

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Klebsiella pneumoniae* DURANTE UN BROTE HOSPITALARIO EN MADRE DE DIOS, PERÚ

PHENOTYPIC IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Klebsiella pneumoniae* DURING A HOSPITAL BREAK IN MADRE DE DIOS, PERU

Jesús Rojas-Jaimes^{1,2,3}

RESUMEN

Klebsiella pneumoniae es una bacteria ampliamente involucrada en las infecciones nosocomiales y que puede tener un amplio espectro de colonización. Se realizaron tres aislamientos de hemocultivos provenientes de pacientes febriles hospitalizados con fines de identificar fenotípicamente el agente etiológico, así como estudiar la epidemiología molecular de estos empleando electroforesis en campo pulsado. Adicionalmente, se muestrearon zonas inanimadas donde estaban hospitalizados los pacientes febriles. Se pudo identificar en las tres muestras a *Klebsiella pneumoniae*, productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), y por electroforesis de campo pulsado se identificó a dos clonas idénticas y una con perfil muy similar. En las zonas inanimadas (silla de ruedas y cama) se pudo aislar a *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente. El brote se pudo controlar usando antibióticos de la familia de carbapenem. Se trata del primer estudio datado en este hospital de un brote causado por *Klebsiella pneumoniae* BLEE positiva, lo que enciende el sistema de alarma en la contención y prevención de brotes.

Palabras claves: *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamasas de espectro extendido, brote, epidemiología molecular

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a bacterium widely involved in nosocomial infections that can colonize a broad spectrum of media. Three isolates of blood cultures from hospitalized febrile patients were used to identify the etiological agent phenotypically as well as to study the molecular epidemiology of these patients using pulsed field electrophoresis. Additionally, inanimate areas were sampled where febrile patients were hospitalized. *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases (BLEE) and *Klebsiella pneumoniae* were identified in the three samples and by pulsed-field electrophoresis two identical clones were identified and one with a very similar profile in the inanimate zones (wheelchair and bed) *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* could be isolated respectively. The outbreak could be controlled using antibiotics of the carbapenem family and is the first study dated in this hospital from an outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* BLEE positive, which triggers the alarm system in the containment and prevention of outbreaks.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, extended-spectrum β -lactamases, outbreak, molecular epidemiology

¹ LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR. LIMA, PERÚ.

² ÁREA DE EPIDEMIOLOGÍA DEL HOSPITAL NACIONAL SANTA ROSA. MADRE DE DIOS, PERÚ.

³ INTELIGENCIA SANITARIA, DIRECCIÓN DE SALUD DE MADRE DE DIOS. MADRE DE DIOS, PERÚ.

I. INTRODUCCIÓN

Entre los organismos que están más involucrados en la sepsis nosocomial se encuentran las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y, en especial, las del género *Klebsiella* sp. resistentes a los β -lactámicos —resistencia mediada por las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), que son transportadas por plásmidos—, lo que les da la capacidad de provocar cuadros graves a nivel clínico (1). Las β -lactamasas son enzimas capaces de hidrolizar las aminopenicilinas, cefalosporinas y monobactames, aunque no los carbapemenes ni las cefamicinas (2). El primer caso de BLEE fue reportado en Alemania en 1983, en un aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* resistente a cefotaxima, la primera cefalosporina de tercera generación, y el primer reporte en América Latina ocurrió en Chile, en un proceso infeccioso originado por *Klebsiella pneumoniae*. En los últimos años, los casos se han incrementado a nivel mundial (2).

Es importante remarcar que la aparición de clonas productoras de BLEE se debe, probablemente, a tres mecanismos: selección de clonas resistentes por el uso intenso de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, o de ciprofloxacina; el uso previo de antibacterianos y la transferencia de resistencia a los β -lactámicos, tales como aminoglucósidos, cloranfenicol, viejas tetraciclinas y trimetoprima-sulfametoxazol; y, finalmente, fallas en las medidas de barrera donde existe transmisión horizontal (2).

Los brotes pueden ser causados por componentes monoclonales y policlonales, lo que hace necesario un estudio epidemiológico, aunque se describe que la mayoría se origina por organismos policlonales (2, 3). Entre las medidas de control están el aislamiento estricto, la limpieza del personal y la desinfección medioambiental (3).

Es importante remarcar que existen casos en los que la fuente de contaminación es extrínseca, como el personal de limpieza del centro hospitalario o medicamentos parenterales (3, 4).

Debido a la creciente diseminación de microorganismos resistentes a los antibióticos a nivel hospitalario, se hace necesario fortalecer la capacidad de vigilancia epidemiológica de los laboratorios para la detección y control de la resistencia mediante el uso de herramientas moleculares (5). Entre las ventajas del uso de las herramientas moleculares están la sensibilidad y especificidad, además de su importancia para los estudios de caracterización molecular al permitirles obtener información detallada sobre el comportamiento, evolución y diseminación de microorganismos de importancia en salud pública, con el objetivo de controlar brotes (5).

En el caso de *K. pneumoniae*, esta bacteria puede causar una amplia gama de infecciones en diferentes tejidos y es, además, un agente que desarrolla resistencia a los antibióticos, lo que causa una prolongación de la estancia hospitalaria y eleva la morbimortalidad (6). Un caso interesante a la resistencia fue el reportado en Colombia, donde se aislaron 2 cepas resistentes a carbapenemasas; sin embargo, fueron BLEE negativas (6). Esta bacteria resiste la desecación y sobrevive en la piel debido a su cápsula hidrofílica; dicha cápsula, además, le sirve a la bacteria para evitar la fagocitosis por los polimorfos nucleares y macrófagos (6).

El objetivo del presente estudio es identificar el agente causal de un brote febril en pacientes hospitalizados, estudiar la resistencia a los fármacos de los aislamientos y realizar una relación epidemiológica de las cepas involucradas,

mediante estudios moleculares, con el fin de tratar correctamente y prevenir brotes sucesivos a nivel hospitalario.

II. METODOLOGÍA

SELECCIÓN DE PACIENTES Y TOMA DE MUESTRA

Pacientes del servicio de cirugía con cuadros febriles entre 37,8 °C y 40 °C, con diagnósticos de ingreso por herida traumática y celulitis. Finalmente, se procede a la toma hemocultivos

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Se realizó mediante métodos convencionales y por kit de identificación API 20E.

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DISCO DIFUSIÓN

Se siguió el método descrito por el CLSI-2015. La detección del mecanismo de resistencia de BLEE se realizó de acuerdo con la Sociedad Francesa de Microbiología, y la de Amp C, de acuerdo las recomendaciones del Instituto Carlos Malbrán de Argentina (2).

MÉTODOS MOLECULARES

Se empleó la técnica de electroforesis de campo pulsado (PFGE), considerada

la técnica “estándar de oro” en la genotipificación de muchas bacterias patogénicas.

Para la genotipificación de los aislamientos hospitalarios se utilizó la técnica PFGE, de acuerdo con los procedimientos operativos estándar (POE) del LBBM-INS.

Para la determinación de clonalidad (los aislamientos pertenecen a una misma cepa) y relación genética de los aislamientos, se compararon los perfiles genéticos obtenidos por la técnica de PFGE.

TOMA DE MUESTRAS AMBIENTALES

Las muestras fueron tomadas con hisopos estériles con solución salina estéril, para su inmediata siembra en agar sangre y Mac Conkey. Se recogieron muestras de los veladores de cama, tensiómetros, sillas de ruedas y coches de medicamentos del servicio de cirugía, la sala de operaciones y la sala de partos. Los fenotipos bacterianos fueron identificados mediante métodos bioquímicos.

III. RESULTADOS

Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en la siguiente tabla:

TABLA 1. AISLAMIENTOS IDENTIFICADOS POR EL INS

Código hospital	Código NetLab	Código Lab. de IRAS-IIH/INS	Muestra	Especie identificada INS
2765	IIH-190-11	IIH-190-11	Sangre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2766	IIH-191-11	IIH-191-11	Sangre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
2767	IIH-192-11	IIH-192-11	Sangre	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

De acuerdo con el perfil del antibiótico, los aislamientos de *K. pneumoniae* presentaron perfiles de susceptibilidad antimicrobiano similares (tabla 2). Las

muestras se remitieron al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular (LBBM) para los análisis respectivos.

TABLA 2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS TRES AISLAMIENTOS DE *K. PNEUMONIAE* PROCEDENTES DEL HOSPITAL SANTA ROSA, PUERTO MALDONADO

COD. LAB	CXM	CHL	GEN	IMP	MRP	CIP	NAL	AMK	AMC	ATM	CF	CFX	SFP	CTX	FOX	CAZ	FEP
IIH-190-11	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
IIH-191-11	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	-	R	R	R	S	R	R
IIH-192-11	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R

CXM, CEFUROXIMA; CHL, CLORANFENICOL; GEN, GENTAMICINA; IMP, IMPENEM; MRP, MEROPENEM; CIP, CIPROFLOXACINA; NAL, Ac. NALIDIXICO; AMK, AMIKACINA; AMC, AMOXICILINA/Ac. CLAVULANICO; ATM, AZTREONAM; CF, CEFALOTINA; CFX, CEFIXIME; SFP, CEFOPERAZONA-SULBACTAM; CTX, CEFOTAXIMA; FOX, CEFOXOTINA; CAZ, CEFTAZIDIME Y FEP, CEFEPIME

Mediante el análisis de los mecanismos de resistencia, según la Sociedad Francesa de Microbiología (sinergia) para la detección de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), se determinó que las tres cepas fueron productoras de esta enzima. Así mismo, mediante las recomendaciones del Instituto Carlos Malbrán, no se detectó la presencia de AmpC en ninguna de las tres cepas en referencia. Como resultado de los análisis de genotipificación por PFGE se obtuvieron perfiles genéticos comparables entre los aislamientos.

Se observó que los aislamientos 190 y 191 presentaron un mismo perfil genético de PFGE, y el aislamiento 192 presentó un perfil muy similar al primero, pero con una banda de diferencia, lo cual indica que los aislamientos 190 y 191 provienen de una misma cepa, mientras que 192 es una cepa diferente de la primera, pero muy relacionada genéticamente.

Respecto de los aislamientos relevantes en salud pública aislados de superficies inanimadas, se pudo identificar a *Staphylococcus aureus* en las manijas de la cama 22 y a *K.pneumoniae* en las manijas de la silla de ruedas, ambos del servicio de cirugía.

DISCUSIÓN

Klebsiella pneumoniae es una bacteria frecuentemente aislada en los brotes nosocomiales —en especial, cuando estas unidades se encuentran hacinadas, como ocurre en muchas de nuestro país— y que produce altas tasas de morbimortalidad (1, 2).

Los aislamientos de *Klebsiella pneumoniae* a nivel hospitalario pueden provenir de aspirado traqueal, orina, sangre, punta de catéter y herida quirúrgica (2). En nuestro estudio, todos los aislamientos provinieron de sangre en un proceso de bacteriemia hospitalaria.

Los cultivos de las secreciones o tejidos son de vital importancia para el control del brote, ya que con ellos se conoce el patrón fenotípico frente a las drogas del agente etiológico, con lo que se puede emplear la antibioterapia correcta (3). En el uso de la antibioterapia es importante remarcar su tiempo y las comorbilidades del paciente, y los carbapemenes son los más usados contra las cepas productoras de BLEE (2). Como se muestra en el estudio del fenotipado, todas las cepas aisladas fueron BLEE positivas, lo que hace suponer un uso frecuente y desmedido de algunos antibióticos. En

contraste, fueron sensibles a imipenem, meropenem y cefoxotina, por lo que el brote pudo ser controlado con el uso de antibióticos de la familia carbapenem.

Es importante señalar que *K. pneumoniae* es capaz de desarrollarse en diferentes medios, incluso en medicamentos parenterales como la albúmina, por lo que se debe realizar una capacitación y fiscalización de la preparación de medicamentos y su correcto desecho (4). Como medidas de prevención en el sistema de salud están la restricción de cefalosporinas de tercera y cuarta generación, y las fluoroquinolonas (2). Un estudio previo demostró que el uso de cefalosporinas de tercera generación o fluoroquinolonas, generalmente la ciprofloxacina, son factores de riesgo para el desarrollo de una cepa BLEE (2). Por tanto, se hacen necesarios una capacitación y un empoderamiento constantes del personal de salud.

El empleo de las herramientas moleculares como la electroforesis en gel de campo pulsado es de mucha utilidad para la vigilancia epidemiológica a fin de evaluar la diseminación de microorganismos de interés en salud pública (5). Como se pudo observar en nuestra investigación, dos clonas eran idénticas, lo que demuestra un trazo epidemiológico y transferencia probablemente por parte del personal de salud que se contaminó y no se realizó el lavado de manos adecuado. La clona diferente tuvo un perfil de bandas similar, lo que hace suponer que puede estar vinculada al mismo nicho. Además, todas fueron multidrogoresistentes, lo que enciende el sistema de alarma para la prevención del uso inadecuado de antibióticos y la toma extrema de medidas de limpieza y bioseguridad.

Un estudio previo realizado en un centro hospitalario de Colombia dio a conocer el primer caso de *K. pneumoniae* resistente

a carbapenémicos en un paciente con una infección de sitio operatorio (5), y determinó los procesos quirúrgicos como un factor de riesgo para la infección por agentes nosocomiales multidrogoresistentes. Es importante destacar que los pacientes en el presente estudio pasaron por procesos en las salas quirúrgicas, en donde existe un riesgo latente de infecciones nosocomiales por el contacto constante con los pacientes, como ocurrió en este caso. Está demostrado que las infecciones por *K. pneumoniae* del sitio operatorio son una de las más frecuentes, siendo el antecedente de cirugía un factor de riesgo para las infecciones desarrolladas (5).

Es de suma importancia investigar a los pacientes de donde se aísla y el agente etiológico multidrogoresistente (5). Los factores a estudiar intrínsecos del paciente son transferencia hospitalaria, uso de antibioterapia anterior y actual, migración (país-región), unidad en la que se encuentra, género, edad y comorbilidades. En el caso del agente etiológico, se recomienda estudiar cuantificación, colonización, infección, virulencia y resistencia a los antibióticos.

Un estudio previo en Colombia determinó que *K. pneumoniae*, productora de BLEE, estaba involucrada en el 22,3 % de infecciones en UCI y el 20,1% en otros servicios (6), lo que es una constante en los centros hospitalarios donde no se toman las medidas de bioseguridad correctas.

Es importante remarcar que *K. pneumoniae* ha demostrado su alto porcentaje de colonización en las personas y esto se incrementa en la hospitalización; además de su capacidad para ser viable por largo tiempo a nivel hospitalario, así como en las manos de las personas, lo que permite su frecuente transmisión (6). Por tanto, se presupone una contaminación de las zonas inanimadas como la silla de ruedas de

donde se aisló *K. pneumoniae* con un flujo hacia el personal de salud y de este a los pacientes.

En conclusión, los tres aislamientos del brote se identificaron como *Klebsiella pneumoniae*, se detectaron fenotipos similares con base en los resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, y los tres aislamientos de *K. pneumoniae* resultaron portadores de BLEE. No se detectó la presencia de AmpC.

Los aislamientos IIH-190-11 e IIH-191-11 provienen de una misma cepa o clon de

K. pneumoniae. El aislamiento IIH-192-11 proviene de una cepa de *K. pneumoniae* diferente, pero muy relacionada genéticamente, por lo que se presume la existencia de por lo menos dos focos de contaminación geográficamente diferentes.

Se debe realizar una búsqueda activa, sostenida y programada de *K. pneumoniae* BLEE+ para evitar infecciones y brotes nosocomiales, así como afianzar las medidas de limpieza de zonas inanimadas, como manijas de sillas de ruedas y camas, y mejorar la bioseguridad capacitando en el lavado de manos al personal involucrado, con el fin de prevenir brotes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. González C, Gil F, Solórzano M, Cruz J, Puig J, Suárez M, Nieves B. Brote por *Klebsiella pneumoniae* multirresistente y productora de β -lactamasa de espectro extendido en una unidad de alto riesgo neonatal. Rev Chil Infectol. 2011; 28 (1): 28-34.
2. Casellas J, Nannini E, Radice M, Cocconi E, Lejona S, Notario R, Truscillo M, et al. Estudio de un brote debido a aislados de *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en un centro asistencial de Rosario - Argentina. Rev Panam Infectol 2005; 7 (4): 21-7.
3. Bustos-Moya G, Josa-Montero D, Perea-Ronco J, Gualtero-Trujillo S, Ortiz-Aroca J, Novoa-Bernal Á, et al. Factores relacionados con el control exitoso de un brote por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC-2 en una unidad de cuidado intensivo en Bogotá, Colombia. Infectio. 2016; 20 (1): 25-32.
4. Hernández-Delgado L, Pallares-Trujillo VC, Moncada-Barrón D, Arroyo-Escalante S, Flores-Nava G, Lavalle-Villalobos A. Brote por *Klebsiella pneumoniae* causado por contaminación extrínseca. Bol Med Hosp Infant Mex. 2007; 64 (6): 377-83. Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=29990952&lang=es&site=ehost-live>
5. Ocampo AM, Vargas CA, Sierra PM, Cienfuegos AV, Jiménez JN. Caracterización molecular de un brote de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos en un hospital de alto nivel de complejidad de Medellín, Colombia. Biomédica 2015; 35 (4): 24.
6. Echeverri LM, Cataño JC. *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. IATREIA 2010; 23 (3): 240-9.

RECIBIDO: 20/09/2016

ACEPTADO: 27/11/2016

AUTOR: JESÚS ROJAS-JAIMES

CORRESPONDENCIA: jesus.rojas.jaimes@gmail.com