Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Escuela de Bioanálisis

Disertación Previa a la obtención del Título de Bioquímica Clínica

Título

Epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen bla_{KPC}, mediante las técnicas de PFGE y MLST, en cepas de muestras invasivas analizadas en el INSPI-Quito en el periodo 2013-2014

Autores de la disertación

Carolina Satán Salazar

Rafael Tamayo Trujillo

Nombre del Director

Máster José Eduardo Villacís Acuña

Quito, 2016

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **CAROLINA ELIZABETH SATÁN SALAZAR C.I. 1002993481** autor/a del trabajo de graduación intitulado: **"Epidemiología molecular *de Klebsiella pneumoniae* productoras del gen *bla*$_{KPC}$, mediante las técnicas de PFGE y MLST, en cepas de muestras invasivas analizadas en el INSPI-Quito en el periodo 2013-2014",** previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICA CLÍNICA** en la **ESCUELA DE BIOANÁLISIS.**

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

CAROLINA ELIZABETH SATÁN SALAZAR
C.I. 1002993481

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, **VÍCTOR RAFAEL TAMAYO TRUJILLO C.I. 1719703421** autor/a del trabajo de graduación intitulado: **"Epidemiología molecular *de Klebsiella pneumoniae* productoras del gen *bla*$_{KPC}$, mediante las técnicas de PFGE y MLST, en cepas de muestras invasivas analizadas en el INSPI-Quito en el periodo 2013-2014"**, previa a la obtención del grado académico de **BIOQUÍMICO CLÍNICO** en la **ESCUELA DE BIOANÁLISIS.**

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

VÍCTOR RAFAEL TAMAYO TRUJILLO
C.I. 1719703421

DEDICATORIA

A nuestros padres, familiares y amigos por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a la PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR, en especial a la ESCUELA DE BIOANÁLISIS, por la formación tanto ética como académica para nuestro desarrollo como profesionales en el campo de la salud y la investigación.

Al mismo tiempo queremos expresar nuestro profundo agradecimiento al INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA- INSPI, particularmente al equipo de trabajo de las áreas de Microbiología y Biología molecular, por su constante apoyo en este trabajo de investigación.

Nuestro agradecimiento especial al Máster Eduardo Villacís, por su guía, paciencia y confianza en nosotros y nuestro trabajo.

RESUMEN

La resistencia a los antimicrobianos ha significado una verdadera amenaza en salud pública, según el primer informe de la Organización Mundial de la Salud, emitido en el año 2014, donde se reportaron numerosas bacterias con fenotipos de multiresistencia (World Health Organization, 2014). En dicho informe se presenta el uso indiscriminado de antibióticos, tanto en tratamientos clínicos y en agricultura, como el principal factor para el desarrollo de resistencia. En este contexto, la presencia de cepas de *K. pneumoniae* productoras de carbapenemasas tipo KPC se ha incrementado a nivel mundial durante los últimos años (Muñoz-Price et al., 2013). Este microorganismo se asocia a la aparición de brotes intrahospitalarios (Córdova et al., 2012; Gutiérrez et al., 2013; Munoz-Price et al., 2013), provocando un desafío para el personal clínico, al momento de establecer protocolos de control y antibiótico-terapia. (Holta et al, 2015).

Teniendo en cuenta este antecedente, el objetivo de nuestro estudio fue determinar la epidemiología molecular de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen bla_{KPC} (*Kpn*-KPC), aisladas de 80 muestras invasivas provenientes de distintas casas de salud del Ecuador, receptadas en el laboratorio del Centro de Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) del Instituto Nacional de Imvestigación en Salud Pública sede Quito (INSPI-Q), durante periodo 2013-2014. Para lograr este objetivo, en primer lugar se identificó las cepas de acuerdo a los criterios de inclusión, seguido de la confirmación de género y especie de cada una de ellas, en base a pruebas bioquímicas. En segundo lugar se determinó el perfil de susceptibilidad mediante la técnica de Kirby-Bauer, donde se incluyó antibióticos clínicamente útiles e indicadores de mecanismos de resistencia; al mismo tiempo, la producción de carbapenemasas se identificó fenotípicamente mediante 4 métodos: Test de Hodge modificado (THM), Sinergia con Ac. 3-Aminofenil Borónico

(APB), Sinergia con EDTA y por el Método de Inactivación del Carbapenémico (CIM). En tercer lugar, la detección genotípica de carbapenemasas se realizó mediante PCR-Múltiplex, investigando los siguientes genes: *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$ y *bla*$_{OXA-48}$. Por último, para establecer relaciones clonales entre las cepas, se utilizó la tipificación molecular por PFGE (*Pulse Field Gel Electrophoresis*), donde se escogió 42 cepas representativas, teniendo en cuenta sus perfiles de susceptibilidad y el hospital del cual fueron remitidas. De la misma forma, para el desarrollo de MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), se escogieron 14 de las 42 cepas tipificadas por PFGE, teniendo en cuanta los mismos criterios de selección que para PFGE.

Los resultados epidemiológicos arrojados por este estudio, revelan la presencia de infecciones sistémicas causadas por *Kpn*-KPC en varias casas de salud del Ecuador, identificándose el mayor número de casos, en hospitales de la ciudad de Quito. Se demostró la presencia de *Kpn*-KPC en varios servicios hospitalarios como: UCI (36,25%), Pediatría (15%), Cirugía General (8,75%) y Unidad de Quemados (5%). En cuanto a los sitios de infección se destaca un mayor número de aislamientos procedentes de sangre (66,25%) y otros líquidos estériles (21,25%).

Las 80 cepas analizadas fueron identificadas en género y especie como *Klebsiella pneumoniae*, cuyos perfiles de susceptibilidad muestran resistencia a todos los β-lactámicos y otras familias de antibióticos, clasificándolas en las categorías de "multirresistentes" [MDR: 80/80 (100%)], "extensivamente resistentes" [XDR: 74/80 (92,5%)] y posibles "panrresistentes" [PDR: 6/80 (7,5%)]. Todas las cepas analizadas amplificaron para el gen *bla*$_{KPC}$, descartando corresistencias con el resto de genes investigados. En cuanto a la identificación fenotípica de carbapenemasas, el THM, el test

de APB y el CIM, mostraron un nivel de concordancia con PCR del 100%; 97,5% y 100% respectivamente.

La epidemiología molecular por PFGE, demostró diversidad clonal de las cepas de *Kpn*-KPC entre los diversos tipos de muestra, servicios hospitalarios y casas de salud de las cuales provenían. Al mismo tiempo se identificó un clon predominante en los Hospitales 2 y 3, lo que indicó la presencia de brotes intrahospitalarios. Mediante MLST, se encontraron 7 secuencias tipo: ST 25 (37%), ST 258 (28%), ST 392(7%), ST348 (7%), ST 1296(7%) y ST 1271(7%), destacando la presencia de un brote policlonal en el Hospital 3 (ST 258 y ST 25), del cual provenían la mayoría de las muestras analizadas en este estudio.

Las técnicas de PFGE y MLST empleadas en este estudio, reflejan diversidad clonal de *Kpn*-KPC entre varios hospitales y entre diferentes servicios hospitalarios. La presencia de un clon predominante, sugiere una posible transmisión horizontal de este microorganismo dentro de los diferentes servicios hospitalarios, provocada por un posible déficit en las medidas de manejo y control de pacientes infectados por *Kpn*-KPC.

PALABRAS CLAVE

Epidemiología molecular; muestras invasivas; *Kpn-KPC*; PFGE; MLST; Quito

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has meant a real threat to public health, according to the first report of the World Health Organization, issued in 2014, where numerous bacteria with multidrug resistance phenotypes (World Health Organization, 2014) were reported. In that report the indiscriminate use of antibiotics, both in clinical treatments and agriculture, as the main factor for the development of resistance occurs. In this context, the presence of *K. pneumoniae* strains producing KPC carbapenemases has increased worldwide in recent years (Muñoz-Price et al., 2013). This microorganism is associated with the occurrence of nosocomial outbreaks (Cordova et al, 2012., Gutierrez et al, 2013; Munoz-Price et al, 2013), causing a challenge for clinicians, when establishing control protocols and antibiotic therapy. (Holta et al, 2015).

Given this background, the aim of our study was to determine the molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing the bla_{KPC} gene (*Kpn*-KPC), isolated from 80 invasive samples from different health houses of Ecuador, receptadas laboratory Center reference National Antimicrobial Resistance (RAM) of the National Institute of Public Health Imvestigación headquarters Quito (INSPI-Q) during 2013-2014. To achieve this goal, first strains according to the inclusion criteria, followed by confirmation of genus and species of each, based on biochemical tests were identified. Second profile susceptibility was determined by the Kirby-Bauer technique, where clinically useful antibiotics and indicators of resistance mechanisms was included; while production carbapenemases phenotypically identified by four methods: Modified Hodge Test (THM), Synergy with Ac. 3-aminophenyl boronic acid (APB), Synergy with EDTA and Inactivation Method carbapenem (CIM). Third, carbapenemases genotypic detection was performed by PCR-Multiplex, investigating the following genes: bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP}, bla_{VIM} and bla_{OXA-48}. Finally, to establish clonal relationship between the strains, molecular typing by PFGE

(Pulse field gel electrophoresis), which was chosen 42 representative strains was used, taking into account their susceptibility profiles and the hospital which were forwarded. Likewise, for the development of MLST (Multi Locus Sequence Typing), they were selected 14 of the 42 serotypes by PFGE, taking into account the same selection criteria for PFGE.

Epidemiological results obtained from this study reveal the presence of systemic infections caused by *Kpn*-KPC in various health houses Ecuador, identifying the highest number of cases in hospitals in the city of Quito. UCI (36.25%), pediatrics (15%), general surgery (8.75%) and Burn Unit (5%): the presence of *Kpn*-KPC in various hospital services as demonstrated. Regarding sites of infection more isolates from blood (66.25%) and other sterile liquids (21.25%) stands.

The 80 strains tested were identified in genus and species as *Klebsiella pneumoniae*, whose susceptibility profiles show resistance to all β-lactams and the other families of antibiotics, classifying them into categories of "multiresistant" [MDR: 80/80 (100%)], "extensively resistant" [XDR: 74/80 (92.5%)] and possible "panrresistentes" [PDR: 6/80 (7.5%)]. All strains tested bla_{KPC} gene amplified for discarding corresistencias with other genes investigated. As for phenotypic identification carbapenemases, THM, the test CIM APB and showed a level consistent with 100% PCR; 97.5% and 100% respectively.

Molecular epidemiology by PFGE showed clonal diversity of strains *Kpn*-KPC among the various types of shows, hospital and nursing homes from which they came. At the same time a predominant clone was identified in hospitals 2 and 3, which indicated the presence of nosocomial outbreaks. ST 25 (37%) ST 258 (28%), ST 392 (7%), ST348 (7%), ST 1296 (7%) and ST 1271 (7%): MLST, seven sequences type they found highlighting the presence of a polyclonal outbreak in Hospital 3 (ST 258 and ST 25), which came most of the samples analyzed in this study.

PFGE and techniques used in this study MLST reflect clonal diversity *Kpn*-KPC between several hospitals and between different hospitals. The presence of a dominant clone, suggesting a possible horizontal transmission of this organism within different hospital services, caused by a possible deficit management measures and control *Kpn*-KPC-infected patients.

KEYWORDS

Molecular epidemiology; invasive samples; *Kpn*-KPC; PFGE; MLST; Quito

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA iv

AGRADECIMIENTO v

RESUMEN vi

ABSTRACT ix

LISTA DE TABLAS xvi

LISTA DE GRÁFICOS xvii

LISTA DE ANEXOS xviii

LISTA DE SIGLAS xix

CAPÍTULO I 1

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN 1

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 2

1.2. JUSTIFICACIÓN 3

1.3. OBJETIVOS 4

1.3.1. Objetivo General 4

1.3.2. Objetivos Específicos 4

1.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO 5

1.5. ANTECEDENTES 6

CAPÍTULO II 8

2.1. MARCO TEÓRIO 8

2.2. Familia Enterobacteriaceae 8
2.3. Características Generales 8
2.4. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* 10
2.5. Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae* 10
2.6. Características moleculares de *Klebsiella pneumoniae* 11
2.7. *Klebsiella pneumoniae* en infecciones asociadas a la atención en salud 11
2.8. Mecanismos de acción de los antibióticos 12
2.9. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos 14
2.10. Descripción de serin-carbapenemasas tipo KPC 16
2.11. Epidemiología 18
2.12. Métodos de detección de carbapenemasas tipo KPC 18
2.2. MARCO CONCEPTUAL 27
2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 30
CAPÍTULO III 32
3.1. MARCO METODOLÓGICO 32
3.1.1. Tipo de Estudio 32
3.1.2. Muestra y muestreo 32
3.1.3. Tamaño de la Muestra 32
3.1.4. Criterios de Inclusión 34
3.1.5. Criterios de Exclusión 34
3.2. Procedimientos de laboratorio 35

3.2.1. Materiales y reactivos 35
3.3. MÉTODOS 38
3.3.1. Fase I 38
3.3.2. Fase II 38
3.3.3. Fase III 40
3.3.4. Fase IV 41
3.4. Control de Calidad 41
3.4.1. Mueller-Hinton Agar 41
3.4.2. Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas 42
3.4.3. Pruebas genotípicas para la detección de carbapenemasas 42
CAPÍTULO IV 43
4.1. RESULTADOS 43
4.1.1. Variables clínicas y epidemiológicas 43
4.1.2. Perfiles de susceptibilidad de los 80 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* 44
4.1.3. Identificación de corresistencias en *Klebsiella pneumoniae* KPC 46
4.1.4. Correlación de métodos fenotípicos y genotípicos 48
4.1.5. PRUEBAS GENOTIPICAS 49
4.2. DISCUSION 60
4.3. CONCLUSIONES 65
4.4. RECOMENDACIONES 67

5. BIBLIOGRAFÍA 68

6. ANEXOS 76

7. GRÁFICOS 96

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Genes housekeeping y secuencias de Primers utilizados para MLST de *Klebsiella pneumoniae*..... 25
Tabla 2 Características epidemiológicas de las 80 cepas de *Kpn*-KPC obtenidas de casas de salud del país en el periodo 2013-2014. 44
Tabla 3 Perfiles de susceptibilidad de las 80 cepas de *Kpn*-KPC obtenidas de casas de salud del país en el periodo 2013-2014. 45
Tabla 4 Variación alélica y Secuencias Tipo de *Kpn*-KPC encontradas utilizando MLST 55
Tabla 5 Distribución por servicio hospitalario de las 14 cepas analizadas mediante MLST de aislados de *K. pneumoniae* provenientes de diversas casas de salud del país en el perioodo 2013-2014..... 57
Tabla 6 Master Mix para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC mediante PCR Múltiplex (M 1: bla_{KPC}, $bla_{OXA\text{-}48}$, bla_{IMP}). 84
Tabla 7: Master Mix para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC mediante PCR Múltiplex (M 2: bla_{NDM}, bla_{VIM}). 84
Tabla 8 Genes housekeeping para MLST de *Klebsiella pneumoniae* 88
Tabla 9 Reactivos que componen el volumen total de la reacción..... 88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Estructura química de los carbapenémicos 13
Gráfico 2 Distribución mundial de microorganismos productores de carbapenemasas en el año 2013 16
Gráfico 3 Corresistencia presente en los 80 aislados de *K. pneumoniae* KPC obtenidas de casas de salud del país en el periodo 2013-2014. 48
Gráfico 4 Corrida electroforética de PCR múltiplex para la detección de los genes bla_{KPC}, bla_{Oxa-48}, bla_{IMP} (M1) y bla_{NDM}, bla_{VIM} (M2). 49
Gráfico 5 Perfil de macro-restricción de DNA genómico por PFGE de 9 cepas de *Kpn*-KPC. 50
Gráfico 6 Dendrograma de 42 cepas de *Kpn*-KPC tratadas con 30U/muestra de la enzima XbaI (50U/uL 52
Gráfico 7 Corrida electroforética de amplicones purificados mediante el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin para secuenciación. 54
Gráfico 8 Porcentaje de Secuencias Tipo encontradas en las 14 cepas de *Kpn*-KPC 56
Gráfico 9 Dendrograma basado en los patrones de bandas por PFGE de las 14 cepas con sus respectivas Secuencias Tipo. 58
Gráfico 10 Dendrograma de las secuencias tipo encontradas en aislados de *Kpn*-KPC 59
Gráfico 11 Detección de carbapenemasas mediante el Test de Hodge Modificado (THM) en aislados de *Kpn*-KPC. 96
Gráfico 12 Detección de serín-carbapenemasas por el Test de Ácido 3 amino-fenilborónico (APB) en asilados de *Kpn*-KPC 97
Gráfico 13 Método de Inactivación de Carbapenémicos (CIM) para la detección fenotípica de carbapenemasas en asilados de *Kpn*-KPC 98
Gráfico 14 Detección fenotípica de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), Cefalosporinasas (AmpC), Métalo beta-lactamasas (MBL)..... 99

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 Identificación de Género y Especie de *K. pneumoniae* 76
Anexo 2 Protocolo del antibiograma por el método de difusión de discos (Kirby- Bauer) para *Kpn*-KPC 77
Anexo 3 Protocolo para el Test de Doble Disco (Jarlier) para la detección en BLEE en *Kpn*-KPC 78
Anexo 4 Protocolo del Test de Hodge Modificado para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC 79
Anexo 5 Protocolo de trabajo para el test de Ácido 3-Animofenil Borónico para la detección de serín carbapenemasas en *Kpn*-KPC 80
Anexo 6 Protocolo de trabajo del Método de Inactivación del Carbapenémico para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC. 81
Anexo 7 Protocolo de trabajo del Test de EDTA para la detección de Metalobetalactamasas en *Kpn*-KPC. 82
Anexo 8 Procedimiento para la crio-preservación de las cepas de *Kpn*-KPC 83
Anexo 9 Protocolo de trabajo para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC mediante PCR Múltiplex 84
Anexo 10 Protocolo de trabajo para PFGE de *Kpn*-KPC 86
Anexo 11 Protocolo de trabajo para estudio MLST en *Kpn*-KPC 88
Anexo 12 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN MEDIANTE EL USO DE: PureLink® Genomic DNA Mini Kit 90
Anexo 13 PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN MEDIANTE EL USO DE: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin 92
Anexo 14 PROTOCOLO DE PREPARACIÓN Y ENVIO DE MUESTRAS PARA SECUENCIACION: MACROGEN 93
Anexo 15 MATRIZ DE TRABAJO EXCEL 94
Anexo 16 MATRIZ DE TRABAJO WHONET 5.6 95

LISTA DE SIGLAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APB	3-Phenil Borónico
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Método de Inactivación del Carbapenémico
CLSI	Clinical Laboratory Standars Institute
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERC	*Enterobacterias* resistentes a carbapenémicos
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Food and drug administration
IAAS	Infecciones asociadas a la atención en Salud
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
Kpn	*Klebsiella pneumoniae*
Kpn-KPC	*Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC
MDR	Multidrug Resistance
MLST	Multi Locus Sequence Typing
NDM	New Delhi metallo-β-lactamase
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PDR	Pandrug Resistance
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis
RAM	Red de Resistencia a los Antimicrobianos
ST	Secuencia tipo
THM	Test de Hodge modificado
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VIM	Verona integron–encoded metallo-β-lactamase
XDR	Extensive Drug Resistance

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Durante los últimos años, los reportes de enterobacterias con resistencia a carbapenémicos (ERC) a nivel mundial, se ha convertido en uno de los principales problemas en salud pública (Muñoz-Price et al., 2013). Se han reportado brotes intrahospitalarios causados por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC (*Kpn*-KPC) en Norteamérica (Endimiani et al., 2009; Munoz-Price et al., 2013; Tijet et al., 2014), Centroamérica (Quiñones et al., 2014) y en Sudamérica (Córdova et al., 2012; Ribeiro et al., 2016; Rodríguez et al., 2014); donde países como: Argentina, Colombia y Brasil han realizado estudios descriptivos tanto de los perfiles de susceptibilidad y de epidemiología molecular en brotes intrahospitalarios causados por *Kpn*-KPC. (Córdova et al., 2012; Ribeiro et al., 2016; Rodríguez et al., 2014).

La aparición de cepas productoras de carbapenemasas tipo KPC se asocia a la alta capacidad de diseminación y transferencia de información genética entre microorganismos de la misma especie (Munoz-Price et al., 2013; Juan Nicolau & Oliver, 2010). La transferencia genética del gen bla_{KPC} esta mediada por el transposón *Tn4401* (Cuzon, Naas, & Nordmann, 2011), el cual tiene la capacidad de acoplar el material genético en cualquier punto del genoma huésped, debido a que no tiene un blanco específico de inserción (Cuzon et al., 2011).

La expresión del gen *bla*$_{KPC}$ confiere a la bacteria la capacidad de producir enzimas dependientes de serina (Muñoz-Price et al., 2013), las cuales van a hidrolizar todos los β-lactámicos, incluyendo los carbapenémicos, usados como antibióticos de última línea (López Vargas & Echeverri Toro, 2010; Munoz-Price et al., 2013). El tratamiento de elección para infecciones por este tipo de microorganismos se basa en experiencias clínicas y estudios descriptivos realizados (Muñoz-Price et al., 2013), sugiriendo el uso de terapias combinadas dobles o triples en dosis controladas, que incluyen a colistín, tigeciclina, un carbapenémico o aminoglucósidos (Córdova et al., 2012; Munoz-Price et al., 2013); en la actualidad la FDA ha aprobado el uso de Ceftazidima-avibactam como tratamiento para ERC (Caravaca, 2015; Humphries et al., 2015). Sin embargo, ya se han descrito casos de resistencia a estos antibióticos (Humphries et al., 2015).

En este estudio se pretende relacionar las características epidemiológicas de 80 aislados de *Kpn-KPC*. Correlacionar los perfiles de susceptibilidad con la diversidad clonal presente en medio intrahospitalario de nuestro país. Al mismo tiempo se pretende establecer protocolos de identificación fenotípicos, que presenten una alta concordancia con métodos genotípicos.

Los resultados de este estudio ayudarán a tener un panorama claro de este microorganismo a nivel intrahospitalario, brindando información para el mejoramiento en las medidas de prevención, control y manejo de infecciones provocadas por *Kpn*-KPC.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la diversidad clonal de *Klebsiella pneumoniae* con presencia del gen *bla*$_{KPC}$ en hospitales del país?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Desde el primer reporte de *Kpn-KPC* en Estados Unidos en el año 1996 y hasta la actualidad, se han realizado a nivel mundial, diversos estudios del comportamiento clínico y epidemiológico en brotes intrahospitalarios causados por este microorganismo. (Córdova et al., 2012; Echeverri & Cataño, 2010; Endimiani et al., 2009; Gutiérrez et al., 2013; Holt et al., 2015; Munoz-Price et al., 2013; Rodríguez et al., 2014). Todas estas investigaciones concuerdan en la rápida diseminación y el desarrollo de brotes intrahospitalarios, asociados con largas estancias hospitalarias, enfermedades base, antibiótico-terapia inadecuada y la falta de medidas de control y manejo de pacientes infectados con este tipo de microorganismos.(Córdova et al., 2012; Endimiani, DePasquale, et al., 2009; Holt et al., 2015; Tijet et al., 2014).

Los datos en nuestro país acerca de este microorganismo se limitan a estudios realizados por Zurita y colaboradores en el 2010, en donde detectaron el primer caso de *Kpn*-KPC en un paciente posquirúrgico. Sin embargo datos recolectados por el Laboratorio del Centro Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Inspi-Q, en el año 2014, presentaron una alta presencia de este microorganismo a nivel hospitalario. Teniendo en cuenta los antecedentes y el alto número de nuevos casos reportados en el país, este trabajo pretende implementar técnicas fenotípicas en el laboratorio de microbiología para la temprana identificación de este mecanismo de resistencia en el laboratorio de microbiología, lo que favorecería al manejo y control temprano de pacientes infectados por *Kpn*-KPC reduciendo su estancia hospitalaria, además de realizar técnicas genotípicas para la caracterización molecular de este microorganismo.

Los resultados del presente estudio proporcionarán los niveles de resistencia de este microorganismo, además de la implementación de técnicas fenotípicas con altos niveles de concordancia con técnicas moleculares para el diagnóstico de carbapenemasas tipo KPC.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo General

Determinar la clonalidad en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen bla_{KPC}, mediante las técnicas de PFGE y MLST, en muestras invasivas analizadas en el INSPI-Q durante el periodo 2013-2014.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Identificar las cepas de *Kpn*-KPC aisladas de muestras invasivas pertenecientes al periodo 2013-2014, de acuerdo a los criterios de inclusión.
- Determinar los perfiles de susceptibilidad de antibióticos clínicamente útiles en cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen $bla_{KPC.}$
- Implementar protocolos de trabajo de técnicas fenotípicas y genotípicas para la identificación de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen bla_{KPC}.
- Establecer relaciones clonales entre las cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen bla_{KPC} por medio de PFGE.
- Determinar la secuencia tipo en clones predominantes de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen bla_{KPC} mediante MLST.

1.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

La falta de datos clínico-epidemiológicos de ciertas cepas analizadas en el presente estudio, fue una limitante al momento del ingreso de datos y el análisis de resultados.

Limitaciones de carácter económico para desarrollar la caracterización genotípica completa de las cepas de estudio. (Secuenciación del genoma completo)

1.5. ANTECEDENTES

En el año 2012, Muñoz y colaboradores presentaron un estudio en el cual describen el primer caso de *Kpn*-KPC en 1996; presentan la distribución geográfica de este microrganismo, además de señalar a ciertos países de América del Sur como zonas endémicas de KPC tipo 2 y 3 (Muñoz-Price et al., 2013). Al mismo tiempo, utilizaron métodos de identificación microbiológica y molecular de este mecanismo de resistencia (Muñoz-Price et al., 2013); también se mencionan las posibles terapias alternativas empleadas hasta el momento y el desarrollo de nuevos fármacos para tratar IAAS causadas por este microorganismo. (Muñoz-Price et al., 2013)

Continuando con las investigaciones de *Kpn-KPC*, en el año 2014 Melano et. al, caracterizan con técnicas moleculares varios aislados de este microorganismo provenientes de varias casas de salud de Ontario, Canadá (Tijet et al., 2014). Como punto de partida toman los perfiles de susceptibilidad y los correlacionan con los resultados obtenidos mediante PCR para la identificación de carbapenemasas, mientras que la tipificación molecular reveló a la ST 258 como clon predominante, donde todos los aislados con este tipo de ST, presentaban una estrecha relación clonal por PFGE (Tijet et al., 2014).

Como se describe anteriormente, uno de los países de Sudamérica donde se presenta este microorganismo de forma endémica es Argentina, en el cual se describen brotes intrahospitalarios asociados a la secuencia tipo 258 (ST 258), la cual se asocia a la expresión del gen bla_{KPC} tipo 2 (Endimiani, Hujer, et al., 2009). Es el caso del estudio presentado por el grupo de investigación realizada por Córdova y colaboradores, del Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas “Dr. Carlos G. Malbrán” en el año 2012, el cual detalla la descripción clínica y epidemiológica en un brote nosocomial por *Kpn*-KPC

en la ciudad de Buenos Aires. Sus resultados demuestran la presencia de un clon (ST 258) distribuido en varias salas de hospitalización y recuperado de diversas muestras invasivas (Cordova et al, 2012). Los perfiles de susceptibilidad presentaron sensibilidad a Tigeciclina y Colistín. Por último asocian una mortalidad atribuible del 26%, llegando a concluir una elevada capacidad de diseminación y altas tasas de mortalidad (Cordova et al, 2012).

En nuestro país en el año 2010 se reporta el primer caso de un paciente post-quirúrgico que presentó de una *K. pneumoniae* productora de KPC tipo 2 tras el estudio tanto fenotípico como genotípico de una secreción purulenta, obtenida a partir de una herida quirúrgica (Iñiguez et al., 2012). Siguiendo esta línea de investigación se desarrolló un estudio en el periodo de 2010-2012, con el objeto de describir cepas de *Kpn*-KPC obtenidas de diferentes casas de salud, partiendo de pruebas fenotípicas para continuar con la identificación molecular por PCR y la determinación de diversidad clonal mediante PFGE (Zurita et al., 2013).

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRIO

2.2. Familia Enterobacteriaceae

Esta familia está constituido por un numeroso grupo de bacterias gram negativas (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2009), clasificados en más de 40 géneros con numerosas especies y subespecies, de las cuales un pequeño número son responsables de infecciones a seres humanos (Murray et al., 2009).

Se encuentran distribuidos en varios nichos ecológicos incluido el aparato gastrointestinal de los seres humanos, donde se presentan como flora saprófita, pero que en condiciones de inmunodepresión, pueden llegar a producir infecciones en varias partes del cuerpo (microorganismos oportunistas) (Murray et al., 2009).

Una de las principales características de esta familia, es la capacidad de compartir material génico, a partir de elementos genéticos móviles como: plásmidos, transposones, integrones, etc. (Murray et al., 2009).

2.3. Características Generales

Se presentan como bacilos gram negativos, de 1-3*u*m de largo por 0,5*u*m de diámetro, son catalasa positivos (Murray et al., 2009), reducen los nitratos a nitritos, anaerobias facultativas y no presentan actividad de citocromo oxidasa, ésta última, característica que las permite diferenciarse de otro grupo de bacilos negativos no fermentadores (*Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp*.) (Murray et al., 2009).

Una característica que permite diferenciar entre géneros de *Enterobacteriaceae*, es la capacidad de fermentar lactosa, donde se observan colonias de color rosado en medios selectivos como el agar MacConkey (*Klebsiella spp., Escherichia spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp., Serratia spp.*), mientras que cepas como: *Proteus spp., Salmonella spp., Shigella spp., o Yersinia spp*., se presentan como incoloras en agar MacConkey (No fermentadoras de lactosa)(Murray et al., 2009).

La pared celular de estas bacterias está compuesta por un importante factor de virulencia, el Lipopolisacárido (LPS), que tiene acción de endotoxina (Murray et al., 2009). El LPS rodea una membrana externa compuesta mayoritariamente por proteínas, las cuales facilitan el paso de numerosas sustancias incluidos los antibióticos (Puerta & Mateos, 2010), luego de la membrana externa se encuentra un espacio periplásmico que se comunica con una membrana interna la cual permite el paso de nutrientes, macromoléculas y metabolitos importantes para la bacteria (Murray et al., 2009; Puerta & Mateos, 2010).

Otra característica de las enterobacterias es su motilidad, ya que presentan flagelos perítricos, aunque también existen enterobacterias no mótiles (*Klebsiella spp., Shigella spp*.) ((Murray et al., 2009). Además de los flagelos, estos microorganismos poseen otra característica muy importante, que es la presencia de pilis (fimbrias)(Murray et al., 2009), los cuales se dividen en 2 clases: el primero conocida como fimbrias comunes, encargados de la adhesión bacteriana en la célula huésped y los ***pilis sexuales*** (Murray et al., 2009)**,** los que se encargan de la transferencia horizontal de material genético, muy estudiado hoy en día por conferir resistencia a numerosos antibióticos incluidos los de amplio espectro (carbapenémicos) (Cuzon et al., 2011).

2.4. Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae*

Este microorganismo se clasifica como bacilo Gram negativo, el cual es anaerobio facultativo, presenta cápsula, no motil, fermentador de lactosa, hidroliza la urea y es positivo para la prueba de Voges Proskauer, características bioquímicas que permiten su identificación fenotípica (Echeverri & Cataño, 2010; Murray et al., 2009).

2.5. Factores de virulencia de *Klebsiella pneumoniae*

En el caso de *Klebsiella pneumoniae*, la presencia de una estructura capsular la protege contra la respuesta inmune, específicamente de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares (Murray et al., 2009). *Klebsiella pneumoniae* además va a presentar otro tipo de estructuras como las fimbrias (pilis), los cuales cumplen la función de adherencia que facilitará la colonización y proliferación bacteriana; por ejemplo los pilis tipo 1 que actúan en el tracto urinario fijándose a las células del túbulo proximal (Echeverri & Cataño, 2010; Murray et al., 2009; Ullmann, 1998).

En el caso del antígeno O ó lipopolisacárido, este burla al complemento, específicamente C3b, recubriendo a la bacteria por completo y dejando libre una porción que no va a ser reconocida como extraña (Murray et al., 2009). Otro factor de virulencia son los sideróforos los cuales van captar el hierro de las proteínas del medio (López Vargas & Echeverri Toro, 2010).

Pero el principal mecanismo de defensa frente a los antimicrobianos es la producción de enzimas hidrolíticas producidas por expresión de genes de resistencia, los cuales generalmente son adquiridos por elementos genéticos móviles (Tijet et al., 2014).

Donde el gen *bla*$_{KPC}$, es el que se encuentra con mayor frecuencia en *Klebsiella pneumoniae* (Córdova et al., 2012; Iñiguez et al., 2012; Holt et al., 2015; Tijet et al., 2014; Zurita et al., 2013).

2.6. Características moleculares de *Klebsiella pneumoniae*

La capacidad de adaptación de *Klebsiella pneumoniae* se debe a su alta variabilidad genética expresando diversas características fenotípicas (Murray et al., 2009). Además la facilidad de acoplar elementos genéticos móviles, que contienen genes de resistencia a los diversos antimicrobianos (Holt et al., 2015).

2.7. *Klebsiella pneumoniae* en infecciones asociadas a la atención en salud

Klebsiella pneumoniae se considera un patógeno oportunista causante de un gran número de infecciones asociadas al área de la salud, descrito como un microorganismo multirresistente diseminado a nivel mundial (Holt et al., 2015).

El género *Klebsiella* pertenece a la familia de las *Enterobacterias*(Murray et al., 2009), donde *Klebsiella pneumoniae* forma parte de la flora normal de individuos sanos (flora comensal)(Murray et al., 2009) y que puede causar infecciones a seres humanos cuando existe un estado de inmunodepresión, generalmente asociada a una enfermedad base (Murray et al., 2009). Esta característica y la adquisición de mecanismos de resistencia mediadas por elementos genéticos móviles, dan origen al desarrollo de infecciones asociadas a la atención en salud (patógeno oportunista) (Holt et al., 2015; Munoz-Price et al., 2013), produciendo casos de septicemia, infecciones en tracto respiratorio, urinario y tejidos blandos a pacientes hospitalizados (Holt et al., 2015;

Ullmann, 1998), además se citan casos de infecciones adquiridas en la comunidad (Holt et al., 2015).

2.8. Mecanismos de acción de los antibióticos

Los mecanismos de acción antibiótica, se dan en base al sitio diana de cada tipo de antibiótico (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Se clasifican según su actividad bacteriana en: bactericidas y bacteriostáticos (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

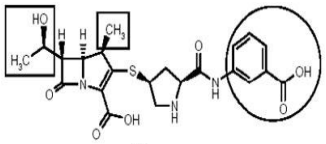
Dentro del grupo de antibióticos bactericidas se encuentran los betalactámicos, clasificados en diferentes clases (Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactámicos, Carbapenémicos), los cuales actúan inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana y provocando muerte celular (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). En este mismo grupo se encuentran las Polimixinas, antibióticos que alteran la membrana citoplasmática (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Los antibióticos que alteran el metabolismo y estructura del DNA bacteriano (Quinolonas, Fluoroquinolonas, Nitrofuranos) también se encuentran en este grupo, así como también los aminoglucósidos que inhiben la síntesis proteica (Gentamicina, Amikacina, Tobramicina).

Mientras que entre los antibióticos bacteriostáticos (Inhiben temporalmente el desarrollo bacteriano) (Calvo & Martínez-Martínez, 2009), encontramos a los Macrólidos, Tetraciclinas, Lincosamidas, el Ácido Fusídico y las Glicilclicinas (Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Es importante mencionar también a antibióticos que actúan como inhibidores de β-lactamasas (Tazobactam, Sulbactam, Ac. Clavulánico) (Calvo & Martínez-Martínez, 2009).

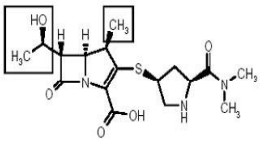
2.8.1. Carbapenémicos

Los carbapenémicos pertenecen a la familia de los β-lactámicos, los cual ejercen su acción sobre la síntesis de la pared bacteriana (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Murray et al., 2009). Su estructura química se compone de un anillo β-lactámico asociado a sustancias nucleofílicas, las cuales le proveen mayor estabilidad a la molécula, y permiten la clasificación de los carbapenémicos, como se observa en el **Gráfico 1** (Murray et al., 2009). Estos antimicrobianos presentan actividad bactericida de amplio espectro y van a ser la principal opción terapéutica en infecciones provocadas por microorganismos resistentes al resto de β-lactámicos (Murray et al., 2009; Hawkey & Livermore, 2012). El principal mecanismo de resistencia va a ser la inactivación del Carbapenémico mediada por la producción de enzimas hidrolíticas (Carbapenemasas) (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Murray et al., 2009).

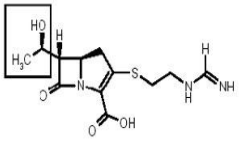
Gráfico 1 Estructura química de los carbapenémicos



Ertapenem



Meropenem



Imipenem

FUENTE: MORALES I., RICARDO. Ertapenem: Una nueva clase de carbapenem. *Rev. chil. Infectol* . 2003, vol.20, n.4, pp. 270-276. ISSN 0716-1018.

2.8.2. Clasificación de resistencias antibiótica

Actualmente encontramos microorganismos resistentes a múltiples familias de antibióticos, y de acuerdo al número de antibióticos resistentes por familia se clasifican en: Multidrogo-resisente (MDR), Extensivamente-resistente (XDR) y Panrresistente (PDR) (Falagas & Karageorgopoulos, 2008; Magiorakos et al., 2011). La definición para un microorganismo MDR sería cuando presentan resistencia a mínimo 3 clases de antimicrobianos (Falagas & Karageorgopoulos, 2008; Magiorakos et al., 2011); por el contrario en el caso de microorganismos XDR, la opción terapéutica para combatir este tipo de microorganismos se reduce a 2 o 3 antimicrobianos (Falagas & Karageorgopoulos, 2008; Magiorakos et al., 2011).

En cuanto a los microorganismos PDR, estos van a ser resistentes a todos los antimicrobianos comercializados hasta la actualidad (Falagas & Karageorgopoulos, 2008; Magiorakos et al., 2011). Entre las posibles causas encontradas para que se produzcan este tipo de resistencias se citan el acoplamiento de genes de resistencia y el uso incorrecto en las dosis de antimicrobianos usado para combatir diversos tipos de infecciones (Holt et al., 2015; Munoz-Price et al., 2013).

2.9. Mecanismos de resistencia a carbapenémicos

2.9.1. β-lactamasas

El principal mecanismo de resistencia en la familia *Enterobacteriaceae* a los betalactámicos, es la producción de enzimas hidrolíticas (Bush & Jacoby, 2010; García, de la Gándara, & García, 2010; Vila & Marco, 2010). El uso de penicilinas, cefalosporinas y

carbapenémicos en bacilos negativos de importancia clínica, ha sido mencionado como la causa para el desarrollo de este tipo de resistencia (Bush & Jacoby, 2010), por un proceso de adaptación natural (Iredell, Brown, & Tagg, 2016).

2.9.2. Clasificación de β-lactamasas

En 1980, Ambler describió y clasificó a las β-lactamasas en base a la estructura de aminoácidos los grupos moleculares: A, B, C y D (Bush & Jacoby, 2010), donde las β-lactamasas de los grupos A, C, D, necesitan moléculas de serina en su centro activo (Bush & Jacoby, 2010), los cuales van a ser capaces de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas, oxacilinas, y carbapenémicos (Calvo & Martínez-Martínez, 2009; Holt et al., 2015). Mientras que en el grupo B de esta clasificación, se encuentran las "metaloenzimas", las cuales necesitan iones de Z^{2+} como cofactor (Bush & Jacoby, 2010) y permitiéndoles hidrolizar los antibióticos antes mencionados (Holt et al., 2015), pero a diferencia de los otros grupos no hidroliza monobactámicos (Rodríguez et al., 2014).

2.9.3. Carbapenemasas

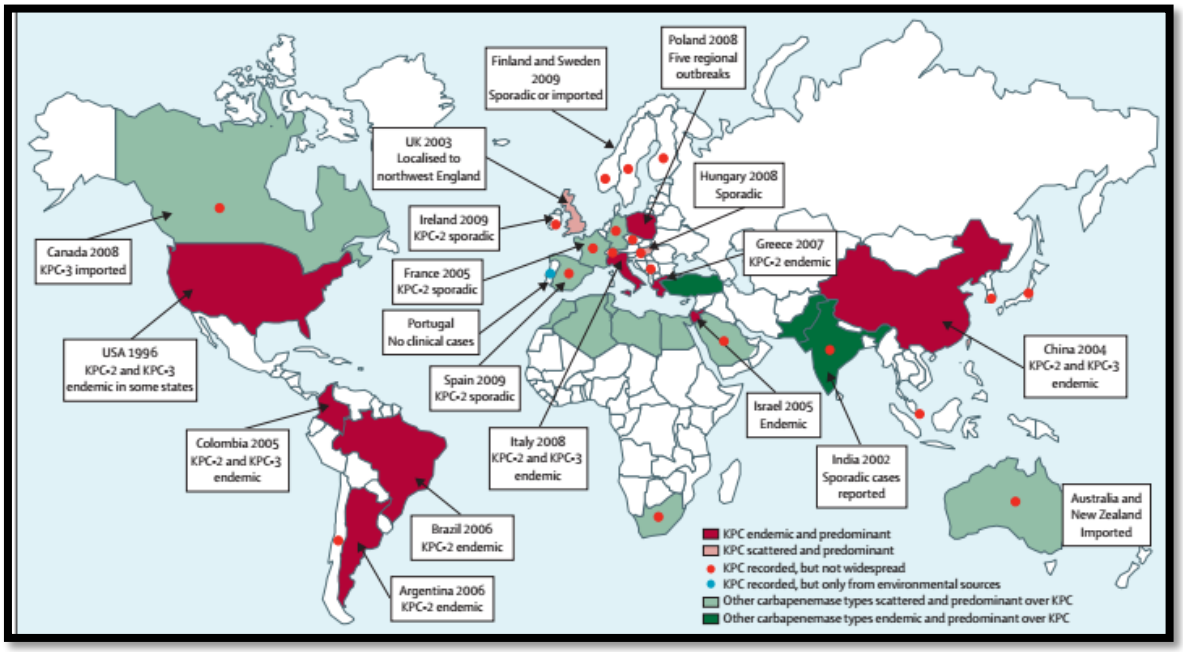
Dentro del grupo de las β-lactamasas se encuentran las carbapenemasas, las cuales van a hidrolizar a todos los β-lactámicos, desde los más simples como las penicilinas hasta antibióticos de amplio espectro como los carbapémicos (Murray et al., 2009; Córdova et al., 2012; Holt et al., 2015). Como consecuencia la opción terapéutica es limitada para pacientes que presenten infecciones bacterianas con este tipo de resistencia (Munoz-Price et al., 2013; Rodríguez et al., 2014).

2.10. Descripción de serin-carbapenemasas tipo KPC

El primer aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC se realizó en Estados Unidos en el año 1996 (Muñoz-Price et al., 2013), estas se describen como enzimas hidrolíticas, las cuales necesitan serina en su centro activo como cofactor, hidrolizando a todos los β-lactámicos (Bush & Jacoby, 2010; Muñoz-Price et al., 2013).

Estudios recientes han demostrado que este tipo de resistencia se presenta de forma endémica en diversos países como: Colombia, Brasil, Argentina, Israel, Grecia, España, Portugal, entre otros como se observa en el **Gráfico 2** (Muñoz-Price et al., 2013).

Gráfico 2 Distribución mundial de microorganismos productores de carbapenemasas en el año 2013



Fuente: Muñoz, S., Poirel, L., Bonomo, R., Schwab, M., Cornaglia, G., Garau, J., y otros. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion ok *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. The Lancet Infectious Diseases, 13(9), 785-796.

La principal vía de diseminación para este tipo de resistencia, esta mediada por la transferencia horizontal de material genético móvil, donde el transposón Tn4401 está altamente implicado en la transmisión del gen *bla*$_{KPC,}$ en varias especies de la familia

Enterobacteriaceae (Cuzon et al., 2011). El transposón Tn*4401* con un peso de 10 kb se encuentra formado por 2 secuencias repetidas de 39pb cada una, localizadas en los extremos del transposón; presenta 3 isoformas (a,b,c), las cuales contienen además del gen *bla*$_{KPC}$, dos secuencias de inserción (IS*Kpn6*, IS*Kpn7*) (Cuzon et al., 2011); esta información genética se va a acoplar al genoma de la bacteria receptora, provocando la producción enzimática (Cuzon et al., 2011; Rodríguez et al., 2014).

2.10.1. Diseminación de Klebsiella pneumoniae en el ambiente hospitalario

Este microorganismo se asocia a una alta prevalencia de IAAS, causadas por varios factores de riesgo como: pacientes con enfermedades base o alguno tipo de inmunodepresión (Holt et al., 2015), llegando a ocasionar cuadros graves de septicemia, infecciones en tejidos blandos y colonización, provocando largas estancias intrahospitalarias (Córdova et al., 2012; Munoz-Price et al., 2013; Ruiz-Garbajosa et al., 2013; Holt et al., 2015).

La capacidad de este microorganismo de formar biopelículas en dispositivos médicos (Echeverri & Cataño, 2010), hace de estos un foco infeccioso para pacientes conectados a ventilación mecánica invasiva y el uso de otros dispositivos médicos invasivos como catéteres centrales, vías intravenosas periféricas, sondas nasogástricas o vesicales (Echeverri & Cataño, 2010; Ullmann, 1998). Otro factor de riesgo importante es la transmisión horizontal a través de personal médico o instrumentos contaminados (López Vargas & Echeverri Toro, 2010).

2.11. Epidemiología

La epidemiología se define como una ciencia que se encarga de estudiar la distribución de enfermedades en una población específica, debido a la interacción de factores genéticos y ambientales, todo esto para implementar medidas de control dentro de salud pública. (Gordis, 2014)

El desarrollo de estudios epidemiológicos permite conocer ciertos datos sobre una enfermedad, tales como: determinar la etiología de la enfermedad para poder establecer el riesgo de contagio dentro de los miembros de una población, dependiendo del impacto y la rápida diseminación de la misma (Gordis, 2014). Además nos muestra una clara visión de cómo proceder frente a una enfermedad, instaurando protocolo de diagnóstico y control de acuerdo a la historia natural de la enfermedad (Gordis, 2014). Con la creación y análisis de datos obtenidos de estos estudios, los órganos reguladores en el área de la salud, van a poder establecer políticas para la prevención y control de enfermedades. (Gordis, 2014)

Dentro de esta área se pueden desarrollar estudios que desarrollan técnicas fenotípicas, pero además se realizan técnicas de biología molecular para un estudio completo sobre el genoma de los individuos. (Gordis, 2014)

2.12. Métodos de detección de carbapenemasas tipo KPC

2.12.1. Métodos Fenotípicos

2.12.1.1. Antibiograma

Para determinar la sensibilidad de un microorganismo ante un antibiótico se realiza la técnica de difusión de discos o Kirby Bauer (Murray et al., 2009). Se expone a la bacteria ante varios discos de antibióticos con concentración conocida expresada en microgramos (*ug*), para ello la bacteria es inoculada en un Agar Mueller Hinton, teniendo

en cuenta las recomendaciones de trabajo y normas de control de calidad establecidas por el CLSI. El efecto del antibiótico sobre la bacteria producirá un halo de inhibición, el cual se interpretará bajo las normas del CLSI (Nicola, Nievas, & Smayevsky, 2012).

2.12.1.2. Test de Hodge Modificado (THM)

Esta técnica es utilizada para demostrar la presencia de una carbapenemasa (Nicola et al., 2012; Van Der Zwaluw et al., 2015). El procedimiento describe la inoculación de una cepa de *E. coli ATCC 25922* en una placa de Muller Hinton, donde se coloca un disco de Ertapenem, a continuación se coloca la cepa a estudiar y en el caso de que se evidencie crecimiento de la cepa ATCC entre el halo de inhibición y la cepa estudiada, nos demuestra la capacidad de la carbapenemasa para hidrolizar el antibiótico y permitir el crecimiento bacteriano (Rodríguez et al., 2014).

2.12.1.3. Test de Ácido fenil-Borónico (ABP)

Esta técnica es utilizada para determinar la presencia de serin-carbapenemasa (Martínez Rojas, 2009; Nicola et al., 2012). Se realiza una suspensión bacteriana 0.5 McFarland, del microrganismo a estudiar, y se inocula en una placa de Mueller-Hinton. A continuación se coloca un disco estéril impregnado con 6 ul de ácido 3- Fenil Borónico (200ug/disco) y dos carbapenémicos a 2 cm, todos estos colocados de manera horizontal formando una línea recta. En el caso de que se evidencie un sinergismo entre los carbapenémicos y el Ac. 3-Aminofenil Borónico, se estaría demostrando la presencia de una serin-carbapenemasa (Nicola et al., 2012; Rodríguez et al., 2014).

2.12.1.4. Método de Inactivación del Carbapenémicos (CIM)

Es una técnica desarrollada recientemente, la cual se fundamenta en la inactivación del carbapenémico(Van Der Zwaluw et al., 2015) en una suspensión bacteriana sospechosa de producir carbapenemasas luego de un periodo de incubación, la inactivación del antibiótico se observa cunado éste es puesto a prueba en una placa de Mueller-Hinton inoculada con una cepa de *E. coli* ATCC 25922 sensible, evidenciándose una halo cerrado el cual se interpretaría como un resultado positivo para la producción de carbapenemasas (Van Der Zwaluw et al., 2015).

2.12.2. Métodos Genotípicos

Los métodos moleculares de tipificación microbiológica han tomado protagonismo durante los últimos años en el campo de la bacteriología, debido a sus aportes en tipificación bacteriana o en estudios epidemiológicos (Holt et al., 2015). Estos métodos están conformados por varias técnicas cuyo objetivo es comparar la composición de ácidos nucleicos entre dos o más cepas y establecer relaciones epidemiológicas entre ellas, además de proporcionar información de si provienen o no de un precursor en común (Holt et al., 2015). Al mismo tiempo estas técnicas deben ser capaces de identificar cepas no relacionadas a través de las diferencias moleculares entre ellas (Córdova et al., 2012;Holt et al., 2015).

2.12.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR, es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1985 (Poirel, Walsh, Cuvillier, & Nordmann, 2011). Es una técnica *in vitro* la cual amplifica exponencialmente un gen específico por

acción de una enzima polimerasa, visualizado mediante un sistema de electroforesis en gel (Siripattanapipong, Mungthin, Tan-ariya, & Leelayoova, 2010).

Esta técnica ha tomado mucha importancia en el campo microbiológico, ya que se puede identificar genes específicos para la identificación de una bacteria o ser utilizada para la identificación de genes que proporcionan resistencia a estas bacterias (Siripattanapipong et al., 2010).

2.12.2.2. Pulse Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La técnica de PFGE ha tenido varios tipos y variantes desde que se usó por primera vez en 1984 por Schwartz y Cantor (Cardozo-Bernal, Ramón, Poutou-Piñales, Carrascal-Camacho, & Zambrano, 2013), pero que sigue el mismo fundamento el cual consiste en una macro-restricción utilizando enzimas de restricción que reconocen sitios específicos del ADN bacteriano, formando fragmentos de ADN con alto peso molecular (10Kb) (Cardozo-Bernal et al., 2013; Ashayeri-Panah, Eftekhar, Mobarak Ghamsari, Parvin, & Mehdi Feizabadi, 2013), los cuales van a migrar en un gel de agarosa impulsados por campos eléctricos que pueden o no ser constantes y que pueden cambiar de forma alterna formando pulsos (Cardozo-Bernal et al., 2013).

De esta manera la técnica de PFGE fue adquiriendo modificaciones a través de los años como las modificaciones de las características de los equipos, el orden de los electrodos la reorientación de los campos eléctricos y la intensidad de los mismos, lo que se va a reflejar en los resultados, tanto en la intensidad de patrones de bandas como en la reproducibilidad de los resultados (Cardozo-Bernal et al., 2013).

El paso previo a la PFGE consiste en la restricción del ADN por medio de enzimas, que van reconocer sitios de restricción específicos los cuales se presentan de forma escasa en el genoma bacteriano, produciendo la fragmentación del ADN bacteriano (Ashayeri-Panah et al., 2013). Las enzimas utilizadas para la restricción del ADN, depende del porcentaje de C y G del genoma bacteriano (Cardozo-Bernal et al., 2013), en este caso *Klebsiella pneumoniae* presenta un porcentaje de C+G del 57,5% (Liu et al., 2012), por lo que se plantea el uso de la enzima *Xba*I, la cual cuenta con sitios de reconocimiento ricos en C+G, por lo que producirían un patrón de bandas de entre 15 a 20, lo que facilitaría el análisis de los resultados obtenidos (Ashayeri-Panah et al., 2013; Cardozo-Bernal et al., 2013).

El sistema de Electroforesis de Campo Eléctrico Homogéneo Restringido al Contorno, es la variante de PFGE que se utiliza en la actualidad con el equipo CHEF DRIII, el cual está conformado por varios electrodos localizados en un contorno hexagonal, donde el campo eléctrico es pulsado alternamente dando lugar a un ángulo de reorientación de ADN de 120°. Esta disposición permite una mejor separación y análisis de las bandas, desde 50Kb hasta 2Mb; además de que el patrón de bandas permanece en su carril (10 y 20 bandas) (Cardozo-Bernal et al., 2013).

Los usos de esta técnica en el campo microbiológico han demostrado tener un alto poder discriminatorio, ya que se utiliza en casos de brotes causados por microorganismos de importancia clínica (Ashayeri-Panah et al., 2013; Tijet et al., 2014), como es el caso del presente estudio donde se plantea al análisis de cepas de *Klebsiella pneumoniae* multiresistente. Además esta técnica nos permite identificar las fuentes infección, transmisión cruzada de microorganismos y una interpretación de resultados en base a programas bioinformáticos, los cuales nos ayudan a establecer relaciones clonales entre las

cepas analizadas e inferir si los aislamientos provienen de un precursor en común (Cardozo-Bernal et al., 2013).

2.12.2.3. Multilocus Sequence Typing (MLST)

El conocimiento de la dispersión de líneas clonales asociadas a altos niveles de resistencia a ciertos antimicrobianos, además del fácil intercambio mundial de los resultados obtenidos en los diversos laboratorios de referencia, ha llevado al desarrollo de la técnica molecular conocida como Multilocus Sequence Typing o MLST; convirtiéndose en una herramienta útil dentro del campo de la epidemiología (Siripattanapipong et al., 2010).

La técnica del MLST fue descrita por primera vez en el año de 1998, por Maiden y su grupo de colaboradores, el cual se desarrolló para el estudio de *Nesisseria meningitidis* y en la actualidad cuenta con una base datos de al menos 79 microorganismos, dentro de los cuales figura *Klebsiella pneumoniae*. Una ventaja de esta técnica, es que se puede comparar los resultados obtenidos con una base de datos en internet, lo cual facilita el análisis de resultados, lo que brinda una mejor visión de la distribución mundial de clones de microorganismos de importancia clínica, gracias a la disponibilidad de las secuencias tipo obtenidas en los diversos estudios (Pérez-Losada, Cabezas, Castro-Nallar, & Crandall, 2013).

Esta técnica se basa en la detección de variaciones en los locus de genes "*housekeeping*", estudiando específicamente regiones altamente conservadas de un peso que va de 450-500pb, teniendo en cuenta que la variación de los genes seleccionados

proporciona altos niveles de discriminación (Vázquez & Berrón, 2004). Así podemos determinar grupos de microorganismos idénticos conocidos como clones o altamente relacionados conocidos como líneas clonales (Vázquez & Berrón, 2004).

La detección de las variantes se da mediante secuenciación directa, pues tiene mayor grado de discriminación, ya que detecta mutaciones puntuales en los genes utilizados en MLST (Vázquez & Berrón, 2004).

En el caso de *Klebsiella pneumoniae* se estudian 7 genes housekeeping citados a continuación:

Tabla 1 Genes housekeeping y secuencias de Primers utilizados para MLST de *Klebsiella pneumoniae*

MLST de *Klebsiella pneumoniae*						
Gen	**Primer**	**Secuencia (5´- 3´)[a]**	**Tamaño productos PCR (nt*)**	**Tm (°C)**	**Función[b]**	**Referencia**
rpoB	*rpoB-F* *rpoB-R*	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGCWGAGAACCA TTGTGAGCGGATAACAATTTCGAGTCTTCGAAGTTGTAACC	1119	50	Subunidad beta de la ARN polimerasa, la cual es el centro activo	(Kitchel et al., 2009)
gapA	*gapA-F* *gapA-R*	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACTCCACTCACGG TTGTGAGCGGATAACAATTTCCTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	706	50	Gen codificante para Gliceraldehído 3 –fosfato deshidrogenasa	(Kitchel et al., 2009)
mdh	*mdh-F mdh-R*	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACCCAACTCGCTTCAGGTTCAG TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	800	50	Codifica Malato deshidrogenasa	(Kitchel et al., 2009)
pgi	*pgi-F* *pgi-R*	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	610	50	Codifica Fosfoglucosa isomerasa	(Kitchel et al., 2009)
phoE	*phoE-F* *phoE-R*	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGGTAGGTGAT	646	50	Fosforina E	(Kitchel et al., 2009)
infB	*infB-F infB-R*	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGACTATATTCG TTGTGAGCGGATAACAATTTC CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	506	50	Factor de iniciación de la traducción 2	(Kitchel et al., 2009)
tonB	*tonB-F* *tonB-R*	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCGGTACATCAGGTT TTGTGAGCGGATAACAATTTCATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	583	50	Transductor de energía periplásmico	(Kitchel et al., 2009)

A continuación se describen las secuencias de los 7 genes de secuencia consevada estudiados en *K. pneumoniae*, los cuales fueron publicados en el año 2005 [a]W: A o T; R: A o G; [b] *Nucleótidos Fuente: Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Patrick, a D., Grimont, P. a D., & Brisse, S. (2005). Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. Journal of clinical microbiology, 43(8), 4178–4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178

Si bien esta técnica representa un alto costo y cierta experticia para el análisis de las secuencias tipo obtenidas, se debe reconocer que presenta grandes ventajas como es la alta especificidad y detección de pequeñas variaciones dentro de las secuencias conservadas (Pérez-Losada et al., 2013). Además de su fácil divulgación a nivel mundial por lo que la convierte en útil herramienta dentro de los laboratorios de investigación y referencia para el conocimiento y control de brotes (Vázquez & Berrón, 2004).

2.12.2.4. Secuenciación

Es un procedimiento mediante el cual se va a determinar la estructura de una secuencia específica de ADN, para establecer el orden de sus nucleótidos, mediante la amplificación de una porción específica del genoma (Campion & Canul, 2004). Dentro de MLST, es la principal herramienta para determinar la variación dentro de las secuencias de los genes conservados (Vázquez & Berrón, 2004).

2.12.2.5. Árboles filogenéticos

Esta herramienta es utilizada para establecer relaciones evolutivas entre un grupo de microorganismos de la misma especie, mediante el análisis de secuencias para determinar un ancestro en común. (Holt et al., 2015).

Un árbol filogenético se compone de raíz, la cual representa el ancestro en común del cual proceden cada microrganismo de estudio; los nodos internos van a representar la un evento de especiación, en el cual se representa un ancestro en común inferido y en el caso de las hojas, van a ser las secuencias de estudio conocidas como taxones (Holt et al., 2015).

2.2. MARCO CONCEPTUAL

Aerobio: Organismo capaz de crecer en medios provistos de oxígeno. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Alelo: son secuencias alternativas que puede expresar el mismo gen, las cuales se ubican en el mismo locus o lugar para el cromosoma. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Alineamiento: Es una herramienta utilizada para relacionar 2 o más secuencias para determinar la relación filogenética que comparten entre ellas.

Antibiograma: Técnica fenotípica utilizada para determinar la susceptibilidad de una bacteria a determinado antimicrobiano.(Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Antimicrobiano: Sustancia natural o sintética que tiene como objeto combatir la acción de un organismo patógeno. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Bacteriemia: Infección generalizada en un organismo hospedero, por parte de una bacteria. (Soriano, Salgado, Suárez, & Trigo, 2006)

Beta- lactamasas: Mecanismo de defensa producido por las bacterias que le confiere resistencia a cierto grupo de antimicrobianos. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Carbapenemasas: Mecanismo de defensa producido por la bacterias que le crea resistencia ante los carbapenémicos (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006).

Carbapenémico: Antimicrobiano de amplio espectro que tiene gran resistencia ante los mecanismos enzimáticos de defensa de las bacterias. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Cepas multirresistentes: grupo de bacterias de un género y especie determinado que han adquirido resistencias y van a ser tolerantes a un amplio número de antimicrobianos. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Complejo clonal: Conjunto de secuencias resultado de MLST, que guardan alta relación entre ellas. (Maiden, 2006)

Diversidad clonal: Se define como cepas de microorganismos que comparten un antecesor común pero presentan ciertas modificaciones genotípicas y fenotípicas. (Prats, 2006)

DNA extracromosómico: Se define como el DNA circular que contiene genes de resistencia y se puede trasmitir entre tipos de bacterias. (Baca, Martínez, & Vásquez, 2099)

Fenotipo: Conjunto de características que se pueden observar, las cuales están sujetas a genes. (Universidad Complutense de Madrid, 2009)

Genes codificantes: Cadena antimolde no transcrita complementaria a la cadena molde que va a formar el gen en el proceso de transcripción. (Sabbatino, Lassalle, & Silvia Márquez, 2015)

Genotipo: Conjunto de genes que van a componer a un organismo. (Universidad Complutense de Madrid, 2009)

Infección intrahospitalaria: Infección por un microorganismo que se adquiere en el ambiente hospitalario. (Lebeque Perez & Morris Qquevedo, 2006)

Longitud de la Rama: Es un medida cuantitativa que representa la diversidad entre dos nodos en un árbol filogenético. (Genious 8.1, 2015)

MLST: Técnica de Biología molecular que identifica la secuencia específica de varios locus para la caracterización taxonómica de una bacteria (Siripattanaipipong, Tan-ariya, & Saovanee, 2010).

Nodos externos: Son puntos que representan las secuencias a ser analizadas dentro de un estudio filogenético. (Genious 8.1, 2015)

Nodos internos: Son puntos de convergencia entre un grupo de secuencias (nodos externos), los cuales infieren que proceden de un ancestro en común. (Genious 8.1, 2015)

Patogenia: Reacciones adversas que se dan por la interacción del patógeno en el hospedero. (Soriano, Salgado, Suárez, & Trigo, 2006)

PCR: Técnica molecular que permite amplificar una secuencia específica de ADN(Poggi, García, & Guzman, 2009).

PFGE: Técnica de biología molecular que permite separar moléculas grandes de ADN y definir patrones de bandas para la identificación discriminatoria de microorganismos(Cardozo-Bernal, Ramón, & Poutou Piñales, 2013).

Resistencia microbiana: Se define como la tolerancia a ciertos antimicrobianos gracias a diferentes mecanismos de defensa. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

Secuencia tipo: Combinación única de los números designados para cada alelo correspondiente al esquema de MLST. (Maiden, 2006)

Secuenciación: Es un procedimiento mediante el cual se va a determinar la secuencia específica de ADN. (Trelles, 2009)

Sepsis: Proceso infeccioso generalizado provocado por un microorganismo como bacterias, hongos o virus. (Dougnac, 2008)

Taxonomía: Ciencia encargada del estudio de la clasificación biológica de los seres vivos. (Koneman, 2008)

Transferencia genética: Es el paso de genes, el cual se hace de manera horizontal, se toma del medio o se lo hace a través de fagos. (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2006)

2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variable Dependiente: Diversidad clonal de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC
Variable Independiente: Cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC aisladas de muestras invasivas.

Variable Dependiente	Definición	Dimensiones	Indicadores	Instrumento de Medida
Diversidad clonal de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC	Diversidad clonal se define como cepas de microorganismos que comparten un antecesor común pero presentan ciertas modificaciones genotípicas y fenotípicas. (Prats, 2006)	Cualitativo: Presencia/ Ausencia de diversidad clonal.	Frecuencia relativa (%)	PFGE y MLST
Variable Independiente	**Definición**	**Dimensiones**	**Indicadores**	**Instrumento de Medida**
Sexo	Características sexuales que se atribuye a los seres humanos que distinguen entre hombre y mujer. (Academia Española, R, 2014)	Cualitativo: Femenino / Masculino	Frecuencia relativa (%)	Revisión de base de datos WHONET-Inspi-Q.
Edad	Periodo de tiempo en el que un ser humano ha vivido. (Academia Española, R, 2014)	Cualitativo: Pediátrico: ≤15 años Adultos jóvenes: 18-39 años. Adultos mayores: ≥40 años.	Frecuencia relativa (%)	Revisión de base de datos WHONET-Inspi-Q.
Servicio hospitalaria	Zona de un hospital en donde se atienden casos específicos y deben cumplir normas de calidad. (McGraw-Hill, 2004)	Cualitativo: UCI, Cardiología, Neumología, Unidad de quemados, Cirugía general, Nefrología, Urgencias, Hematología, Medicina Interna	Frecuencia relativa (%)	Revisión de base de datos WHONET-Inspi-Q.
Tipo de muestra	Fluido corporal obtenido de diversos sitios con el fin de ser estudiado. (Siliezar Pineda, 2003)	Cualitativo MUESTRAS INVASIVAS: Hemocultivo, Líquidos serosos, Aspirados	Frecuencia relativa (%)	Revisión de base de datos WHONET-Inspi-Q.

Sensibilidad de *Klebsiella pneumoniae* ante los antibióticos.	Capacidad del microorganismo para hidrolizar los antibióticos generando halos de sensibilidad o resistencia a los mismos, interpretados bajo criterios internacionales establecidos. (CLSI). (Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - ANLIS "DR. CARLOS G. MALBRAN", 2014)	Cualitativo: Amoxicilina/ ac. Clavulánico, Ceftazidima, Cefotaxima, Imipenem, Meropenem, Cefoxitin, Aztreonam, Pipericilina/ Tazobactam, Cefepime, Ertapenem, Trimetoprim/ sulfametoxazol, Tetraciclina, Gentamicina, Amikacina, Ac. Nalidíxico, Ciprofloxacina, Tigeciclina Polimixina B	Frecuencia relativa (%)	Antibiograma Método de Kirby Bauer
Pruebas fenotípicas para la identificación de KPC	Test de Hodge modificado: prueba fenotípica específica para determinar la presencia de la producción de una carbapenemasa, mediante la inhibición del efecto del carbapenémico sobre la cepa ATCC usada en el método. Test de ácido Borónico: Prueba fenotípica para determinar la presencia de una KPC, mediante la sinergia entre el carbapenémico y el Ac. Borónico	Cualitativo POSITIVO/ NEGATIVO	Frecuencia relativa (%)	Interpretación del Test de Hodge modificado / Prueba ácido Borónico.

CAPÍTULO III

3.1. MARCO METODOLÓGICO

3.1.1. Tipo de Estudio

El presente estudio es de tipo observacional descriptivo, ya que se pretende conocer la diversidad clonal presente en cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas, mediante el uso de técnicas fenotípicas y el uso de PFGE y MLST como herramientas para establecer relaciones clonales y la secuencia tipo de *Kpn*-KPC más frecuente en nuestro medio.

3.1.2. Muestra y muestreo

El tipo de muestra que se va a utilizar en el presente estudio, corresponden a cepas de *Klebsiella pneumoniae* KPC positivas obtenidas de muestras invasivas, que fueron analizadas en Laboratorio del Centro Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Inspi-Q durante el periodo 2013-2014. Para lo cual se utilizará un muestreo estratificado teniendo en cuenta lo descrito anteriormente

3.1.3. Tamaño de la Muestra

Para el cálculo del tamaño muestral se utilizará la siguiente fórmula con un nivel de confianza del 95% y un error alfa del 5%:

$$n = \frac{N[Z_{(1-\propto)}]^2 * p * q}{d^2 * (N-1) + \left[Z_{(1-\alpha)}\right] * p * q}$$

Dónde:

n: Tamaño de la muestra

N: Universo poblacional (86)

Error alfa (α): 0.05

Nivel de confianza (1- α): 0.95

$Z_{(\alpha-1)}$: 1.96

p: La prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* KPC en un estudio realizado en Colombia en el año 2014, que corresponde al 31.1% (0.311) (Pacheco, Osorio, Correa, & Villegas, 2014).

q: 1-p (0.689)

d: la precisión del estudio correspondiente al 5% (0,05)

$$n = \frac{86[1.96]^2 * 0.311 * 0.689}{0.05^2 * (86-1) + [1{,}96]^2 * 0.311 * 0.689}$$

$$n = \frac{86\ (3.8416) * 0.21428}{0.0025 * (85) + (3.8416) * 0.21428}$$

$$n = \frac{330.3776 * 0.21428}{0.2125 + 0.82318}$$

$$n = \frac{70.79}{1.03568}$$

$$n = 68.35$$

Decisión: Para el estudio de clonalidad de *Klebsiella pneumoniae* productora del gen bla_{KPC} en muestras invasivas, es necesaria una muestra de 68 cepas con los criterios de

inclusión planteados en este estudio; pero por motivos de obtener datos más relevantes se ampliará el tamaño muestral a 80 cepas.

3.1.4. Criterios de Inclusión

- Aislamientos confirmados como *Klebsiella pneumoniae*, procedentes de muestras invasivas, receptadas en laboratorio de RAM del INSPI-Q durante el periodo 2013-2014.
- Cepas de *Klebsiella pneumoniae* con variables epidemiológicas completas o con al menos un dato faltante.
- Cepas de *Klebsiella pneumoniae* con resistencia a carbapenémicos y confirmadas por PCR convencional como productoras del gen bla_{KPC}.
- Cepas de *Klebsiella pneumoniae* positivas en el Test de Hodge Modificado para la detección de carbapenemasas.

3.1.5. Criterios de Exclusión

- Cepas que no correspondan al género y especie de *Klebsiella pneumoniae*.
- Aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* que no procedan de muestras invasivas y con dos o más datos epidemiológicos faltantes.

3.2. Procedimientos de laboratorio

3.2.1. Materiales y reactivos

3.2.1.1. Materiales

3.2.1.1.1. Cultivo, aislamiento e identificación de *Klebsiella pneumoniae*

- MacConkey Agar BD lot:5006701
- Base Sangre Agar BD lot:4286770
- Batería bioquímica completa

3.2.1.1.2. Antibiograma y pruebas fenotípicas

- Mueller Hinton Agar BD lot:4350581
- Amoxicilina/ ac. Clavulánico (AMC)
- Ceftazidima (CAZ)
- Cefotaxima (CTX)
- Imipenem (IMP)
- Meropenem (MEM)
- Cefoxitin (FOX)
- Aztreonam (ATM)
- Pipericilina / Tazobactam (TPZ)
- Cefepime (FEP)
- Ertapenem (ETP)
- Trimetoprim / sulfametoxazol (SXT)
- Tetraciclina (TE)
- Gentamicina (CN)
- Amikacina (AK)

- Ac. Nalidíxico (NA)
- Ciprofloxacina (CIP)
- Tigeciclina (TIG)
- Polimixina B (PB)

3.2.1.1.3. Insumos del laboratorio de microbiología

- Cajas petri pequeñas / grandes
- Asas
- Hisopos estériles
- Pinzas
- Discos estériles

3.2.1.2. Reactivos

3.2.1.2.1. Reactivos del laboratorio de microbiología

- Solución de ácido 3-aminofenil borónico monohidratado 30mg/mL (APB)
- EDTA
- KOH
- α-Naftol
- Rojo de Metilo
- Reactivo de Kovacs

3.2.1.2.2. Reactivos del laboratorio de biología molecular

- Agarosa *SeaKem Gold*
- Agarosa grado analítico lot: 0000123312
- Ladder 100 pb
- Syber gel stain

- GoTaq Master Mix
- TAE 40X
- TBE 10X
- Kit extracción Ac. nuclélicos
- Primers MLST
- Enzima de restricciòn *Xba*1 HC
- Proteinasa K (20 mg/mL)
- Agua tipo 2

3.3. MÉTODOS

3.3.1. Fase I

3.3.1.1. Cepas bacterianas

Para el presente estudio se seleccionaron 80 cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de muestras invasivas, de acuerdo a los criterios de inclusión establecidos; las cuales fueron receptadas en el Laboratorio del Centro Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Inspi-Q, procedentes de diversas casas de salud del país del periodo 2013- 2014.

Para los análisis estadísticos fueron incluidas todas las variables epidemiológicas, las cuales constan de: edad, sexo, fecha de aislamiento, la casas de salud de las cuales fueron derivadas al INSPI-Q, los servicios hospitalarios y el tipo de muestra en donde fueron aisladas las cepas, además de su localización geográfica en el Ecuador.

3.3.1.2. Identificación bioquímica de Klebsiella pneumoniae

La identificación bacteriana de las 80 cepas se realizó mediante la visualización de características químicas, usando una batería bioquímica completa, como se observa en el **ANEXO I**.

3.3.2. Fase II

3.3.2.1. Determinación de susceptibilidad antimicrobiana

3.3.2.1.1. Antibiograma

Para determinar los perfiles de susceptibilidad se realizaron ensayos a las 80 cepas propuestas en el estudio como se observa en el **ANEXO II**, mediante la técnica de difusión de disco Kirby Bauer, estableciéndose un esquema de antimicrobianos clínicamente útiles

y otros que sirvieron de control para la detección de diversos mecanismos de resistencia. Para cumplir con ello se incluyeron antimicrobianos de diversas familias como: Cefalosporinas de 3º y 4º generación (CAZ, CTX, FEP), Cefamicinas (FOX), Monobactámicos (ATM), Carbapenémicos (ETP, IMP, MEM), asociaciones de B-lactámicos/Inhibidores (AMC, TPZ), Tetracilinas (TE), Aminoglucósidos (AK, CN), Quinolonas (NA, CIP) y además de SXT, TIG y PB.

3.3.2.2. Pruebas fenotípicas

3.3.2.2.1. Detección de BLEE

Para la detección de BLEE en las 80 cepas se realizó el método de doble de disco, evidenciándose la sinergia entre las cefalosporinas de tercera y cuarta generación (CAZ CTX, FEP), Monobactámicos (ATM), con los inhibidores de B-lactamasas asociados a un B- lactámico (AMC y TPZ) respectivamente. Ver **ANEXO III.**

3.3.2.2.2. Detección de Carbapenemasas

Se realizaron simultáneamente 3 técnicas fenotípicas para la detección de carbapenemasas en las 80 cepas de *K. pneumoniae*, mediante Test de Hodge modificado **(ANEXO IV),** Sinergia con ác.3- Fenil Borónico (50mg/ml) **(ANEXO V),** Método de Inactivación del Carbapenémico (CIM) **(ANEXO VI)** y Sinergia con EDTA 5M pH8.0 **(ANEXO VII),** evidenciándose la interacción del microorganismo con los carbapenémicos usados en cada técnica.

3.3.2.2.3. Preservación de muestras

Los 80 aislados de K. *pneumoniae* fueron conservados en criotubos que contenían BHI+ Glicerol al 20% y almacenados a -80ºC, como se describe en el **ANEXO VIII.**

3.3.3. Fase III

3.3.3.1. Detección de carbapenemasas mediante PCR-Multiplex

La confirmación genotípica de la presencia de una carbapenemasa se realizó mediante un ensayo de PCR-Multiplex con el objeto de detectar los siguientes genes: *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM,}$ *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{OXA-48}$ en las 80 cepas, como se muestra en el **ANEXO IX**. Se usó como control positivo, DNA bacteriano que amplificaba para los diferentes genes de este estudio, los cuales fueron proporcionados por el laboratorio de biología molecular del Centro Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Inspi-Q. Se determinó el peso molecular de cada gen comparándolo con un marcador de peso molecular

3.3.3.2. PFGE

Para el estudio de la diversidad clonal se realizó la técnica de PFGE, para la cual se escogieron 42 cepas representativas del universo estudiado. Se estandarizó la técnica en base al protocolo de trabajo establecido por la PulseNet Latin America & Carribean para *E. coli*, el cual se detalla en el **ANEXO X** Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el programa *BIONUMERICS 7.0.*

3.3.3.3. MLST

Una vez realizados los análisis de susceptibilidad y PFGE se escogieron 14 cepas para la realizar los ensayos de MLST. Se les realizó extracción de DNA mediante las especificaciones del Kit de Extracción por columnas de INVITROGEN **(ANEXO XII)** y en los cuales se investigaron 7 genes housekeeping para *K. pneumoniae*, dentro de los cuales incluyen *rpoB, gapA, mdh, pgi, phoE, infB* y *tonB.* Para realizar el ensayo se siguió el protocolo sugerido por el Instituto Pasteur para *K. pneumoniae* **(ANEXO XI).**

3.3.3.4. Purificación y Secuenciación

La purificación de los productos de amplificación del MLST se realizó mediante el Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification de Promega, siguiendo el protocolo sugerido. **(ANEXO XIII)** Para el procedimiento de la secuenciación se enviaron los productos de PCR ya purificados para ser secuenciados por la empresa MACROGEN **(ANEXO XIV).**

Una vez obtenidos los resultados se procede al análisis de los mismos mediante programas bioinformáticos, *Genious 9.1.8,* se ingresan las secuencias tipo obtenidas, las cuales se comparan con secuencias ya existentes.

3.3.4. Fase IV

Para el análisis de los resultados fenotípicos obtenidos se lo realizó mediante en el programa bioinformático WHONET 5.6. Los pulsotipos obtenidos por PFGE se analizaron mediante el programa bioinformático Bionumerics 7.0; mientras que para determinar las variaciones alélicas y las secuencias tipo, se utilizó la base de datos de MLST para *K. pneumoniae* del Instituto Pasteur. Las relaciones filogenéticas se establecieron con el uso del programa *Geneious 9.1.8*.

3.4. Control de Calidad

3.4.1. Mueller-Hinton Agar

El control de calidad de las placas de MHA se realizó siguiendo los lineamientos establecidos en el instructivo M-100 de CLSI.

3.4.2. Pruebas fenotípicas para la detección de carbapenemasas

Como control positivo para las pruebas fenotípicas se utilizó una cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1705 productora de KPC y como control negativo una cepa de *Klebsiella pneumoniae ATCC1706*, proporcionadas por el Laboratorio del Centro Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Inspi-Q.

Para la identificación de metaloenzimas se corroboró el correcto funcionamiento de EDTA 5M pH 8.0, con cepas productoras de metaloenzimas como: *P. aeruginosa-IMP, P. aeruginosa-VIM y P. mirabilis-NDM.*

3.4.3. Pruebas genotípicas para la detección de carbapenemasas

Para la identificación de los diversos genes mediante PCR-Multiplex, se utilizó DNA bacteriano que contenía los genes: bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP} y bla_{OXA48} proporcionados por el Laboratorio de biología molecular del Centro Referencia Nacional de Resistencia a los Antimicrobianos del Inspi-Q.

CAPÍTULO IV

4.1. RESULTADOS

4.1.1. Variables clínicas y epidemiológicas

Durante el periodo de estudio (2013-2014), se analizaron 80 cepas de *Klebsiella pneumoniae* las cuales fueron preservadas en BHI + Glicerol 20% pertenecientes al cepario del área de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos (RAM) del INSPI-Q. Todas las cepas fueron identificadas como productoras del gen *bla*-$_{KPC}$ mediante biología molecular (PCR) y que fueron aisladas de muestras invasivas, procedentes de varias casas de salud del país.

En la **Tabla 2** podemos observar las variables clínico-epidemiológicas de cada cepa, donde encontramos que la mayoría de aislamientos proceden del sexo masculino (57,5%); por otra parte la población adulta es la categoría de edad en la cual se observa un mayor número de casos que presentan algún tipo de infección con *Kpn-KPC* (77,5%), las cepas procedieron principalmete de 4 servicios hospitalarios: UCI 36,25%, Pediatría 15%, Cirugía General 8,75% y Unidad de Quemados 5%. En cuanto a los sitios de infección se destaca una mayor presencia en muestras procedentes de sangre y líquidos estériles principalmente. Es importante mencionar que la población pediátrica también presenta un elevado número de casos, de los cuales el 2,5% de infecciones pertenecen a neonatos.

Para la primera fase del estudio en cuanto a la identificación bacteriana, todas las cepas fueron confirmadas como *Klebsiella pneumoniae* en base a una bioquímica completa. No se registraron casos de cepas guardadas incorrectamente o discrepancias en los resultados obtenidos.

Tabla 2 Características epidemiológicas de las 80 cepas de *Kpn*-KPC obtenidas de casas de salud del país en el periodo 2013-2014.

Sexo (n°/%)	Categorías de Edad* (n°/%)	Hospital (n°/%/Ciudad)	Servicio hospitalario[a] (n°/%)	Sitio de infección[b] (n°/%)
F (34/42)	ADL (62/77,5)	HOSP 1(1/1,25/Guayaquil)	CAR (5/6,2)	LAB (7/8,75)
M (46/58)	PED (16/20)	HOSP 2 (15/18,75/Quito)	CGE (7/8,7)	LCR (3/3,75)
	NEO (2/2,5)	HOSP 3 (53/66,25/Quito)	EME (5/6,2)	LDR (1/1,25)
		HOSP 4 (3/3,75/Cuenca)	HEM (2/2,5)	LBA (9/11,25)
		HOSP 5 (3/3,75/Quito)	MED (3/3,7)	LPL (6/7,5)
			NEU (5/6,2)	SAN (53/66,25)
		HOSP 6 (1/1,25/Quito)	NEF (2/2,5)	ATR (1/1,25)
		HOSP 7 (2/2,5/Quito)	NEO (2/2,5)	
		HOSP 8 (2/2,5/Quito)	ONC (2/2,5)	
			NMO (2/2,5)	
			PED (12/15)	
			UCI (29/36,2)	
			UQUE (4/5)	

***ADL (Adultos: ≥ 16años); PED (Pediátricos: ≤ 15 años); NEO (Neonatos: hasta 10 días de nacido).[a]CAR: Cardiología; CGE: Cirugía general; EME: Emergencia; HEM: Hematología; MED: Medicina Interna; NEU: Neurología; NEF: Nefrología; NEO: Neonatología; ONC: Oncología; NMO: Neumología; PED: Pediatría; UCI: Unidad de cuidados intensivos; UQUE: Unidad de quemados.[b]LAB: Líquido Abdominal; LCR: Líquido Cefalorraquídeo; LD: Líquido de dren; LBA: Lavado Bronco-Alveolar; LPL: Líquido Pleural; SA: Sangre; ATR: Aspirado traqueal.**

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

4.1.2. Perfiles de susceptibilidad de los 80 aislamientos de *Klebsiella pneumoniae*

Los perfiles de susceptibilidad en las 80 cepas analizadas, presentaron un patrón fenotípico propio de microorganismos multiresistentes. Se observó resistencia a las cefalosporinas de 3ra y 4ta generación (100%). La presencia de resistencia a carbapenémicos se observa en un 100% para meropenem e imipenem y un 98.8% para ertapenem. Ver **Tabla 3**

En cuanto a otras familias de antibióticos se destaca un perfil inusual en aminoglucósidos, con un 91% de resistencia para gentamicina y al mismo tiempo un 51% de resistencia a Amikacina, para quinolonas y fluoroquinolonas hubo un 60% de resistencia.

El uso de ciertos antimicrobianos nos sirve como indicadores de la presencia de mecanismos de resistencia, como resistencia del Aztreonam (100%) en cepas con carbapenemasas tipo KPC o el caso del Cefoxitín que de acuerdo a su susceptibilidad nos indica la presencia o ausencia de BLEE o AmpC.

Tabla 3 Perfiles de susceptibilidad de las 80 cepas de *Kpn*-KPC obtenidas de casas de salud del país en el periodo 2013-2014.

Antibióticos*	Puntos de Corte (mm) CLSI 2015	R (%)	I (%)	S (%)	V. Mín	V. Máx
AMC	14 - 17	100	0	0	6	8
AK	15 - 16	51,2	7,5	41,2	6	25
ATM	18 - 20	100	0	0	6	11
CAZ	18 - 20	100	0	0	6	17
CIP	16 - 20	58,8	28,8	12,5	6	30
CTX	23 - 25	100	0	0	6	16
ETP	19 - 21	98,8	1,2	0	6	19
FEP	15 - 17	100	0	0	6	20
FOX	15 - 17	100	0	0	6	21
GN	13 - 14	91,2	0	8,8	6	21
IMP	20 - 22	100	0	0	6	19
MER	20 - 22	100	0	0	6	19
NA	14 - 18	61,2	27,5	11,2	6	24
PB[a]	11 - 12	6,2	0	93,8	8	21
SXT	11 – 15	93,8	1,2	5	6	25
TE	12 - 14	61,2	2,5	36,2	6	15
TIG[a]	15 - 18	3,8	22,5	73,8	14	23
TPZ	18 - 20	98,8	1,2	0	6	18

***Amoxicilina/ Ác. Clavulánico (AMC), Amikacina (AK) Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Imipenem (IMP), Meropenem (MEM), Cefoxitín (FOX), Aztreonam (ATM), Pipericilina/ Tazobactam (TPZ), Cefepime (FEP), Ertapenem (ETP), Trimetoprim/ sulfametoxazol (SXT), Tetraciclina (TE), Gentamicina (CN), Ac. Nalidíxico (NA), Ciprofloxacina (CIP), Tigeciclina (TIG), Polimixina B (PB); [a] Puntos corte correspondientes a *P. aeruginosa* tomados de CLSI 2015; [b] Puntos de corte correspondientes a *E. coli* tomados del EUCAST 2016.**

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

Debido la alta resistencia a los carbapenémicos, es necesaria la implementación de terapias alternativas para combatir este tipo de infecciones, uno de los cuales consiste en tratamientos combinados con tigeciclina y colistín donde los resultados arrojados, nos indican un alto porcentaje de sensibilidad a estos antibióticos con el 73,8% y 93,8 respectivamente. Para la interpretación de los halos de inhibición se tomaron los puntos de corte propuestos por el CLSI 2015.

4.1.3. Identificación de corresistencias en *Klebsiella pneumoniae* KPC

Los resultados de las pruebas fenotípicas se analizaron bajo los criterios del CLSI 2015. El método de doble disco se usó para identificación de BLEE. El test de HODGE (**Gráfico 11**) y la sinergia con el ácido 3- Fenil Borónico (APB 50mg/mL) se usó para la identificación de serin- carbapenemasas (**Gráfico 12**); además se tomó como indicador la resistencia al Aztreonam.

Para la identificación de BLEE se observó sinergia entre las cefalosporinas de 3ra generación (CAZ, CTX) y AMC, ubicados a 1,5cm de centro a centro, como se observa en el **Gráfico 14,** también se observó sinergia entre el FEP y el TPZ. En este contexto siempre que se observaba sinergia entre las cefalosporinas de 3ra G. y el AMC, también se observaba sinergia entre el FEP y el TPZ en el 100% de los casos.

La detección fenotípica de AmpC se realizó mediante la identificación de sinergia entre las cefalosporinas de 3ra G. y un disco estéril impregnado con 6uL de APB 50mg/mL **Gráfico 14.** De las 80 cepas analizadas, 50 (63%) mostraron un resultado positivo mediante este método. En cuanto a la correlación de la sensibilidad al FOX y la sinergia entre las cefalosporinas de 3ra G. y el APB para la detección de AmpC, nos indica que el

FOX no es un buen indicador de AmpC en microorganismos multiresistentes, ya que se presenta con un 100% de resistencia en todas las cepas.

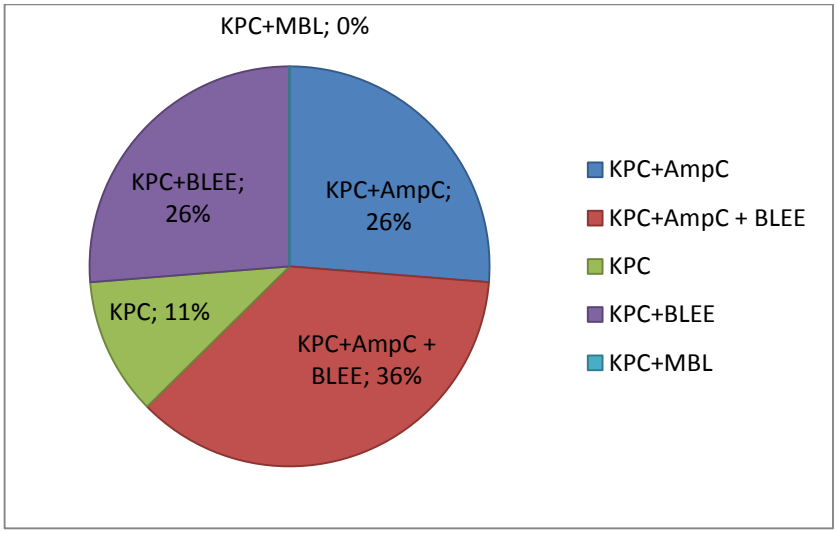
En el **Gráfico 13** se observa los resultados obtenidos mediante el método de Inactivación del carbapenémico (CIM) presentó un 100% de detección de carbapenemasas en las 80 cepas analizadas en este estudio.

Como se muestra en el **Gráfico 14**, para la detección fenotípica de metaloenzimas se utilizó la sinergia con EDTA 5M pH 8.0, ubicado a 1,5cm de centro a centro con imipenem y meropenem, donde los resultados revelan que no hubo presencia de metaloenzimas en ninguna de las 80 cepas analizadas.

En la detección de carbapenemasas tipo KPC, el test de Hodge modificado y el test del ABP se mostraron como buenos indicadores para este tipo de resistencia, ya que presentan un alto nivel de detección al ser correlacionados con el Gold Estándar, PCR.

Los resultados arrojados por estos métodos fenotípicos, nos indican la presencia varios mecanismos de resistencia coexistiendo al mismo tiempo en las cepas analizadas. Dentro de los cuales podemos mencionar la corresistencia entre KPC+BLEE (26%), KPC+AmpC (26%), KPC+BLEE+AmpC (36%) y ciertos casos en los que solo se evidenció la presencia de la carbapenemasa tipo KPC (11%). Ver **Gráfico 3**

Gráfico 3 Corresistencia presente en los 80 aislados de *K. pneumoniae* KPC obtenidas de casas de salud del país en el periodo 2013-2014.



ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

4.1.4. Correlación de métodos fenotípicos y genotípicos

Para este estudio las 80 cepas fueron puestas a prueba a varios métodos fenotípicos como el test de Hodge modificado, el test de APB, EDTA y el Método de Inactivación del Carbapenémico (CIM), en comparación con el estándar de oro PCR para la detección de carbapenemasas tipo KPC. Se utilizaron como control negativo 10 cepas de *Klebsiella pneumoniae* sensibles a carbapenémicos y confirmadas por PCR como no productoras del gen bla_{KPC}, entre las cuales se encontraba una cepa ATCC 1706 de *Klebsiella pneumoniae* con fenotipo sensible.

El test de APB (50mg/mL) fue evaluado en cada una de las cepas estudiadas, el cual mostró ser un método fácil de realizar, reproducible con un buena relación costo beneficio y que presenta una alta sensibilidad y especificidad en relación con PCR. Todos

los aislamientos del estudio presentaron sinergia entre los carbapenémicos y el APB, cuando estos eran ubicados a 1,5cm de centro a centro.

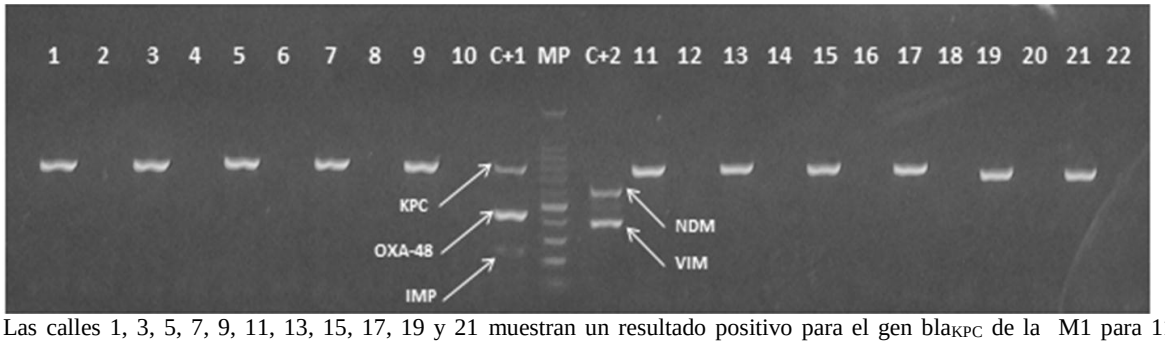
En las 80 cepas analizadas no se identificó sinergia entre los carbapenémicos (MER, IMP) con EDTA; de igual manera las 80 cepas fueron negativas para la amplificación por PCR para los genes *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{NDM}$ y *bla*$_{OXA-48}$ por lo que no se identificó en ninguno de los casos una corresistencia entre KPC y metaloenzimas.

4.1.5. PRUEBAS GENOTIPICAS

4.1.5.1. PCR Múltiplex

Las 80 cepas analizadas en el estudio amplificaron únicamente para el *bla*$_{KPC\ lo}$ cual se correlaciona con los resultados fenotípicos obtenidos, ya que no hubo corresistencia con otro tipo de carbapenemasas. El **Gráfico 4** representa los resultados obtenidos en las 80 cepas analizadas por PCR múltiplex.

Gráfico 4 Corrida electroforética de PCR múltiplex para la detección de los genes bla$_{KPC}$, bla$_{Oxa-48}$, bla$_{IMP}$ (M1) y bla$_{NDM}$, bla$_{VIM}$ (M2).



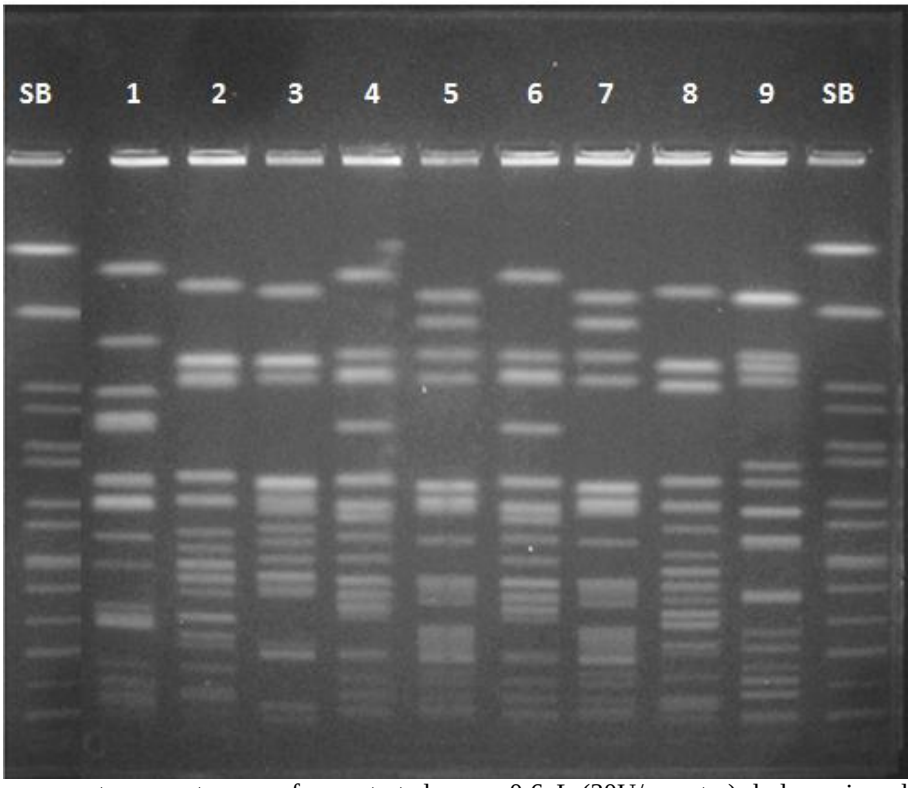
Las calles 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 y 21 muestran un resultado positivo para el gen bla$_{KPC}$ de la M1 para 11 muestras analizadas; las calles 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20 y 22 muestran un resultado negativo a la investigación de los gens bla$_{NDM}$ y bla$_{VIM}$ (M2) de las mismas 11 muestras anteriores. Este corrida electroforética representa los resultados obtenidos de las 80 cepas analizas en este estudio. Gel de Agarosa al 2%, 70V, tiempo de corrida: 2 horas, tinción: 1uL SYBR® Safe - DNA Gel Stain (10.000X). C+1 = Control positivo Múltiplex 1: KPC (798pb); OXA-48: (438pb); IMP (232pb). C+2= Control positivo Múltiplex 2: NDM (621pb); VIM (390pb).

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

4.1.5.2. Electroforesis en Gel de Campo Pulsados PFGE

Para el ensayo de subtipificación por PFGE se seleccionaron 42 cepas (52,5%) de las 80 cepas analizadas. Se tomó en cuenta todas las cepas pertenecientes al 2013 y cepas representativas que cada casa de salud del 2014, las cuales presentaban perfiles de resistencia compatibles con posibles PDR. En el **Gráfico 5** se observa un gel de PFGE de 9 muestras, donde se evidencian los pulsotipos obtenidos por macro-restricción con la enzima *Xba*I HC (50 U/uL).

Gráfico 5 Perfil de macro-restricción de DNA genómico por PFGE de 9 cepas de *Kpn*-KPC.



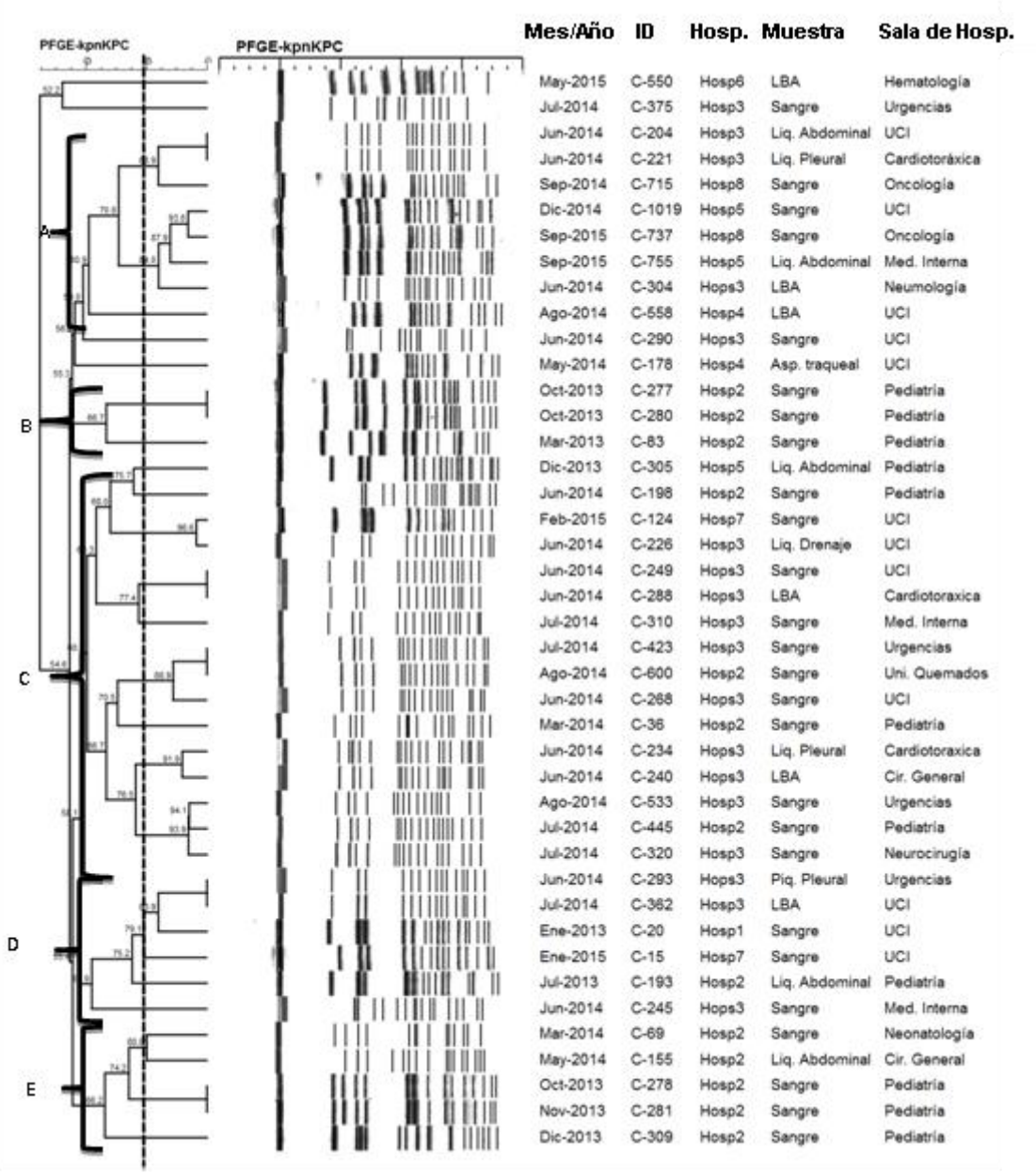
Carriles 1-9 representan muestras que fueron tratadas con 0,6uL (30U/muestra) de la enzima de restricción XbaI HC (50 U/uL). SB: Cepa control Salmonella serovar Braenderup H9812 utilizada como marcado de peso. Gel de Agarosa Seakem Gold 1%, tiempo de pulso inicial 2.2 seg, tiempo de pulso final 63.8 seg, Voltaje: 6V, Ángulo de reorientación: 120°, tiempo de corrida: 15.4 horas y Temperatura constante a 14°C.

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

En base al dendrograma obtenido, se observaron varios grupos clonales y al mismo tiempo se identificó un clon predominante en cada casa de salud, además se observó una estrecha relación entre cepas provenientes de diferentes casas de salud, especialmente las cepas procedentes de la misma localización geográfica.

Estos resultados revelan la presencia de brotes de este microorganismo en varias casas de salud de nuestro país y mediante un análisis con el Coeficiente de Sorensen-Dice como indicador de similitud de los patrones de bandas, se encontró que cada grupo clonal presenta una relación de ≥ al 60%, obteniendo en este caso 5 grupos clonales nombrados como A, B, C, D y E, además de 4 cepas que no entraban en ningún grupo clonal, observar el **Gráfico 6.**

Gráfico 6 Dendrograma de 42 cepas de *Kpn*-KPC tratadas con 30U/muestra de la enzima XbaI (50U/uL



Mes/Año	ID	Hosp.	Muestra	Sala de Hosp.
May-2015	C-550	Hosp6	LBA	Hematología
Jul-2014	C-375	Hosp3	Sangre	Urgencias
Jun-2014	C-204	Hosp3	Liq. Abdominal	UCI
Jun-2014	C-221	Hosp3	Liq. Pleural	Cardiotoráxica
Sep-2014	C-715	Hosp8	Sangre	Oncología
Dic-2014	C-1019	Hosp5	Sangre	UCI
Sep-2015	C-737	Hosp8	Sangre	Oncología
Sep-2015	C-755	Hosp5	Liq. Abdominal	Med. Interna
Jun-2014	C-304	Hops3	LBA	Neumología
Ago-2014	C-558	Hosp4	LBA	UCI
Jun-2014	C-290	Hops3	Sangre	UCI
May-2014	C-178	Hosp4	Asp. traqueal	UCI
Oct-2013	C-277	Hosp2	Sangre	Pediatría
Oct-2013	C-280	Hosp2	Sangre	Pediatría
Mar-2013	C-83	Hosp2	Sangre	Pediatría
Dic-2013	C-305	Hosp5	Liq. Abdominal	Pediatría
Jun-2014	C-198	Hosp2	Sangre	Pediatría
Feb-2015	C-124	Hosp7	Sangre	UCI
Jun-2014	C-226	Hosp3	Liq. Drenaje	UCI
Jun-2014	C-249	Hops3	Sangre	UCI
Jun-2014	C-288	Hops3	LBA	Cardiotoraxica
Jul-2014	C-310	Hosp3	Sangre	Med. Interna
Jul-2014	C-423	Hosp3	Sangre	Urgencias
Ago-2014	C-600	Hosp2	Sangre	Uni. Quemados
Jun-2014	C-268	Hops3	Sangre	UCI
Mar-2014	C-36	Hosp2	Sangre	Pediatría
Jun-2014	C-234	Hops3	Liq. Pleural	Cardiotoraxica
Jun-2014	C-240	Hops3	LBA	Cir. General
Ago-2014	C-533	Hosp3	Sangre	Urgencias
Jul-2014	C-445	Hosp2	Sangre	Pediatría
Jul-2014	C-320	Hosp3	Sangre	Neurocirugía
Jun-2014	C-293	Hops3	Piq. Pleural	Urgencias
Jul-2014	C-362	Hosp3	LBA	UCI
Ene-2013	C-20	Hosp1	Sangre	UCI
Ene-2015	C-15	Hosp7	Sangre	UCI
Jul-2013	C-193	Hosp2	Liq. Abdominal	Pediatría
Jun-2014	C-245	Hops3	Sangre	Med. Interna
Mar-2014	C-69	Hosp2	Sangre	Neonatología
May-2014	C-155	Hosp2	Liq. Abdominal	Cir. General
Oct-2013	C-278	Hosp2	Sangre	Pediatría
Nov-2013	C-281	Hosp2	Sangre	Pediatría
Dic-2013	C-309	Hosp2	Sangre	Pediatría

El dendrograma se construyó usando el índice de Dice como indicador de similitud mediante el método de Pares no Ponderados Utilizando Media Aritmética (UPGMA) en el programa bioinformático Bionumerics7.0; Se consideró como cepas pertenecientes a un mismo clon a las cepas con % de similitud ≥ al 80%; este árbol demuestra diversidad clonal entre las cepas analizadas. LBA (Lavado Bronco Alveolar); UCI (Unidad de Cuidados Intensivos).

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

El grupo clonal A presenta 7 subtipos con 8 aislamientos de los cuales 7 pertenecen a una misma región (Quito), mientras que una cepa (C-558) pertenece a Cuenca pero con un porcentaje de similitud muy bajo (60%), por lo tanto se le considera a esta cepa como

posiblemente relacionada con el resto del grupo clonal. El grupo clonal B presenta 3 aislamientos con 2 subtipos, de los cuales todos pertenecen a la misma casa de salud donde se observa dos cepas las cuales presentan el mismo patrón clonal, por lo que se les considera como cepas indistinguibles entre sí.

El grupo clonal C presenta 16 aislamientos distribuidos entre varias casas de salud de la capital, donde la mayoría de los aislamientos, en base al porcentaje de similitud se encuentran en la categoría de genéticamente relacionados, además se observa que todos los aislamientos proceden de diferentes salas de hospitalización, diferentes hospitales y diferentes tipos de muestra de las que fueron aislados. Estos resultados nos indican como cada uno de los aislamientos proceden de un ancestro en común, el cual se encuentra circulante en la zona.

El grupo D y E presentan 6 y 5 aislamientos respectivamente, donde los aislamientos del grupo E pertenecen a una misma casa de salud mientras que en el grupo D, los aislamientos se distribuyen entre varias casa de salud de Quito. En este caso los porcentajes de similitud no son muy altos aunque se observan aislamientos indistinguibles entre sí (>98%) y aislamientos con en la categoría de posiblemente relacionados (60-70%).

4.1.5.3. Multilocus Sequence Typing

De los 80 aislados iniciales, a 42 se les realizó PFGE, de estos se escogieron 14 cepas representativas en base al lugar donde fueron aisladas, es decir se escogieron cepas de varias regiones del país para determinar la Secuencia Tipo circulante en nuestro medio. Además del lugar de aislamiento, se tomaron en cuenta cepas que presentaban perfiles de resistencia compatibles con posibles PDR, las cuales se ubicaban principalmente en la ciudad de Quito.

El estudio de MLST se desarrolló a partir de la amplificación de 7 genes housekeeping para *K. pneumoniae (rpoB, gapA, mdh, pgi, phoE, infB, tonB)* (**Gráfico 7**). Se amplificó y purificó cada uno de los genes analizados, para posteriormente ser enviados para su secuenciación Se siguieron los lineamientos y requisitos indicados por la empresa MACROGEN para el envío de las muestras.

Gráfico 7 Corrida electroforética de amplicones purificados mediante el Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin para secuenciación.



Carriles 1-5: amplicones purificados del gen blaKPC de 5 muestras; C- (control Negativo); MP: (Marcado de peso 100pb); Carril A: (rpoB-501pb); Carril B: (gapA-450pb); Carril C: (mdh-477pb); Carril D: (pgi-432pb); Carril E: (tonB-414pb); Carril F: (infB-318pb); Carril G: (phoE-420pb). Gel Agarosa 2%, 90V, tiempo de corrida: 45 minutos.

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

Los resultados de las secuencias fueron analizadas en la página web del Instituto Pasteur:(http://bigsdb.web.pasteur.fr/perl/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef_public&page=plugin&name=RuleQuery&ruleset=Sequence_Type_determination), para determinar la secuencia tipo a la que pertenece cada uno de los aislamientos. Se observó diversidad alélica y 7 secuencias tipo. Referise a **Tabla 4.**

Tabla 4 Variación alélica y Secuencias Tipo de *Kpn*-KPC encontradas utilizando MLST

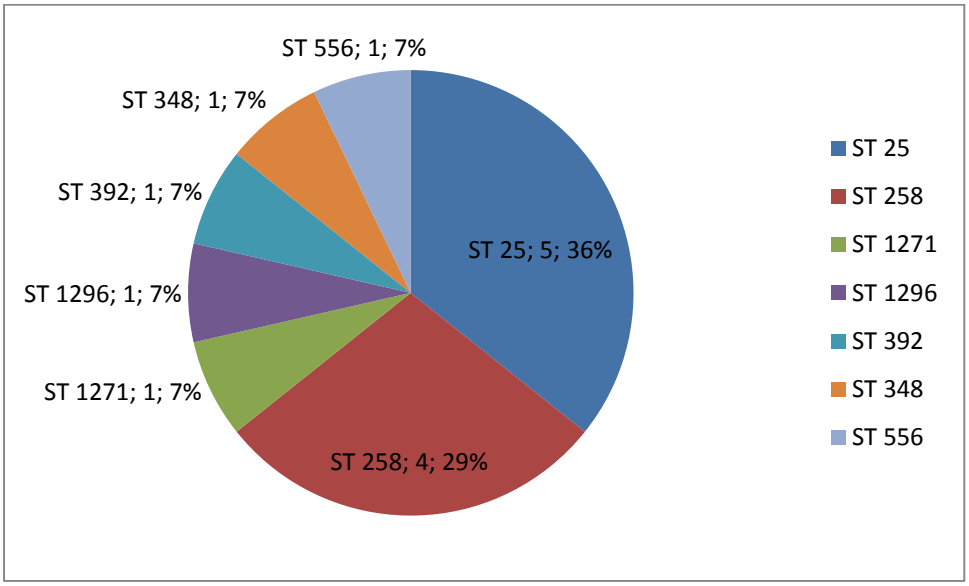
ID cepa	*rpoB*	*gapA*	*mdh*	*pgi*	*tonB*	*infB*	*phoE*	Secuencia tipo (ST)
C-002	1	3	1	1	79	3	1	258
C-014	15	2	1	28	138	1	12	556*
C-029	4	3	6	1	40	4	7	392
C-050	1	3	1	1	79	3	1	258
C-056	4	2	1	1	13	1	10	25
C-059	4	2	1	1	13	1	10	25
C-067	4	2	1	1	13	1	10	25
C-077	4	2	1	1	13	1	10	25
C-193	15	2	20	1	16	1	12	348
C-278	70	4	2	1	12	1	7	1296
C-310	1	3	1	1	79	3	1	258
C-320	4	2	1	1	13	1	10	25
C-423	1	3	1	1	79	3	1	258
C-445	4	2	2	2	4	3	4	1271

***Secuencia tipo no descrita anteriormente. ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016**

De las 14 cepas analizadas por MLST, en el **Gráfico 8** se observa el porcentaje obtenido de cada Secuencia Tipo, donde el 28% (n=4) pertenecen a la Secuencia tipo 258 (ST 258), de los cuales 2 fueron asilados en la ciudad de Quito, uno en la ciudad de Cuenca y otro en la ciudad de Guayaquil. La ST 25 estuvo presente en 5 aislamientos (37%)

distribuidos todos en diferentes hospitales de la ciudad de Quito. El resto de aislamientos pertenecen a ST 392 (7.14 %; *n*=1), ST348 (7.14 %; *n*=1), ST 1296 (7.14 %; *n*=1) y ST 1271 (7.14 %; *n*=1), localizados todos en la ciudad de Quito y una última ST 556 (7.14 %; *n*=1), la cual fue aislada en Cuenca.

Gráfico 8 Porcentaje de Secuencias Tipo encontradas en las 14 cepas de *Kpn*-KPC



ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

En la **tabla 5** se observa la distribución de las ST por servicio hospitalario, donde se observa un mayor número de aislamientos procedentes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI).

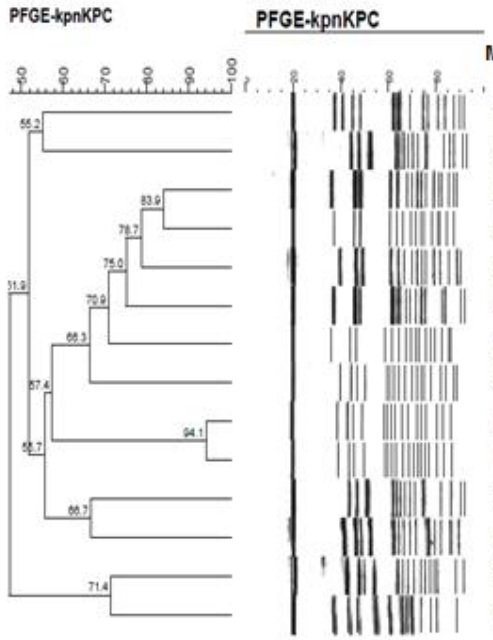
Tabla 5 Distribución por servicio hospitalario de las 14 cepas analizadas mediante MLST de aislados de *K. pneumoniae* provenientes de diversas casas de salud del país en el perioodo 2013-2014.

Servicio Hospitalario	n° *Kpn*-KPC (%) n=14	ID cepa	Hospital (Ciudad)	ST
UCI	6 (42.86)	Kpn-077	Hospital 6 (Quito)	ST 25
		Kpn-059	Hospital 1 (Quito)	ST 25
		Kpn-002	Hospital 5 (Guayaquil)	ST 258
		Kpn-050	Hospital 1 (Quito)	ST 258
		Kpn-014	Hospital 3 (Cuenca)	ST 556*
		Kpn-056	Hospital 1 (Quito)	ST 25
Pediatría	3 (21.43)	Kpn-193	Hospital 2 (Quito)	ST 348
		Kpn-445	Hospital 2 (Quito)	ST 1271
		Kpn-278	Hospital 2 (Quito)	ST 1296
Hematología	1 (7.14)	Kpn-029	Hospital 4 (Quito)	ST 392
Urgencias	1 (7.14)	Kpn-423	Hospital 1 (Quito)	ST 258
Medicina Interna	1 (7.14)	Kpn-310	Hospital 1 (Quito)	ST 258
Unidad de Quemados	1 (7.14)	Kpn-067	Hospital 1 (Quito)	ST 25
Neurocirugía	1 (7.14)	Kpn-320	Hospital 1 (Quito)	ST 25

***Secuencia tipo no descrita anteriormente la cual fue aislada en un hospital de Cuenca**
ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

En el **gráfico 9** se presenta el dendrograma por PFGE de las 14 cepas que se les realizó MLST, donde se observa como entre cepas que no comparten una alta relación clonal [C-558; C-20; C-310; C-423 (Índice Dice: < 80%)] y que además pertenecen a diferentes ciudades y fechas de aislamiento, presentan una misma secuencia tipo (ST 258), estos resultados se asemejan a estudios realizados anteriormente, donde muestran cepas aisladas de diferentes hospitales y regiones, que no comparten una estrecha relación clonal por PFGE, pero que pertenecen a una misma ST (Tijet et al., 2014).

Gráfico 9 Dendrograma basado en los patrones de bandas por PFGE de las 14 cepas con sus respectivas Secuencias Tipo.



Mes/Año	ID	Hospital	Muestra	Sala de Hosp.	Ciudad	ST
Oct-2013	C-278	Hosp2	Sangre	Pediatria	Quito	1296
Ago-2014	C-558	Hosp4	LBA	UCI	Cuenca	258
Ene-2013	C-20	Hosp1	Sangre	UCI	Guay.	258
Jul-2014	C-362	Hosp3	LBA	UCI	Quito	25
Ene-2015	C-15	Hosp7	Sangre	UCI	Quito	25
Jul-2013	C-193	Hosp2	Liq. Abdominal	Pediatria	Quito	348
Jul-2014	C-310	Hosp3	Sangre	Med. Int.	Quito	258
Jul-2014	C-423	Hosp3	Sangre	Urgencias	Quito	258
Jul-2014	C-320	Hosp3	Sangre	Neuroci.	Quito	25
Jul-2014	C-445	Hosp2	Sangre	Pediatria	Quito	1271
May-2014	C-178	Hosp4	Asp. traqueal	UCI	Cuenca	556
Dic-2014	C-1019	Hosp5	Sangre	UCI	Quito	25
Sep-2014	C-715	Hosp8	Sangre	Oncologia	Quito	25
May-2015	C-550	Hosp6	LBA	Hematol.	Quito	392

******LBA (Lavado Bronco Alveolar); UCI (Unidad de Cuidados Intensivos)

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

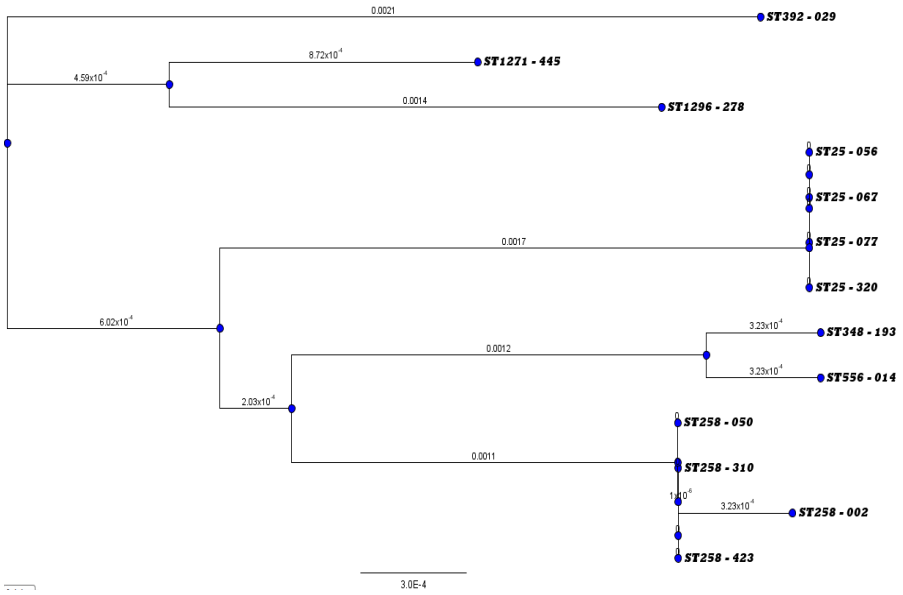
También observamos el caso contrario, es decir cepas con altos porcentajes de similitud por PFGE [C-20; C-362 (Coeficiente de Sorensen-Dice: 83.9%)] y [C-320; C-445 (Índice de Dice: 94.1%)], presentan diferentes secuencias tipo entre ellas. Estos resultados no han sido reportados previamente ya que en la bibliografía citada en este trabajo, no se encontró casos similares. Esto pone en evidencia que la técnica de MLST, presenta más poder discriminatorio al momento de establecer relaciones clonales entre diferentes asilamientos, dando la posibilidad de establecer complejos clonales y relaciones filogenéticas (Holt et al., 2015).

Con el análisis se secuencias se encontró diversidad alélica de cada uno de los genes para MLST de *Klebsiella pneumoniae*; el gen *rpoB* presentó 4 alelos (1, 15, 4, 70), el gen *gapA* presentó 3 alelos (3, 2, 4), el gen *mdh* presentó 4 alelos (1, 6, 20, 2), el gen *pgi* presentó 3 alelos (1, 28, 2), el gen *tonB* con 7 alelos, que es el que más diversidad alélica

presentó (79, 138, 440, 13, 16, 12, 4), en gen *infB* presentó 3 alelos (3, 1, 4) y el gen *phoE* con 5 alelos (1, 12, 7, 10, 4). Ver **Tabla 4.**

Se utilizó el programa bioinformático *Geneious 9.1.8* para el análisis de las secuencias tipo obtenidas. En la **Gráfico 10** se observa el árbol filogenético obtenido tras el análisis, donde se observa diversidad clonal y la presencia de grupos clonales. Se observa que el grupo clonal ST 25, el grupo clonal ST 258 y las ST 556 y 348 proceden de un ancestro en común, ya que las ramas que los describen convergen en el nodo A. Al mismo tiempo se observa que entre las ST 1271 y 1296 convergen en un mismo punto (B) pero existe diferencia evolutiva. En el caso de la ST 392, esta no se relaciona con el resto de las secuencias tipo encontradas dentro del presente estudio, al observarse una mayor brecha evolutiva.

Gráfico 10 Dendrograma de las secuencias tipo encontradas en aislados de *Kpn*-KPC



ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

4.2. DISCUSION

Las Enterobacterias Resistentes a Carbapenémicos (ERC) se encuentran diseminadas a nivel mundial y presentando un verdadero desafío clínico para el manejo y control de pacientes infectados con este tipo de microorganismos (Endimiani, DePasquale, et al., 2009), donde *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas tipo KPC (*Kpn-KPC*), es uno de los principales exponentes de este género, ya que está implicado en brotes intrahospitalarios y produciendo una alta tasa de morbimortalidad (Kitchel et al., 2009; Córdova et al., 2012).

Este estudio presenta las variables epidemiológicas, perfiles de resistencia, identificación de *Kpn-KPC,* mediante métodos fenotípicos como genotípicos y la diversidad clonal en nuestro medio. La primera parte de esta investigación analiza las variables epidemiológicas de las 80 cepas analizadas, de los cuales se destaca las salas de internación de donde proceden la mayoría de los aislamientos: Unidad de Cuidados Intensivos (UCI, 36.2%), Cirugía General (CGE, 8.7%), Emergencia (EME, 6.2%), datos que se asemejan con investigaciones similares realizadas en América Latina y que revelan brotes intrahospitalarios causados por *Kpn-KPC* (Córdova et al., 2012; Rodríguez et al., 2014).

Estos resultados revelan un mayor número de aislamientos provenientes de salas de hospitalización, donde los pacientes generalmente se encuentran con alimentación parenteral o conectados a sistemas de respiración artificial, representando factores de riesgo para infección con *Kpn-KPC* (Echeverri & Cataño, 2010). En este contexto una deficiencia en el manejo de pacientes infectados con *Kpn-KPC*, puede ser el inicio de un brote a nivel hospitalario tal como se describe en trabajos realizados en el año 2009, por Brisse y Endemiani (Brisse et al., 2009; Endimiani, DePasquale, et al., 2009).

En la actualidad *Kpn*-KPC es considerado a nivel mundial como un microorganismo multirresistente, por su facilidad para acoplar genes de resistencia a los antimicrobianos empíricamente prescritos (Sun et al., 2015). Dentro del presente estudio, los perfiles de susceptibilidad de los 80 aislados de *Kpn-KPC* obtenidos tras el análisis demuestran resistencia del 100% a cefalosporinas de 3ra. y 4ta. Generación, monobactámicos y carbapenémicos, demostrándose así que, al igual que se describen en resultados presentados por Muñoz-Price y colaboradores en el año 2013, este tipo de enzimas nos solo van a la capacidad de hidrolizar no solo a los carbapenémicos sino también a toda la familia de B-lactámicos (Muñoz-Price et al., 2013).

En cuanto a otras familias de antimicrobianos, como es el caso de los aminoglucósidos, se obtuvo un 91% de resistencia a la Gentamicina y aunque se sabe que este antimicrobiano es usado como terapia alternativa en caso de *Kpn-KPC*, la alta resistencia dentro del estudio puede atribuirse a que este va a ser efectivo en el caso de que se trate de un asilado perteneciente al linaje de la ST258 (Muñoz-Price et al., 2013). Otros aminoglucósidos como la amikacina e incluso quinolonas y fluoroquinolonas, que presentaron un 51 y 60% de resistencia respectivamente, van a ser efectivas en aislados no pertenecientes al linaje ST258 (Muñoz-Price et al., 2013), pero se debe tener en cuenta que debido a la co-existencia de otros mecanismos de resistencia, mediados por plásmidos como BLEE, se pueden provocar resistencias cruzadas (Holt et al., 2015).

Actualmente para tratar infecciones provocadas por *Kpn-KPC* se plantean terapias combinadas con colistín y tigeciclina, acompañados de un carbapenémico (Muñoz-Price et al., 2013). En un estudio similar realizado en Argentina, por Córdova y colaboradores en el añó 2012, se encontró que en los aislados de estudio existía un 100% de sensibilidad al Colistín y a la tigeciclina (Córdova et al., 2012), al igual que describen Sun y colaboradores en un estudio realizado en China en el 2015 (Sun et al., 2015); dentro de los

resultados de nuestro estudio, de los 80 aislados analizados se observó un 93,8% de sensibilidad para Polimixina B y un 73,8% en el caso de la tigeciclina, si bien se reportaron altos niveles de sensibilidad, se debe tener en cuenta que en los estudios antes citados se realizó el análisis mediante Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), además del uso de Colistín en lugar de la polimixina B.

En cuanto a los resultados, los patrones de PFGE revelan cepas relacionadas genéticamente, las cuales se distribuyen por diferentes salas de hospitalización evidenciando la presencia de brotes intrahospitalarios, donde la causa más probable de contagio sea de paciente a paciente (Córdova et al., 2012).

Los análisis realizados muestran varios grupos clonales donde se destaca un estrecha relación clonal entre cepas pertenecientes a diferentes casas de salud, lo que indicaría que provienen de un ancestro en común tal como se observa en estudios realizados por Kitchel y Echeverri en los años 2009 y 2010 respectivamente (Kitchel et al., 2009; Echeverri & Cataño, 2010).

En el presente estudio se realizaron ensayos de MLST en 14 aislados de *Kpn KPC*, los cuales fueron seleccionados por los perfiles de susceptibilidad obtenidos y el análisis de clonalidad mediante PFGE. De los 14 aislados, 5 pertenecieron a la ST25, 4 a la ST258 y un aislado de ST556, ST392, ST348, ST1296 y ST1271 respectivamente.

Como podemos observar en el presente estudio un 36% de los aislados pertenecen a ST 25, los cuales comparten un origen en común, pues son procedentes de aislados de sangre, pertenecientes a pacientes con estancias hospitalarias prolongadas. La literatura describe que esta secuencia tipo (ST25) pertenece al complejo clonal 65, la cual se encuentra asociada a infecciones en humanos, específicamente relacionados a aislados de muestras invasivas como sangre y en absceso hepático (Brisse et al., 2009).

Los aislados de *Kpn KPC* pertenecientes a la ST258 están ampliamente distribuidos a nivel mundial y se asocian a brotes intrahospitalarios, por la adquisición de genes de multiresistencia (Muñoz-Price et al., 2013), debido a elementos genéticos móviles, en este caso el transposón Tn*4401* (Kitchel et al., 2010). En la región se han descrito brotes de KPC tipo 2, el cual está estrechamente relacionado con con clones de ST258. En el presente estudio, el 29% de los aislados analizados mediante MLST correspondieron a este tipo de ST, y podemos notar que existe resistencia a los β-lactámicos y en cierto porcentaje a aminoglucósidos y fluoroquinolonas, evidenciándose la presencia de brotes intrahospitalarios. En países como Colombia (Rodríguez et al., 2014), Argentina (Córdova et al., 2012) y Brasil (Ribeiro et al., 2016) se han realizado estudios similares, en los cuales se describen patrones similares, de brotes en diversas casas de salud, en donde se evidencia resistencia principalmente a β-lactámicos, por excelencia a carbapenémicos. En nuestro país desde el reporte del primer caso de una KPC, se han realizado estudios para establecer el clon predominante en nuestro medio mediante ensayos de PFGE, estableciéndose diversidad clonal en los microorganismos de estudio (Zurita et al., 2013).

De acuerdo con estudios previos, se reportan brotes policlonales dentro de una casa de salud, observándose una posible transmisión horizontal entre varios servicios. Este patrón se asemeja a la realidad de nuestro estudio, ya que el "Hospital 3" presenta 2 secuencias tipo predominantes, ST25 y ST258, aislados mayoritariamente de UCI, lo cual refleja un brote policlonal en este hospital.

En el caso de ST 392, esta se encuentra asociada a la transmisión por un transposón denominado Tn3, pero además de contener genes resistencia de tipo KPC también va a diseminar carbapenemasas de tipo OXA (Yang et al., 2013). Las secuencias tipo 358 y 1296 se encuentran asociadas al igual que las anteriores a resistencias a los antimicrobianos en infecciones intrahospitalarias.

En el 2014, la ST 1271 fue caracterizada por Quiñones en Cuba , la cual se asocia con KPC tipo 2, pero además con la resistencia al colistín, en nuestro estudio encontramos un aislado perteneciente a esta secuencia tipo, la cual se presentó un halo de inhibición que se interpreta como resistente teniendo como referencia los puntos de corte de no fermentadores para el colistín (Quiñones et al., 2014). Sin embargo, se recomienda la confirmación por concentración mínima inhibitoria.

En el caso particular del "Hospital 2" encontramos un brote policlonal, con dos diferentes secuencias tipo circulantes, ST 1296 y 1271; las cuales se han descrito previamente en Centroamérica (Quiñones et al., 2014) y Asia (Yang et al., 2013), las cuales en nuestro estudio se presentaron en población pediátrica.

Dentro del estudio se caracterizó la secuencia tipo 556, la cual no ha sido descrita previamente, por lo que se presume que se trata de una variante. El aislado proviene de la ciudad de Cuenca y presenta características propias de esta secuencia tipo.

La diversidad clonal evidenciada por PFGE se correlaciona con lo descrito por MLST, sin embargo, observamos aislados que presenta una estrecha relación clonal por PFGE (94% C-320 y C-445) pero pertenecen a diferentes secuencias tipo. Esto revela que MLST va a ser más específico para la descripción de mutaciones debido al uso de genes con secuencia conservada, por el contrario PFGE no va a detectar mutaciones, pues en esta técnica la enzima de restricción realiza cortes en regiones específicas del genoma completo de la bacteria. En otros aislados observamos que si bien no tienen altos porcentajes de similitud por PFGE, presentan una misma secuencia tipo.

4.3. CONCLUSIONES

- Durante el periodo de estudio, se identificaron aislados de *Kpn*-KPC distribuidos en varias casas de salud, lo que demuetra una alta diseminación de este tipo de microrganismos en nuestro medio.
- Todas las cepas analizadas en este estudio fueron confirmadas en género y especie como *Klebsiella pneumoniae*, en base a sus características bioquímicas, descartando la presencia de cepas contaminantes en los criotubos del cepario de RAM.
- Se implementaron protocolos de trabajo para la identificación fenotípica de *Kpn-KPC*, los cuales presentaron resultados óptimos al ser comparados con métodos genotípicos.
- El Aztreonam (ATM) se presentó resistente en el 100 % de los casos, mostrándose como un buen indicador de la producción de carbapenemasas tipo KPC.
- Todos los aislamientos presentan perfiles de resistencia en la categoría de MDR y XDR, lo cual se ve implicado en la disminución de alternativas terapéuticas al momento de combatir una infección con este tipo de microorganismos.
- Se identificaron cepas con perfil de posibles PDR, lo que pone en evidencia el constante acoplamiento de este microorganismo ante la presión selectiva del medio en que se encuentra.
- Los mecanismos de corresistencia que principalmente se encontraron en *Kpn*-KPC, fueron la producción de AmpC y BLEE, los cuales fueron identificados mediante técnicas fenotípicas.
- La mayoría de los aislamientos presentan sensibilidad a tigeciclina y polimixina B, los cuales se utilizan como tratamiento alternativo ante la presencia de un microorganismo multirresistente.

- Todos los métodos fenotípicos evaluados se presentan como buenos indicadores para la identificación o diagnóstico de *Kpn*-KPC.
- Las 80 cepas analizadas amplificaron para el gen bla_{KPC}, lo cual se corroboró con los altos niveles de resistencia todos los B-lactámicos, en contraste, no se observó la presencia de corresistencia con metaloenzimas.
- La subtipificación por PFGE revela diversidad clonal entre las cepas analizadas con la presencia de un clon predominante en cada casa de salud.
- Por PFGE también se observó una estrecha relación clonal entre cepas de *Kpn*-KPC de varias casas de salud, sugiriendo una posible transmisión horizontal.
- Mediante MLST se confirmó diversidad clonal entre hospitales y regiones del Ecuador, identificándose 7 secuencias tipo, entre las cuales se presenta una ST que no ha sido descrita previamente.
- Las Secuencias Tipo (ST) más prevalentes en nuestro estudio fueron la ST 258 y la ST 25, los cuales están relacionados con brotes intrahospitalarios e infecciones sistémicas respectivamente.
- Se observó brotes intrahospitalarios policlonales con la presencia de un clon predominante en cada casa de salud, planteando que la transmisión horizontal es la principal vía de contagio de *Kpn-KPC*, lo que sugiere problemas en el control de pacientes infectados.

4.4. RECOMENDACIONES

Como se mencionó anteriormente, se encontraron cepas con fenotipos de posibles PDR, por lo que se recomienda el seguimiento de estas cepas con estudios de susceptibilidad por concentración inhibitoria mínima (MIC) para antibióticos de amplio espectro y Colistín, de esta manera confirmar fenotipo de PDR; al mismo tiempo sería necesario la complementación con el análisis de secuenciación por MLST de estos aislamientos. Además con estos resultados, se sugiere la constante vigilancia de este microorganismo a nivel hospitalario, a fin de detectar posibles brotes causados por microorganismos Panrresistentes.

Con los resultados obtenidos en este estudio, se propone estudios de cohortes o de casos y controles en los hospitales que presenten brotes causados por *Kpn*-KPC, esto para obtener información sobre pacientes colonizados, salas de hospitalización contaminadas y personal de la salud que pueden ser el vehículo para la transmisión de este microorganismo.

Se sugiere continuar con los estudios en *Kpn-KPC*, pues es necesario complementar la información existente, adquiriendo conocimientos en cuanto a plásmidos, la secuenciación del genoma completo y el tipo de KPC predominante en nuestro medio**.**

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con los métodos fenotípicos para la identificación de las carbapenemasas (CIM/APB), se sugiere socializar el uso de estos dentro de las casas de salud, para el diagnóstico temprano de este tipo de resistencias.

Se recomienda estudios de conjugación y transformación, para ver la capacidad de transmisión de este tipo de resistencia en nuestro medio. También puede ser factible, el análisis de las diversas herramientas genéticas con las que se facilita la diseminación del transposón Tn *4401* a nivel local.

5. BIBLIOGRAFÍA

Ashayeri-Panah, M., Eftekhar, F., Mobarak Ghamsari, M., Parvin, M., & Mehdi Feizabadi, M. (2013). Genetic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *Brazilian Journal of Microbiology*, *7*, 823–828.

Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., & Grimont, P. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS ONE*, *4*(3). doi:10.1371/journal.pone.0004982

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *54*(3), 969–76. doi:10.1128/AAC.01009-09

Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *27*(1), 44–52. doi:10.1016/j.eimc.2008.11.001

Campion, R., & Canul, J. (2004). *Secuenciación de ácidos nucleicos*.

Caravaca, F. (2015). Ceftazidima-avibactam en el tratamiento de infecciones urinarias por Klebsiella productora de carbapenemasa en trasplante renal. *Nefrología*, *35*, 410–417. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2015.01.001

Cardozo-Bernal, Á. M., Ramón, L. F., Poutou-Piñales, R. A., Carrascal-Camacho, A. K., & Zambrano, D. C. (2013). Electroforesis en Gel de Campo Pulsado (PFGE) para la

diferenciación molecular de Listeria monocytogenes. *Universitas Scientiarum*, *18*(2), 203–222. doi:10.11144/Javeriana.SC18-2.egcp

Córdova, E., Lespada, M. I., Gómez, N., Pasterán, F., Oviedo, V., & Rodríguez-Ismael, C. (2012). Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *30*(7), 376–379. doi:10.1016/j.eimc.2011.12.003

Cuzon, G., Naas, T., & Nordmann, P. (2011). Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *55*(11), 5370–3. doi:10.1128/AAC.05202-11

Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Patrick, a D., Grimont, P. a D., & Brisse, S. (2005). Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *Journal of clinical microbiology*, *43*(8), 4178–4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178

Echeverri, L. M., & Cataño, J. C. (2010). *Klebsiella pneumoniae* as a nosocomial pathogen: epidemiology and drug resistance. *Iatreia*, *23*(3), 240–249.

Endimiani, A., DePasquale, J. M., Forero, S., Perez, F., Hujer, A. M., Roberts-Pollack, D., … Bonomo, R. A. (2009). Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: A new challenge to our healthcare system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *64*(5), 1102–1110. doi:10.1093/jac/dkp327

Endimiani, A., Hujer, A. M., Perez, F., Bethel, C. R., Hujer, K. M., Kroeger, J., … Bonomo, R. A. (2009). Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae*

isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *63*(3), 427–437. doi:10.1093/jac/dkn547

Falagas, M. E., & Karageorgopoulos, D. E. (2008). Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and multidrug resistance (MDR) among Gram-negative bacilli: need for international harmonization in terminology. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, *46*(7), 1121–2; author reply 1122. doi:10.1086/528867

García, C. S., de la Gándara, M. P., & García, F. J. C. (2010). Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de Escherichia coli y Klebsiella. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *28*(SUPPL. 1), 12–18. doi:10.1016/S0213-005X(10)70003-3

Gutiérrez, C., Labarca, J., Román, J. C., Sanhueza, F., Moraga, M., Wozniak, A., … GarcÃ\-a, P. (2013). Vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en cultivos rectales en un hospital universitario de Santiago, Chile. *Revista chilena de infectologÃ\-a*, *30*(1), 103–106. doi:10.4067/S0716-10182013000100019

Hawkey, P. M., & Livermore, D. M. (2012). Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ (Clinical research ed.)*, *344*(may31_1), e3236. doi:10.1136/bmj.e3236

Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D., … Thomson, N. R. (2015). Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(27), E3574–81. doi:10.1073/pnas.1501049112

Humphries, R. M., Yang, S., Hemarajata, P., Ward, K. W., Hindler, J. A., Miller, S. A., & Gregson, A. (2015). First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *59*(10), 6605–7. doi:10.1128/AAC.01165-15

Iñiguez, D., Zurita, J., Alcocer, I., Ortega, D., Gómez, A., & Maldonado, L. (2012). *Klebsiella pneumoniae* productora de Carbapenemeasa tipo KPC: Primer Reporte en el Ecuador. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*, *37*, 39–42.

Iredell, J., Brown, J., & Tagg, K. (2016). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ (Clinical research ed.)*, *352*(feb08_1), h6420. doi:10.1136/bmj.h6420

Juan Nicolau, C., & Oliver, A. (2010). Carbapenemases en especies del género Pseudomonas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, *28 Suppl 1*(Supl 1), 19–28. doi:10.1016/S0213-005X(10)70004-5

Kitchel, B., Rasheed, J. K., Endimiani, A., Hujer, A. M., Anderson, K. F., Bonomo, R. A., & Patel, J. B. (2010). Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(10), 4201–4207. doi:10.1128/AAC.00008-10

Kitchel, B., Rasheed, J. K., Patel, J. B., Srinivasan, A., Navon-Venezia, S., Carmeli, Y., … Giske, C. G. (2009). Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *53*(8), 3365–3370. doi:10.1128/AAC.00126-09

Liu, P., Li, P., Jiang, X., Bi, D., Xie, Y., Tai, C., … Ou, H.-Y. (2012). Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. pneumoniae HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum. *Journal of bacteriology*, *194*(7), 1841–2. doi:10.1128/JB.00043-12

López Vargas, J. A., & Echeverri Toro, L. M. (2010). K. pneumoniae: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. *Iatreia*, *3*, 157–165.

Magiorakos, a, Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., … Hindler, J. F. (2011). Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Microbiology*, *18*(3), 268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x

Martínez Rojas, D. D. V. (2009). Artículo de revisión Betalactamasas tipo AmpC : generalidades y métodos para detección fenotípica. *Revista de la Sociedade Venezolana de Microbiología*, 78–83.

Muñoz-Price, L. S., Poirel, L., Bonomo, R. A., Schwaber, M. J., Daikos, G. L., Cormican, M., … Quinn, J. P. (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd. doi:10.1016/S1473-3099(13)70190-7

Murray, P. R., Rosenthal, K. E. N. S., & Pfaller, M. A. (2009). *MICROBIOLOGÍA*.

Nicola, F. G., Nievas, J., & Smayevsky, J. (2012). Evaluación de diversos métodos fenotípicos para la detección de carbapenemasas KPC en *Klebsiella pneumoniae*. *Revista Argentina de Microbiologia*, *44*(4), 290–302.

Pérez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K. A. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, *16*, 38–53. doi:10.1016/j.meegid.2013.01.009

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, *70*(1), 119–23. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002

Puerta, A., & Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, *10*, 3426–3431.

Quiñones, D., Hart, M., Espinosa, F., Garcia, S., Carmona, Y., Ghosh, S., … Kobayashi, N. (2014). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing KPC-2 carbapenemase in Cuba. *New Microbes and New Infections*, *2*(4), 123–126. doi:10.1002/nmi2.54

Ribeiro, V. B., Andrade, L. N., Linhares, A. R., Barin, J., Lu, A., Darini, C., … Barth, A. L. (2016). Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil, (2013), 1721–1727. doi:10.1099/jmm.0.062141-0

Rodríguez, E. C., Saavedra, S. Y., Leal, A. L., Álvarez, C., Olarte, N., Valderrama, A., … Escobar, J. (2014). Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. *Biomédica*, *34*, 224–231. doi:10.7705/biomedica.v34i0.1696

Ruiz-Garbajosa, P., Curiao, T., Tato, M., Gijón, D., Pintado, V., Valverde, A., … Cantón, R. (2013). Multiclonal dispersal of KPC genes following the emergence of non-ST258 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clones in madrid, spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *68*(11), 2487–2492. doi:10.1093/jac/dkt237

Siripattanapipong, S., Mungthin, M., Tan-ariya, P., & Leelayoova, S. (2010). M Ultilocus S Equence T Yping (Mlst) and I Ts a Pplications in E Pidemiological S Tudies, 99–117.

Sun, K., Chen, X., Li, C., Yu, Z., Zhou, Q., & Yan, Y. (2015). Clonal dissemination of multilocus sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - producing K. pneumoniae in a Chinese teaching hospital. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, *123*(2), 123–7. doi:10.1111/apm.12313

Tijet, N., Sheth, P. M., Lastovetska, O., Chung, C., Patel, S. N., & Melano, R. G. (2014). Molecular Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) - Producing Enterobacteriaceae in Ontario ,, *2*, 2008–2011. doi:10.1371/journal.pone.0116421

Ullmann, U. (1998). Klebsiella spp . as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors, *11*(4), 589–603.

Van Der Zwaluw, K., De Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., De Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (2015). The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS ONE*, *10*(3), 1–13. doi:10.1371/journal.pone.0123690

Vázquez, J. A., & Berrón, S. (2004). [Multilocus sequence typing: the molecular marker of the Internet era]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, *22*(2), 113–20.

Vila, J., & Marco, F. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de bacilos gramnegativos no fermentadores. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*, *28*(10), 726–736. doi:10.1016/j.eimc.2010.05.001

World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. GINEBRA.

Yang, J., Ye, L., Guo, L., Zhao, Q., Chen, R., Luo, Y., … Han, L. (2013). A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, *19*(11), E509–15. doi:10.1111/1469-0691.12275

Zurita, J., Alcocer, I., Ortega-Paredes, D., Barba, P., Yauri, F., Iñiguez, D., & Mora, M. (2013). Carbapenem-hydrolysing β-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Ecuadorian hospitals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, *1*(4), 229–230. doi:10.1016/j.jgar.2013.06.001

6. ANEXOS

Anexo 1 Identificación de Género y Especie de *K. pneumoniae*

Procedimiento:

1er día

- Siembra de cepas en Agar Base Sangre y Agar MacConkey, tratando de obtener cepas puras y aisladas.

2do día

- Observar que las colonias se encuentren puras y aisladas, de lo contrario se procederá a realizar una resiembra en Agar Sangre.
- Realizar una suspensión en agua destilada con colonias asiladas y puras a una concentración bacteriana de 0,5 en la escala McFarland.
- Realizar la siembra en la batería bioquímica de acuerdo al siguiente procedimiento:
- Sembrar en medio de cultivo Kliger picando hasta el fondo del tubo y estriando en la cola del agar.
- Siembra en medio de cultivo Lisina picando hasta el fondo del tubo y estriando en la cola del agar.
- Siembra en medio de cultivo Citrato, estriando en la cola del agar.
- Siembra en medio de cultivo Urea, estriando en la cola del agar.
- Siembra en Medio de cultivo SIM picando tres cuartas partes del medio de forma vertical y dejando caer de 2 a 3 gotas.
- Siembra en medio de cultivo Rojo de Metilo/Voges Proskauer (MR/VP) dejado caer de 5 a 10 gotas en el medio líquido.
- Incubar a 36ºC de 10 a12 horas.

3er día

- Colocar los reactivos necesarios para el medio líquido MR/VP y dejar reaccionar de 5 a 10 minutos.
- Interpretar los resultados de la batería bioquímica. Anexo
- Anotar los resultados en la matriz de trabajo Excel (ANEXO VI)

Anexo 2 Protocolo del antibiograma por el método de difusión de discos (Kirby-Bauer) para *Kpn*-KPC

1er día

- Con las colonias aisladas en el agar base sangre utilizando para realizar la prueba de identificación bacteriana, se procede a realizar un pase en otro agar sangre de una colonia única.

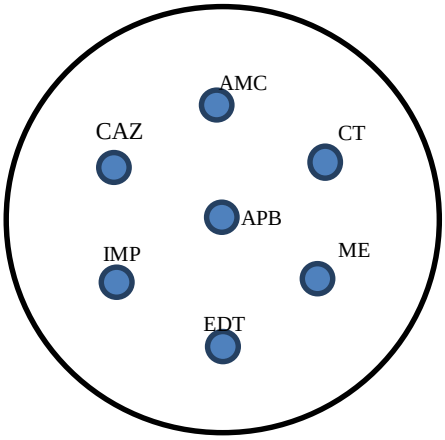
2do día

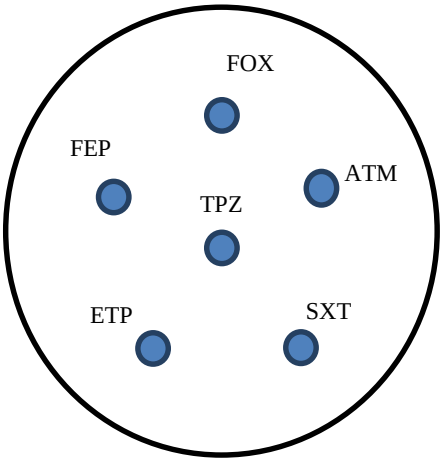
- Realizar una suspensión bacteriana en agua destilada a una concentración de .05 en la escala McFarland utilizando un densitómetro.
- Con un hisopo estéril estriar en tres direccione diferentes sobre toda la superficie del Agar Muller Hinton de tres cajas pequeñas.
- Colocar los discos de antibióticos en las cajas estriadas de acuerdo a lo siguiente:

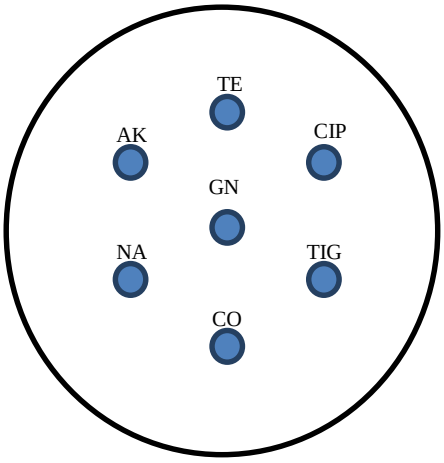
  Caja 1: APB, AMC, CTX, CAZ, IMP, MEN, EDTA.

  Caja 2: FOX, FEP, ATM, TPZ, SXT, ETP.

  Caja 3: TE, CIP, TIG, PB, NA, AK, CN.
- Incubar de 10 a 12 horas a 37ºC.







Anexo 3 Protocolo para el Test de Doble Disco (Jarlier) para la detección en BLEE en *Kpn*-KPC

Fundamento

Método fenotípico específico usado para la detección de β-lactamasas de Espectro Extendido (BLEE). El método se fundamenta en la hidrólisis de Cefalosporinas de 3ªy 4ª generación y un monobactámico al exponer a un inhibidor de β-lactamasas+ Betalactámico (AMC).

Procedimiento

- Mediante la técnica de difusión de discos, Kirby-Bauer, se procede a inocular la cepa de estudio en agar Mueller-Hinton, teniendo en cuenta la escala McFarland que corresponde a 0,5.
- Colocar en el centro un disco de Amoxicilina/Ac. Clavulánico (AMC), y a una distancia de 2.5 cm se colocan las cefalosporina de 3ª y 4ª generación (CAZ, CTX, FEP y ATM)
- La presencia de BLEE se evidencia con la sinergia del AMC y las cefalosporinas de de 3ªy 4ª generación y un monobactámico, formándose efecto de huevo, cola de pez o balón de futbol americano. (Lezameta, Gonzáles-Escalante, & Tamariz, 2010)

Anexo 4 Protocolo del Test de Hodge Modificado para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC

Fundamento

Método fenotípico específico usado para la detección de cepas productoras de carbapenemasas. Al existir la producción de carbapenemasas por parte de la cepa en estudio, se inhibirá la acción del antibiótico permitiéndose el crecimiento de la cepa ATTC inoculada previamente, la cual es usada como indicador de sensibilidad.

Procedimiento

- Mediante la técnica de difusión de discos, Kirby-Bauer, se procede a inocular la cepa *E. coli* ATCC 25922 una placa de agar Mueller-Hinton, teniendo en cuenta la escala McFarland que corresponde a 0,5.
- Colocar un disco de carbapenémico (Ertapenem) en el centro de la placa.
- Se procede a inocular las cepas que se pretende estudiar en forma de una estría radia alrededor del carbapenémico.
- Se interpretará como positivo el crecimiento de la bacteria alrededor de la estría, y negativo al evidenciarse un completo halo de inhibición.

(Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011)

Anexo 5 Protocolo de trabajo para el test de Ácido 3-Animofenil Borónico para la detección de serín carbapenemasas en *Kpn*-KPC

Fundamento

Es una técnica fenotípica específica utilizada para la detección de cepas productoras de carbapenemasas de tipo KPC. Al existir la presencia de una cepa productora de KPC se evidencia una sinergia entre los discos de carbapenémicos, Imipenem y Meropenem, y el disco de ácido 3-aminofenil borónico.

Procedimiento

- Mediante la técnica de difusión de discos, Kirby-Bauer, se procede a inocular la cepa en estudio en la placa de agara Mueller-Hinton.
- Se colocan en posición lineal los discos de: Imipenem, Meropenem y en el centro el del ác. 3-Fenil Borónico, con el objeto de evidenciar la interacción de los antibióticos frente al ácido.
- Se interpretará como resultado positivo la sinergia de los discos de carbapenémicos con el ác. Borónico, y negativo al no encontrarse dicha sinergia.

(Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011)

Anexo 6 Protocolo de trabajo del Método de Inactivación del Carbapenémico para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC.

Procedimiento

- Colocar 400uL de Agua destilada en los tubos para microcentrífuga.
- Realizar una suspensión bacteriana con un asa calibrada de 10uL llena de la cepa a estudiar en los 400uL de agua destilada.
- Colocar un disco de MER (10ug) en la suspensión bacteriana.
- Incubar por 2 horas de 35 a 37°C.
- Realizar una suspensión bacteriana de *Escherichia coli* ATCC 25922 a una D.O. de 0,5 McFarland e inocular en la placa de agar Muller Hinton antes de que se cumplan las dos horas de incubación.
- Después de las dos horas de incubación, colocar los discos en la placa de agar Muller Hinton previamente inoculada con una cepa susceptible *(E. coli ATCC* 25922), a una distancia de al menos 2cm entre disco.
- Si los resultados se necesitan el mismo día se puede incubar la placa de Muller Hinton durante 6 horas y observar los resultados.
- Interpretación de resultados:
- Si el aislado bacteriano produce carbapenemasas, el Meropenem será inactivado y permitirá el crecimiento de la cepa indicadora de susceptibilidad observándose sin halo de inhibición alrededor del disco de meropenem e incluso permitiendo el crecimiento de la cepa a estudiar.
- Si el aislado bacteriano no produce carbapenemasas, el meropenem producirá un evidente halo de inhibición en la cepa indicadora de susceptibilidad (*E. coli* ATCC 25922).

(Kim van der Zwaluw, 2015)

Anexo 7 Protocolo de trabajo del Test de EDTA para la detección de Metalobetalactamasas en *Kpn*-KPC.

Fundamento

Es una técnica fenotípica específica utilizada para la detección de cepas productoras de carbapenemasas de tipo MBL. Al existir la presencia de una cepa productora de MBL se evidencia una sinergia entre los discos de carbapenémicos, Imipenem y Meropenem, y el disco de EDTA.

Procedimiento

- Mediante la técnica de difusión de discos, Kirby-Bauer, se procede a inocular la cepa en estudio en la placa de agara Mueller-Hinton, teniendo en cuenta la escala McFarland que corresponde a 0,5.
- Se colocan en posición lineal los discos de: Imipenem, Meropenem y en el centro el disco estéril, para posteriormente impregnar el EDTA.
- Se interpretará como resultado positivo la sinergia de los discos de carbapenémicos con el EDTA, y negativo al no encontrarse dicha sinergia.

(Calvo, Cantón, Fernández, Beatriz, & Navarro, 2011)

Anexo 8 Procedimiento para la crio-preservación de las cepas de *Kpn*-KPC

Preparación del BHI + Glicerol (20%)

Para la preparación del medio de preservación de la muestra se utilizó el caldo Infusión cerebro-corazón (BHI) y se le adicionó glicerol, para obtener una concentración final del 20%, siguiendo la siguiente fórmula:

Componente	**Cantidad**
Infusión cerebro- corazón (BHI)	90g
Solvente (H_2O_d)	80mL
Glicerol	20mL

- Mezclar los componentes y hervir hasta formar una solución homogénea.
- Dispensar 1ml del medio en los criotubos y esterilizar bajo las siguientes condiciones: 15 min a 120ºC y 15 libras de presión. El indicativo de esterilidad se evidencia con el uso de cinta testigo.
- Para la preservación del microorganismo se debe tomar una azada cargada de bacterias y suspender en el medio BHI + Glicerol (20%).

Anexo 9 Protocolo de trabajo para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC mediante PCR Múltiplex

- Preparar los reactivos necesarios de acuerdo al protocolo de PCR múltiplex, para identificación de carbapenemasas. **Tabla 6 y 7**
- Preparar una suspensión bacteriana en agua grado PCR con volumen final de 200uL
- Preparar la master mix de acuerdo a los volúmenes observados en las tablas 6 y 7.

Tabla 6 Master Mix para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC mediante PCR Múltiplex (M 1: *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{IMP}$).

PCR Múltiplex 1 (*bla*$_{KPC}$,*bla*$_{OXA-48}$,*bla*$_{IMP}$)

			Número de reacciones: 11	
			Volumen final/rx: 25uL	
Reactivos	**Concentración inicial**	**Concentración de trabajo**	**Volumen por reacción (uL)**	**Volumen en Master Mix (uL)**
GoTaq MASTER MIX	2X	1.12uM	14	154
PF-bla$_{KPC}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PR-bla$_{KPC}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PF-bla$_{IMP}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PR-bla$_{IMP}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PF-bla$_{OXA-48}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PR-bla$_{OXA-48}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
Agua molecular	--	--	7	77
Volumen Total	--	--	24	
DNA			1	

Tabla 7: Master Mix para la detección de carbapenemasas en *Kpn*-KPC mediante PCR Múltiplex (M 2: *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$).

PCR Múltiplex 2 (*bla*$_{NDM}$,*bla*$_{VIM}$)

			Número de reacciones: 11	
			Volumen final/rx: 25uL	
M2: NDM/VIM Reactivos	**Concentración inicial**	**Concentración de trabajo**	**Volumen por reacción (uL)**	**Volumen en Master Mix (uL)**
GoTaq MASTER MIX	2X	1.12uM	14	154
PF-bla$_{NDM}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PR-bla$_{NDM}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PF-bla$_{VIM}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
PR-bla$_{VIM}$	10uM	0.2uM	0.5	5,5
Agua molecular	--	--	8	88
Volumen Total	--	--		
DNA	--	--	1uL	

- Colocar en el termociclador y programar el equipo de acuerdo a las siguientes condiciones:

Temperatura (ºC)		**Tiempo**
94		10 min
94		30 s
52.8	35 ciclos	40 s
72		50 s
72		5 min

Anexo 10 Protocolo de trabajo para PFGE de *Kpn*-KPC

El procedimiento se lo realizó según normas internacionales. Referirse a Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. (PulseNet USA, 2013)

Flujo de trabajo de PFGE

DIA 0

- Siembra de las cepas a ser analizadas en AGAR BASE SANGRE, incubado a 37ºC por 14 horas (mínimo).
- Preparación de soluciones de trabajo: TE 1X, TBE 0.5X, BSC, BUFFER DE LISIS Agua destilada. Esterilizar a 121ºC durante 15 minutos.

DIA 1

Preparación de los "plugs" de trabajo:

- Se debe preparar una suspensión bacteriana con una absorbancia superior a 1, y añadir la Proteinasa K.
- Paralelamente fundir la agarosa *SEAKEM GOLD* al 1% y armar los moldes para la preparación del PLUG.
- Tomar 200ul de la agarosa y mezclar con 200ul de la suspensión bacteriana.
- Colocar en el molde y dejar solidificar durante 40 minutos.
- Colocar el plug en 5ml de buffer de lisis y agregar 20ul de Proteinasa K.
- Dejar en incubación durante 24h a 53ºC en constante agitación.

DIA 2

Lavado de plugs

- Colocar en cada tubo los filtros para el lavado y añadir 10ml de Agua destilada a una temperatura de 53ºC. Incubar durante 15 minutos a 55ºC en constante agitación repetir el procedimiento 3 veces.
- A continuación añadir 10ml de TE 1X a una temperatura de 53ºC. Incubar durante 15 minutos a 55ºC en constante agitación repetir el procedimiento 5 veces.

DIA 3

Digestión enzimática

- Preparar la Master Mix, la cual contiene la enzima de restricción XbaI, Agua molecular, BSA, Buffer D. Colocar 200ul de la master en un tubo de 1.5; paralelamente, realizar el corte de los plugs. (3mm de alto)

- Dejar en incubación por 24h a una temperatura de 37ºC.

DIA 4

- Preparación y corrida del gel.
- Colocar los plugs en el peine del molde para montar el gel; Agregar la agarosa al 1% con cuidado de que los plugs no se muevan del lugar establecido.
- Dejar solidificar durante un periodo mínimo de 30 minutos.
- Colocar el gel en el Equipo Chieff DRIII para campos pulsados. Con las siguientes condiciones: Tiempo inicial: 2.2segundos; Tiempo final: 63.8segundos; Tiempo de corrida: 15.4horas; Voltaje: 6V; Ángulo de 120º y temperatura constante 14ºC.

DIA 5

Revelado y análisis del gel.

El gel debe teñirse con Bromuro de Etidio (2%) y revelar en el Fotodocumentador *Biorad.* (PulseNet USA, 2013)

Anexo 11 Protocolo de trabajo para estudio MLST en *Kpn*-KPC

Por cada 25ul de PCR, se debe usar la siguiente reacción, teniendo en cuenta que se debe multiplicar el volumen de cada componente por el número de reacciones de PCR que tengamos. El volumen final a dispensarse en cada tubo debe ser de 24ul. (Jolley & Maiden, 2010). La preparación de las Master Mix se hizo de manera individual para cada gen housekeeping.

Tabla 8 Genes housekeeping para MLST de *Klebsiella pneumoniae*

GEN		*SECUENCIA*	Tº annealing
	F	GGCGAAATGGCWGAGAACCA	
rpoB (501pb)	**R**	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	50ºC
	F	TGAAATATGACTCCACTCACGG	
gapA(450pb)	**R**	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	60ºC
	F	CCCAACTCGCTTCAGGTTCAG	
mdh(477pb)	**R**	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	50ºC
	F	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	
pgi (432pb)	**R**	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	50ºC
	F	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	
phoE (420pb)	**R**	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	50ºC
	F	CTCGCTGCTGGACTATATTCG	
infB (318pb)	**R**	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	50ºC
	F	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	
tonB (414pb)	**R**	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	45ºC

Tabla 9 Reactivos que componen el volumen total de la reacción

Reactivo	**Concentración inicial**	**Concentración de trabajo**	**Volumen por reacción (uL)**	**Volumen en Master Mix (uL)**
H_2O	--	--	10.5	84
GoTaq MASTER MIX	10X	5X	12.5	100
PCR primer 1	10uM	0,2uM	0.5	4
PCR primer 2	10uM	0,2uM	0.5	4
DNA	--	--	1	--
Volumen total			25ul	192ul

2) Añadir a cada tubo 1ul de del DNA extraído mediante el Kit Comercial ***Wizard®Genomic DNA Purification Kit y.*** Hay que recordar que también se deben

preparar un control negativo, el cual debe contener los componentes de la reacción sin incluir el DNA.. (Jolley & Maiden, 2010)

3) Colocar los tubos de reacción en el termociclador, teniendo en cuenta la correcta posición de los mismos y asegurando que estos estén tapados de manera correcta; una vez listos se asegura la tapa del equipo y se inicia la corrida de acuerdo a las siguientes condiciones para cada ciclo: (Jolley & Maiden, 2010)

Condiciones del termociclador para MLST de Kpn

Temperatura (ºC)		Tiempo
94		2 min
94	**35 ciclos**	20 s
50		30 s
72		30 s
72		5 min

La temperatura de annealing debe establecerse para cada set de primers, pero generalmente se trabaja con temperaturas óptimas de entre 55-60ºC (T_m values >60°C). (Jolley & Maiden, 2010)

5) Después de concluido el procedimiento, se revisara el producto amplificado mediante la realización de la corrida electroforética de un gel de agarosa al 2%, en el cual se trabajará con 5ul de cada reacción. (Jolley & Maiden, 2010)

Anexo 12 PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN MEDIANTE EL USO DE: PureLink® Genomic DNA Mini Kit

Procedimiento

LISIS CELULAR

- Preparar una suspensión bacteriana de hasta $2x10^9$células de un cultivo de 24 horas. Centrifugar.
- Resuspender el pellet celular 80 µL PureLink® Genomic Digestion Buffer. Añadir 20uL de Proteinasa K. Mezclar por vortex.
- Incubar a 55ºC durante un periodo de 2 horas. Mezclar ocasionalmente durante el periodo de incubación.
- Agregar 20uL de RNAasa, mezclar mediante vortex y dejar incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 200uL de PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer, mezlar bien hasta obtener una solución homogénea.
- Añadir 200uL de etanol del 96-100% hasta completar el proceso de lisis. Mezclar mediante vortex durante 5 segundos.

UNIÓN DE DNA

- Colocar el contenido en una columna, y esta a su vez en un tubo colector.
- Añadir PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer and etanol.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Descartar el tubo colector y reemplazarlo por uno limpio.
- LAVADO DE DNA
- Añadir 500uL del Buffer Wash 1, al cual se le adicionó etanol.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Añadir 500uL del Buffer Wash 2, al cual se le adicionó etanol previamente.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 3 minutos a temperatura ambiente. Descartar el tubo colector.

ELUCIÓN DE DNA

- Colocar la columna en un tubo estéril de 1.5mL
- Centrifugar a 14 000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Añadir 100uL de PureLink®Genomic Elution Buffer. Incubar a temperatura ambiente.
- Centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Almacenar el producto de la extracción a -20ºC. (Mehta, 2012)

Anexo 13 PROTOCOLO DE PURIFICACIÓN MEDIANTE EL USO DE: Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin

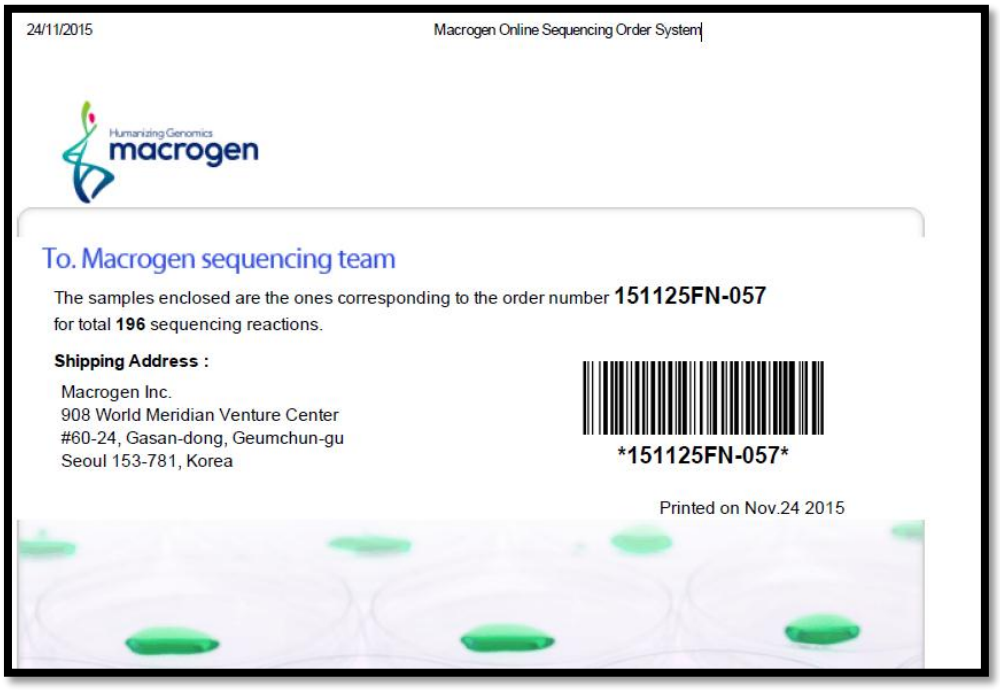
Procedimiento

- Preparar la solución "Membrane Wash": Añadir 375 ml de Etanol 95%, este volumen se coloca de acuerdo al número de reacciones del kit, en este caso es de 250.
- Colocar igual volumen de amplicón y de la solución "Membrane Binding": 15uL Amplicón + 15uL de solución "Membrane Binding".
- Transferir el volumen total de cada muestra a una minicolumna contenida en un tubo colector de 1.5ml. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto. Descartar el residuo del tubo colector.
- Lavar la columna añadiendo la solución "Membrane Wash", la cual fue previamente reconstituida.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto. Descartar el residuo del tubo colector.
- Colocar 500ul de "Membrane Wash" en cada columna y Centrifugar a 14 000 rpm durante cinco minutos.
- Añadir 50ul de agua libre de nucleasas, directamente en la columna, con la precaución de no tocar la membrana con la punta de la pipeta. Incubar a temperatura ambiente durante 1 min uto.
- Centrifugar a 14 000 rpm durante un minuto.
- Descartar la columna y el DNA purificado almacenar de 4ºC o -20ºC.
- (Wizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System Technical Bulletin TB308, 2014)

Anexo 14 PROTOCOLO DE PREPARACIÓN Y ENVIO DE MUESTRAS PARA SECUENCIACION: MACROGEN

Procedimiento

- Crear un documento en EXCEL-97, el cual contenga el mismo código del tubo transportador del producto de PCR amplificado, además de las secuencias Forward y Reverse de cada gen.
- Ingresar a la página de MACROGEN: http://dna.macrogen.com/eng/order/ces/std/s_new_step1.jsp y llenar el formulario establecido para la orden.
- Importar el archivo de Excel y revisar el número de muestras a ser testeadas.
- Ingresar en la opción Revisar y posteriormente modificar, en caso de ser necesario, la sección de los primers Forward y Reverse.
- Para el envío se lo realiza mediante la empresa FEDEX, el paquete de envio debe contener los amplicones purificados colocados en tubos de 1.5mL, los cuales deben estar rotulados con el número de muestra y el gen en la tapa del tubo, el cual se encuentra sellado con parafilm. Se debe incluir la orden generada dentro del paquete de envío.
- (Guía para la presentación de muestras para secuenciación de genomas , 2011)

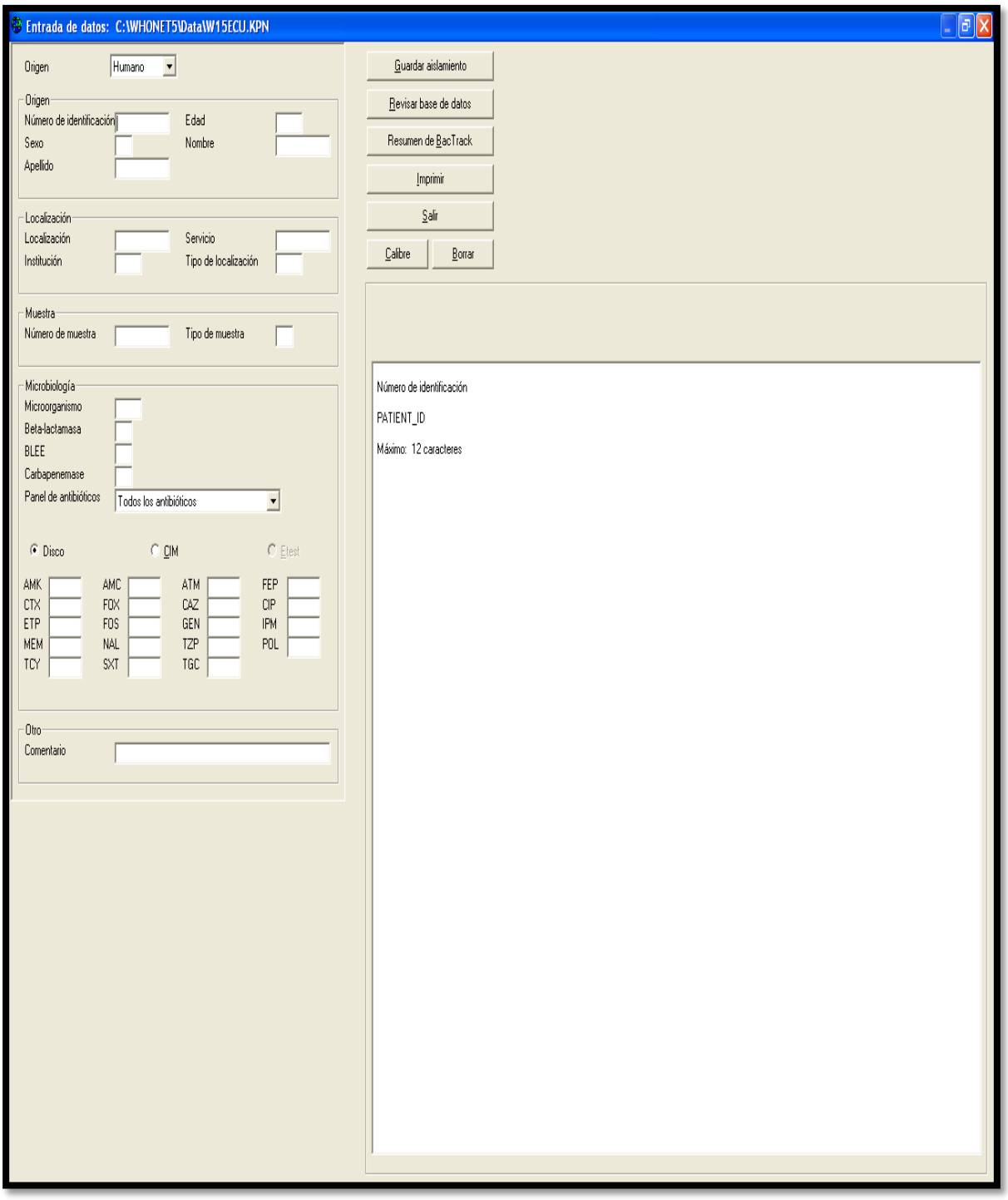


Anexo 15 MATRIZ DE TRABAJO EXCEL

INFORMACION GENERAL CEPAS										*PRUEBAS BIOQUÍMICAS*						
No.	***CÓDIGO***	***BACTERIA***	***ORIGEN***	***SALA HOSP.***	***RESISTENCIA***	***CASA DE SALUD***	***EDAD***	***SEXO***	***INVASIVA***	***CIT***	***KLIG***	***LIA***	***SIM***	***UREA***	***MR***	***VP***

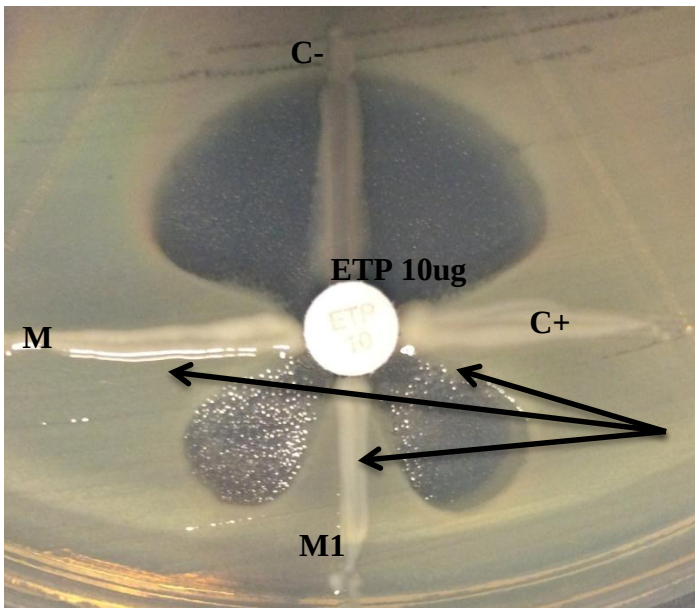
ANTIBIOGRAMA																			**TIPO DE RESISTENCIAS**			
AMC	***CTX***	***CAZ***	***AC. BOR.***	***IMP***	***MER***	***EDTA***	***FOX***	***FEP***	***TPZ***	***ETP***	***SXT***	***ATM***	***TE***	***AK***	***CN***	***NA***	***CIP***	***PB***	***TIG***	***SINERGIA BLEE***	***SINERGIA KPC***	***SINERGIA MBL***	***SINERGIA AmpC***

Anexo 16 MATRIZ DE TRABAJO WHONET 5.6



7. GRÁFICOS

Gráfico 11 Detección de carbapenemasas mediante el Test de Hodge Modificado (THM) en aislados de *Kpn*-KPC.

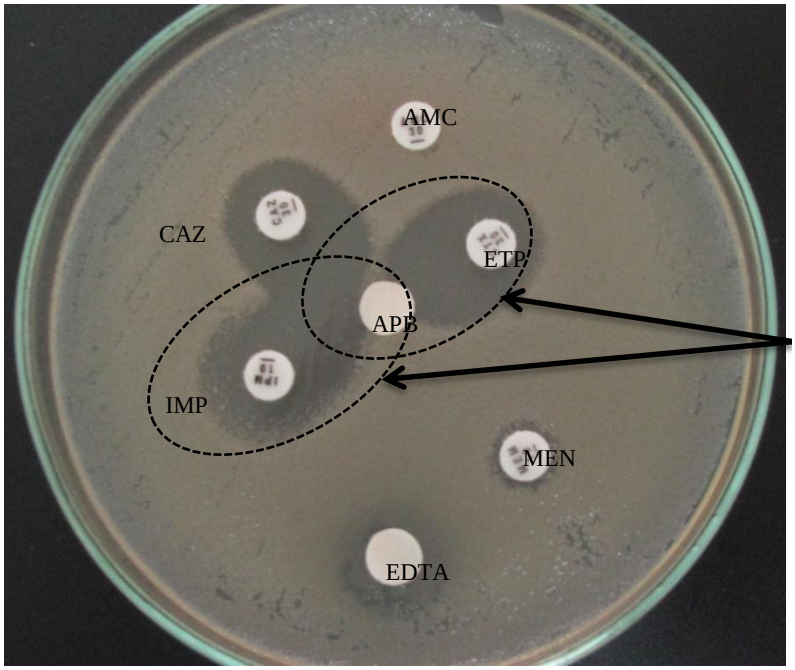


Inhibición del carbapenémico por cepas productoras de carbapenemasas

El gráfico representa los resultados obtenidos de las 80 cepas analizadas en este estudio, identificándose como "Positivos" para la producción de carbapenemasas, cuando se observa crecimiento bacteriano de la cepa *E. coli* ATCC 25922 alrededor de las cepas problema (M1, M2). C-: Control Negativo; C+: Control positivo; M1 y M2: Muestras positivas para producción de carbapenemasas.

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

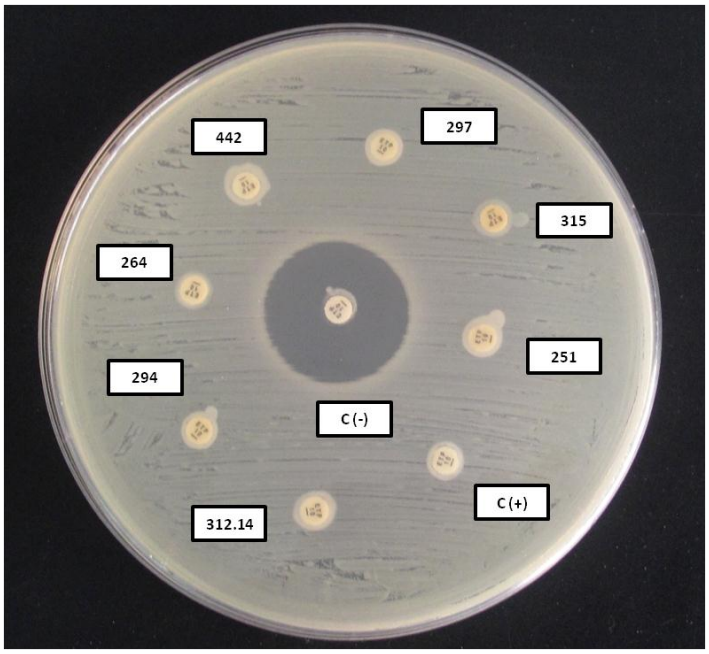
Gráfico 12 Detección de serín-carbapenemasas por el Test de Ácido 3 amino-fenilborónico (APB) en asilados de *Kpn*-KPC



Se observa agrandamiento del halo de inhibición entre los carbapenémicos (ETP, IMP) y el APB (200ug/disco) cuando se colocan a 1,5cm de distancia centro a centro.AMC: Amoxicilina/Ác. Clavulánico; ETP: Ertapenem; MEN: Meropenem; EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; IMP: Imipenem; CAZ: Ceftazidima; APB: Ácido borónico.

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

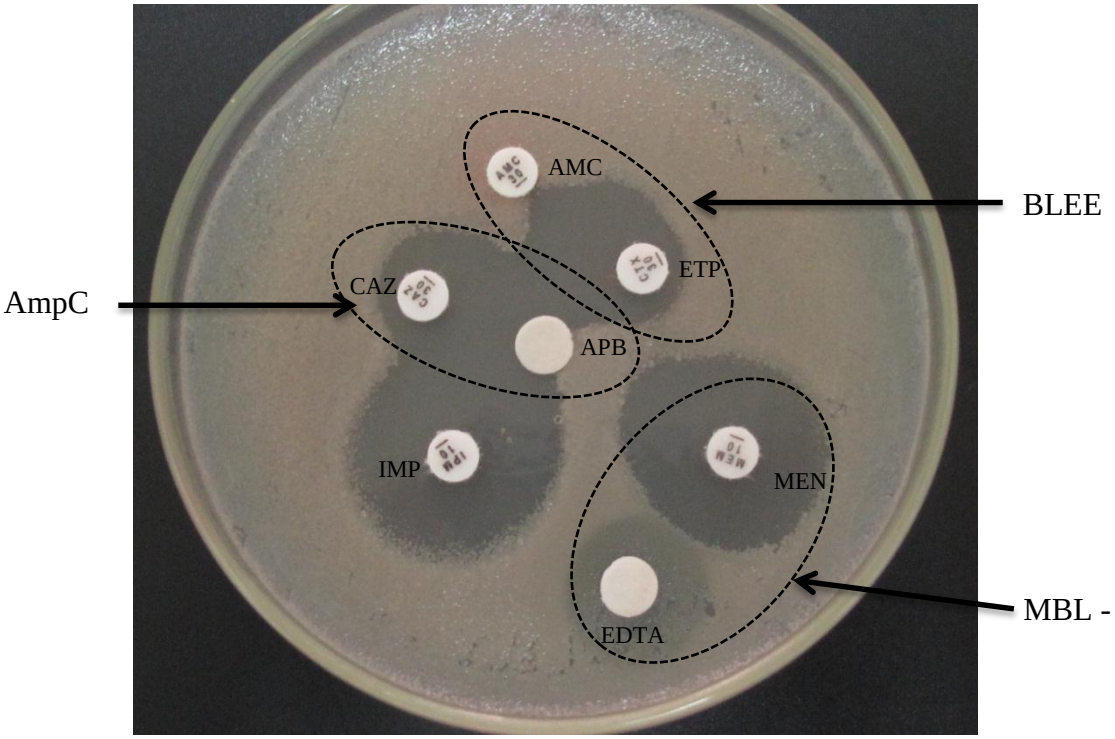
Gráfico 13 Método de Inactivación de Carbapenémicos (CIM) para la detección fenotípica de carbapenemasas en asilados de *Kpn*-KPC



Se identifica la producción de carbapenemasas cuando se observa un halo cerrado del carbapenémico en una placa inoculada con una cepa sensible (*E. coli* ATCC 25922). Muestras testeadas por CIM: 297,325,252,312.14,294,264, 442; C(+): control positivo; C(-): Control negativo.

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016

Gráfico 14 Detección fenotípica de beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), Cefalosporinasas (AmpC), Métalo beta-lactamasas (MBL)



La identificación fenotípica de BLEE se consideró positivo cuando se observó sinergia entre el AMC y las Cefalosporinas de 3ra generación (CAZ, CTX). La identificación de AmpC se determinó cuando existía sinergia entre las cefalosporinas de 3ra generación (CAZ, CTX) y el APB. No se identificó producción de MBLs en las cepas analizadas ya que no se observó sinergia entre los carbapenémicos (IMP, MEN) y el EDTA. AMC: Amoxicilina/Ác. Clavulánico; ETP: Ertapenem; MEN: Meropenem; EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético; IMP: Imipenem; CAZ: Ceftazidima; APB: Ácido borónico.

ELABORADO POR: C. SATAN Y R. TAMAYO, 2016