

## COMUNICACIÓN BREVE

# Caracterización de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* doble productores de carbapenemasas en un hospital universitario

Marcela Nastro, Carla Álvarez, Nicolás Potente, Iván Cervino, Carlos Vay, Ángela Famiglietti, Carlos H. Rodríguez.

## RESUMEN

La emergencia de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* doble productores de carbapenemasas (KPC y NDM) es una de las consecuencias de la pandemia causada por SARS-CoV-2 que ha causado un impacto significativo en las tasas de resistencia a los antimicrobianos en las infecciones intrahospitalarias por esta enterobacteria. Estos aislamientos representan un desafío para los servicios de salud, por su detección y caracterización y posterior tratamiento. En este trabajo se describen los aislamientos portadores de KPC y NDM recuperados durante 2022 aislados de distintas muestras clínicas de pacientes internados en un hospital universitario de la Ciudad de Buenos Aires, se los caracteriza fenotípicamente y genotípicamente como portadores de ambas carbapenemasas y se destaca la excelente actividad *in vitro* de la combinación ceftazidima-avibactam y aztreonam en el tratamiento de estas infecciones en donde las alternativas terapéuticas estarían limitadas a antibióticos no  $\beta$ -lactámicos con porcentajes de resistencia que superan el 70%.

**Palabras clave:** *Klebsiella pneumoniae*, doble carbapenemasa, KPC, NDM.

Departamento de Bioquímica Clínica. Laboratorio de Bacteriología, INFIBIOC. Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina.

**Autora responsable para correspondencia:** Marcela Nastro. Avenida Córdoba 2351, Ciudad Autónoma de Buenos Aires. marcelanastro@hotmail.com

**Recibido:** 2/2/23 **Aceptado:** 13/7/23

El presente trabajo fue en parte financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires (UBACyT 20020130100167BA- Ángela Famiglietti) que cuenta con la aprobación general del Comité de Ética del Hospital de Clínicas José de San Martín.

Los autores declaran no poseer conflictos de intereses.

## Introducción

La emergencia de aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de carbapenemasa de tipo KPC (Kpn-KPC+) cambió significativamente la epidemiología y el tratamiento de las infecciones causadas por *Enterobacterales* (1, 2). Antes de esta irrupción, la resistencia a carbapenemes estaba limitada a bacilos Gram-negativos no fermentadores, con menor frecuencia de aislamiento y/o menor virulencia. La capacidad de producir brotes a nivel global de Kpn-KPC+ estuvo fundamentalmente relacionada al clon epidémico ST258 (2, 3). En cambio, la aparición de la metalobetalactamasa de tipo NDM en *Enterobacterales* fue en nuestro país un fenómeno más paulatino, asociado a la familia *Morganellaceae* (*Proteus mirabilis* y *Providencia stuartii*) (4). Por otro lado, los aislamientos de Kpn productores de NDM (Kpn-NDM+) no estaban asociados a un clon en particular (5).

La pandemia causada por SARS-CoV-2 fue el hecho epidemiológico de mayor relevancia en las últimas décadas. Sus consecuencias en la sociedad fueron económicas, sociales, culturales y, por supuesto, sanitarias. Dentro de estas últimas, el número de fallecimientos directos e indirectos son los más graves e irreparables, pero los impactos causados en los sistemas de salud fueron múltiples. Entre ellos, se destaca el incremento de la resistencia a los antimicrobianos, mucho más silenciosa pero estable en el tiempo y más mortal en el mediano y largo plazo que la pandemia original. Las tasas de resistencia alcanzadas en la postpandemia en algunas infecciones hospitalarias se proyectaban recién para el año 2030.

Durante la primera ola de COVID-19 nos encontramos con la diseminación de *Enterobacterales*, específicamente *Klebsiella pneumoniae*, con producción de combinaciones de  $\beta$ -lactamasas y/o coproducción de carbapenemasas que constituyeron un doble desafío para el control de infecciones y para la elección de un tratamiento óptimo en estos pacientes con largos periodos de internación y sometidos a múltiples esquemas antibióticos. Los objetivos del presente trabajo fueron analizar la epidemiología y caracterizar fenotípicamente a los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* doble productores de carbapenemasas (DPC) en un hospital de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA) y evaluar la actividad de las asociaciones de aztreonam con avibactam y con ácido clavulánico.

## Material y métodos

Se estudiaron prospectivamente todos los aislamientos de enterobacterias doble productores de carbapenemasas de pacientes internados durante 2022. Se seleccionaron aislamientos con CIM de meropenem > 1  $\mu$ g/ml.

### Identificación bacteriana

La identificación de los aislados recuperados de especímenes clínicos considerados significativos por el Laboratorio de Bacteriología según los manuales de procedimientos vigentes fue realizada mediante espectrometría de masa MALDI-TOF (Bruker, Daltonics). Los resultados fueron analizados con la base de datos de Biotyper (versión 3.1, BD, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania).

### Estudios de sensibilidad antimicrobiana

Se evaluó la sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos a través del sistema automatizado Phoenix (Becton Dickinson) de acuerdo a las condiciones establecidos por el fabricante. Para determinar la sensibilidad a colistina (COL) se empleó el método de sensibilidad a una dilución validado previamente por nuestro laboratorio (6). Los resultados fueron interpretados según los criterios establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (7) y/o por el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (8). En la totalidad de los aislados se determinó la sensibilidad a aztreonam (AZT), ceftazidima-avibactam (CZA), ácido clavulánico (CLA) aztreonam/avibactam (AZA) y aztreonam/ácido clavulánico (AZC) mediante dilución seriada en agar Mueller-Hinton siguiendo las recomendaciones generales del CLSI. La concentración final de avibactam y de ácido clavulánico fue de 4  $\mu$ g/ml y de 2  $\mu$ g/ml, respectivamente. Como control de calidad de las pruebas de sensibilidad se emplearon las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas

A la totalidad de los aislados se les realizó la prueba de Blue carba para estudiar la presencia de actividad carbapenemática (9). Si el resultado fue positivo (cambio de color) se adicionaron los ensayos de inhibición con EDTA y con ácido borónico (APB) con imipenem (IMI)

y meropenem (MER) para distinguir fenotípicamente entre serinocarbapenemasas y metalobetalactamasas, respectivamente. Debido a la circulación de aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* que producen conjuntamente las enzimas NDM y KPC, en el laboratorio de Bacteriología se usa un esquema de detección donde se evalúa simultáneamente las sinergias anteriormente mencionadas más las interacciones entre ácido clavulánico-AZT y CZA-AZT.

## Métodos genotípicos

Se realizó PCR convencional aplicando técnica y condiciones previamente descritas con *primers* específicos para los genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> y *bla*<sub>VIM</sub> y posterior secuenciación en todos los aislamientos con sospecha de producción de carbapenemasas para confirmar la detección fenotípica (10).

## Registro de datos

Todos los aislamientos resistentes a los carbapenemes fueron prospectivamente incluidos en las bases de datos específicas del Laboratorio de Bacteriología en un programa especial establecido desde 2016 para el seguimiento de bacterias multirresistentes.

## Resultados

Todos los aislamientos con doble producción de carbapenemasas fueron identificados como *Klebsiella pneumoniae*. Durante 2022 se recuperaron 32 aislamientos de *K. pneumoniae*-DPC correspondientes a 20 pacientes distribuidos en salas de internación de la siguiente ma-

nera: Unidad de Cuidados Intensivos, 10; Clínica Médica, 9 y Traumatología, 1. Los especímenes clínicos fueron: orina, 10; muestras respiratorias, 7; sangre, 10; líquido abdominal, 2; piel y partes blandas, 2 y retrocultivos, 1. La prueba de Blue Carba fue positiva en el 100% de los aislamientos. Todos los aislamientos presentaron altos niveles de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, incluyendo carbapenemes, AZT (CIM  $\geq 16$   $\mu\text{g/ml}$ ) y CZA (CIM  $> 8$   $\mu\text{g/ml}$ ). La sensibilidad a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos se detalla en la Tabla 1.

La sinergia carbapenemes-EDTA mostró resultado positivo en el 70% de los aislados mientras que la sinergia carbapenemes-APB lo hizo en el 40%. La sinergia AZT-AVI fue positiva en la totalidad de los aislamientos, mientras que la sinergia AZT-CLA fue negativa en los 32 aislamientos.

Se confirmó la doble presencia de las enzimas de tipo KPC y NDM por PCR en el 100% de los aislamientos (Tabla 2).

**Tabla 1. Porcentajes de resistencia a los antibióticos no  $\beta$ -lactámicos en los 32 aislamientos de *K. pneumoniae***

Antimicrobiano	Porcentaje de resistencia (%)
Trimetoprima-sulfametozaxol	100
Ciprofloxacina	100
Amikacina	91
Gentamicina	91
Colistina	74
Tigeciclina	75
Fosfomicina	73

**Tabla 2. Distribución de los fenotipos y genotipos en los 32 aislamientos de *K. pneumoniae***

Fenotipo	n aislamientos/n total	Sinergia carbapenemes-APB	Sinergia carbapenemes-EDTA	Sinergia AZT-AVI	Sinergia AZT-CLA	PCR <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	PCR <i>bla</i> <sub>NDM</sub>	PCR <i>bla</i> <sub>OXA</sub>	PCR <i>bla</i> <sub>VIM</sub>
1	6/32	pos	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg
2	3/32	neg	neg	pos	neg	pos	pos	neg	neg
3	7/32	pos	neg	pos	neg	pos	pos	neg	neg
4	16/32	neg	pos	pos	neg	pos	pos	neg	neg

## Discusión

La emergencia de aislamientos de Kpn-KPC+NDM+ evidencia la capacidad de *K. pneumoniae* de producir múltiples  $\beta$ -lactamasas con el mismo perfil de hidrolisis. Estos aislados que habían sido descritos previamente en diversos países (11, 12, 13) fueron detectados en nuestro medio en forma simultánea en un gran número de centros asistenciales. En el Hospital de Clínicas fueron detectados por primera vez en agosto de 2020, triplicándose su presencia en 2022.

En lo que respecta a las sinergias con inhibidores, se demostró la excelente capacidad del avibactam para proteger a AZT en estos aislamientos resistentes a CZA por producción de metalobetalactamasas, mientras que la asociación CLA-AZT no presentó actividad *in vitro* debido a la fuerte actividad hidrolítica de la enzima de tipo KPC (13). La disminución en la eficiencia de la detección fenotípica de las carbapenemasas se debe a que ambas  $\beta$ -lactamasas enmascaran mutuamente los perfiles de inhibición. La no disponibilidad de métodos fenotípicos alternativos como los kits inmunocromatográficos, por su alto costo, también dificulta la rápida identificación de estas cepas.

## Conclusión

La emergencia y posterior diseminación de aislamientos de Kpn-KPC+NDM+ ocurrida durante el periodo postpandemia representa un doble desafío tanto para los laboratorios de microbiología clínica, los cuales deben aportar resultados rápidos y certeros, como para los servicios médicos que disponen de escasas alternativas terapéuticas para instaurar el tratamiento para las infecciones causadas por estos microorganismos y a la vez implementar medidas de control para evitar su diseminación. La combinación ceftazidima-avibactam-aztreonam representa una muy buena opción a tener en cuenta en estos aislamientos con multi y extrema resistencia.

## Referencias

1. Nastro M, de Gregorio S, Rodríguez H, Farina J, Foccoli M, Vay C, Famiglietti A. Enterobacterias portadoras de KPC en un hospital universitario. *Rev. Asoc. Méd. Argent.* 2016 Jun; 129(2): 10-12.
2. Cejas D, Fernandez Canigia L, Nastro M, Rodríguez C, Tanco A, Rodríguez H, Vay C, Maldonado I, Famiglietti A, Giovanakis M, Magariños F, Berardinelli E, Neira L, Mollerach M, Gutkind G, Radice M. Hyperendemic clone of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Buenos Aires hospitals. *Infect Genet Evol.* 2012 Apr;12(3):499-501.
3. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 2016 Jun 13;7:895.
4. Pasteran F, Meo A, Gomez S, Derdoy L, Albronz E, Faccone D, Guerriero L, Archuby D, Tarzia A, López M, Corso A. Emergence of genetically related NDM-1-producing *Providencia rettgeri* strains in Argentina. *J Glob Antimicrob Resist.* 2014 Dec;2(4):344-345.
5. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *Biomed Res Int.* 2014;2014:2498562014
6. Rodriguez CH, Maza J, Tamarin S, Nastro M, Vay C, Famiglietti A. In-house rapid colorimetric method for detection of colistin resistance in *Enterobacteriales*: A significant impact on resistance rates. *J Chemother.* 2019 Nov-Dec;31(7-8):432-435.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA; 2018.
8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2021. Setting Breakpoints for New Antimicrobial Agents, EUCAST SOP 1.4. Basel, Switzerland: EUCAST.
9. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol.* 2013 Dec;51(12):4281-3.
10. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011; 70:119–23.
11. Zhang X, Li F, Cui S, Mao L, Li X, Awan F, Lv W, Zeng Z. Prevalence and Distribution Characteristics of *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub> genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Drug Resist.* 2020 Aug 20; 13:2901-2910.
12. Cervino I, Gonzalez D, Nastro M, Vega J, Reyes AP, et al. *In vitro* synergistic activity of aztreonam (AZT) plus novel and old  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations against metallo- $\beta$ -lactamase-producing AZT-resistant *Enterobacteriales*. *J Med Microbiol.* 2021 Oct;70(10).
13. Genç S, Kolaylı F, Özçelik EY. Molecular characterization of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains by multiplex PCR and PFGE methods: The first *K.pneumoniae* isolates co-producing OXA-48/KPC and KPC/NDM in Turkey. *J Infect Chemother.* 2022 Feb;28(2):192-198.

## Phenotypic and genotypic characterization of double carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a University Hospital

The emergence of double-carbapenemase (KPC and NDM) producing *Klebsiella pneumoniae* isolates is one of the consequences derived from the SARS CoV-2 pandemic, which has caused significant impact on the antimicrobial resistance rates in hospital acquired infections. These isolates represent a real challenge for Health Services due to their difficult detection and characterization and subsequent treatment. In the present work we describe the double carbapenemase producing isolates recovered during the year 2022 from clinical samples belonging to hospitalized patients at a University Hospital in Buenos Aires city, we report their phenotypic and genotypic characterization and the excellent “in vitro” activity of the ceftazidime-avibactam-aztreonam combination in the treatment of infections in which the therapeutical options are restricted to non  $\beta$ -lactamic antimicrobials which hold resistance rates higher than 70%.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, double carbapenemase, KPC, NDM



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>