#)
 14. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. [Clin Microbiol Rev. 2007; 20\(3\): 440-58.](#)
 15. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. [J Clin Microbiol. 2012; 50\(2\):477-479.](#)
 16. Reyes-Chac6n JA, Villacis-Acu6a JE, Chicaiza alamoto S, Sat6n-Salazar C, Salas-Iglesias S, Ushi6a-Cueva, et al. Inactivaci6n del carbapen6mico, un m6todo alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae. [Infectio 2017; 21\(4\): 251- 4.](#)

Correspondencia

Roberto Ventura-Flores

Direcci6n: Ciudad Universitaria Facultad de Ciencias Biol6gicas. Av. Juan XXIII N6 391 Lambayeque, Per6.

Tel6fono: (+51) 979008615

Correo: rventura@hrlamb.gob.pe

rventuraf@unprg.edu.pe

Revisi6n de pares

Recibido: 10/06/2020

Aceptado: 15/09/2020