

31. Salud Humana

Factores de virulencia y patrones clínicos de múltiples clones de *Klebsiella pneumoniae* hiper mucoviscosos productores de KPC-2

Vargas, Juan Martín; Juan.martin.vargas@hotmail.com; Moreno Mochi María Paula; paumorenomochi@hotmail.com; Orientadora: Jure, María Angela; magejure@gmail.com ;
Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia
Universidad Nacional de Tucumán

Resumen

La diseminación de *K.pneumoniae* productora de carbapenemasas es un gran problema de salud pública. El objetivo de este trabajo fue caracterizar aislamientos clínicos productores de KPC de un hospital en Tucumán, Argentina. Caracterizamos 35 aislamientos de *K.pneumoniae* resistentes a carbapenemes. La hiper mucoviscosidad se determinó por String Test. Las carbapenemasas y BLEE fueron detectadas por Multiplex PCR y secuenciación. Los factores de virulencia se determinaron por Multiplex PCR.

Las cepas mostraron resistencia a β -lactámicos y Ciprofloxacina y resistencia parcial a Gentamicina(91.43%), TMS(88.57%), Tigeciclina(6%), y Fosfomicina(6%). Confirmamos la presencia de *bla*_{KPC-2}. La distribución de BLEE resultó: SHV(n=5), CTX-M-Universal(n=17), SHV/CTX-M(n=4) y 9 cepas negativas. Se detectaron 17 patrones por PFGE correspondientes a 10 secuenciotipos; se observó predominio de ST25 y 4 aislamientos no registrados. La incidencia fue de 0.290 cada 1000 pacientes hospitalizados. La caracterización de los factores de virulencia identificó fimbrias(97.14%), sideróforos(94.29%) y factores de resistencia a la fagocitosis(74.28%). 68.57% de los aislamientos fueron serotipo capsular K2 y 31.43% fueron No Tipificables.

Este es el primer estudio de caracterización de *K.pneumoniae* hiper mucoviscosas KPC-2 en esta región; nuestros hallazgos no indican correlación entre la asociación de factores de virulencia, resistencia a carbapenemes, tipos de infección y tipo clonal en las cepas estudiadas.

Palabras clave: KPC, hiper mucoviscosidad, virulencia, secuenciotipo

Introducción

K.pneumoniae es la bacteria Gram negativa líder en infecciones adquiridas en hospitales (Holt et al., 2015), considerada en un principio como el agente causal más importante de infecciones adquiridas en la comunidad; a mediados de 1970 la epidemiología y el espectro de infecciones causadas por este microorganismo cambiaron drásticamente cuando esta bacteria se estableció en el ambiente hospitalario (Tzouveleki et al., 2012). Las cepas hipermucoviscosas difieren de los aislamientos mucosas clásicas en que las colonias cultivadas en placas de agar presentan un string test positivo. Este fenómeno implica una señal entre el fenotipo capsular y las cepas hipermucoviscosas; actualmente se considera que este fenotipo contribuye significativamente a la virulencia de *K.pneumoniae* en infecciones invasivas (Catalán-Najera, 2017). Las β -lactamasas que hidrolizan los carbapenemes han incrementado su diseminación alrededor del mundo. Las clases moleculares de Ambler A (KPC), B (VIM, IMP, NDM) y D (OXA-48) son los tipos más comúnmente encontrados en *K.pneumoniae* aisladas de infecciones nosocomiales (Nordmann P, 2011). Las cepas de *K.pneumoniae* patógenas pueden causar un amplio rango de infecciones en pacientes hospitalizados, como neumonía, infección de heridas,

partes blandas, o infecciones del tracto urinario (Holt et al., 2015; Podschun R, Ullmann U, 1998). Si bien estas cepas llevan genes de virulencia asociados los cuales codifican elementos capsulares (*magA*, *k2A*, *rmpA*), resistencia a la fagocitosis (*uge*, *ycfM*, *Wca6*), fimbrias (*fimH*, *mrkD*, *kpn*), sideróforos (*entB*, *iroN*, *iutA*) y otros genes asociados a estructuras de pared (*WabG*), al metabolismo de alantoína (*allS*), proteínas líticas de glóbulos rojos (*hly*) y una citotoxina (*cnf-1*) aún no está claro como estos genes están asociados al tipo de infección, la resistencia a los antibióticos y el tipo clonal. Se describen diferentes tipos clonales asociados a la diseminación de *bla*_{KPC} en *K.pneumoniae* alrededor del mundo [6]. En Latinoamérica predominan los tipos clonales ST11 y ST437 asociados a la diseminación de *bla*_{KPC-2} y *bla*_{KPC-3} (Andrade et al., 2015; Castanheira et al., 2012; Gomez et al., 2011); en Argentina, a la fecha el tipo clonal dominante es ST 258/*bla*_{KPC-2}.

Objetivos

El objetivo de este estudio fue determinar las características clínicas y epidemiológicas de las cepas de *K.pneumoniae* hipermucoviscosas resistentes a carbapenemes causantes de infecciones nosocomiales en un Hospital de tercer nivel de Tucumán.

Materiales y Métodos

Estudio propuesto y diseño

Este estudio retrospectivo se llevó a cabo en el Hospital Ángel C. Padilla, Tucumán, Argentina; hospital-escuela de tercer nivel polivalente, centro de referencia provincial y regional, destinado a la atención de pacientes (mayores de 14 años) en estado crítico y con patologías agudas. Durante un periodo de 6 meses, comprendido entre el 1 de mayo y el 31 de octubre de 2014 se estudiaron todos los pacientes con infecciones por *K.pneumoniae* resistentes a carbapenemes internados en el nosocomio por un periodo mayor a 48 horas; no fueron incluidos en este estudio pacientes de otros nosocomios, con infecciones adquiridas en la comunidad y/o que no cumplieran con criterios estrictos de infección. Los pacientes que cumplieron estrictamente los criterios de inclusión fueron seleccionados luego de firmar el consentimiento informado. Se accedió a la historia clínica y se elaboró una ficha clínico-epidemiológica en la que se registraron las siguientes variables: código de nombre y apellido, edad, sexo, tiempo de internación previo al aislamiento, permanencia en el hospital, comorbilidades, sitio probable de adquisición de la infección, tipo de infección y tipo de tratamiento antibiótico utilizado.

Identificación bacteriana y Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana

La identificación bacteriana se realizó mediante técnicas de caracterización fenotípica convencionales y el sistema automatizado Vitex2® (BioMerieux, Merci l'Etoile, France); se confirmaron utilizando MALDI TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight) (Microflex LT, Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Se ensayaron 14 antibióticos incluyendo Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Piperacilina/Tazobactam, Cefalotina, Cefotaxima, Ceftazidima, Cefepime, Meropenem, Imipenem, Gentamicina, Amicacina, Colistin, Trimetoprima/Sulfametoxazol y Ciprofloxacina utilizando Vitek2® (BioMerieux, Merci l'Etoile, France) y los puntos de corte recomendados por CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) en las normas M100-24. Se evaluó la sensibilidad a Tigeciclina y Fosfomicina (Britania®) por el método de difusión con discos de Kirby-Bauer; los puntos de corte empleados para estos antibióticos fueron los indicados por EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Fueron utilizados como controles de calidad *E.coli* ATCC 25922 y *K.pneumoniae* 700603. Test de sinergia utilizando discos de ácido borónico y EDTA ubicados próximos a los discos de

carbapenemes. Para evidenciar fenotípicamente la presencia de carbapenemasas se realizó el Test de Hodge modificado según el protocolo desarrollado por Pasterán et al. 2009. Como microorganismo indicador de la resistencia se utilizó *E.coli* ATCC 25922 a partir de una suspensión al 0,5 MF y posterior dilución 1/10.

Detección de fenotipo hipermucoviscoso

Los aislamientos de *K.pneumoniae* resistentes a carbapenemes se cultivaron en agar nutritivo (Britania®) enriquecido con 5% de sangre desfibrilada, Agar Mac Conkey (Britania®) y CLED (Britania®) se incubaron a 37 ± 2 °C por 18-24 horas. Los aislamientos se consideraron positivos para el fenotipo hipermucoviscoso si al tocar la superficie de la colonia con un ansa de siembra se formaba un filamento de 5mm o más al levantar el ansa (Lee et al., 2006; Fang et al., 2004).

Selección de cepas

Se seleccionaron todos los aislamientos clínicos hipermucoviscosos que cumplieron los siguientes criterios: halos inferiores a 22 mm y valores de CIM ≥ 2 ug/ml para imipenem, meropenem, ertapenem; prueba de sinergia positiva con ácido borónico y prueba de Hodge positiva.

Caracterización de β -lactamasas

La confirmación molecular del tipo de carbapenemasa (KPC, NDH, VIM y OXA-48) y β - lactamasas (TEM, SHV, CTX-M) se realizó mediante PCR Multiplex (Esra Denis y Nilufer Aksoz, 2015). Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.8% utilizando buffer TAE 1X. Los productos de amplificación fueron posteriormente secuenciados con un analizador ABI3130CL (Applied Biosystems, EEUU).

Análisis de las regiones de los genes de virulencia

Para caracterizar los factores de virulencia se realizaron cuatro reacciones de multiplex PCR (Esra Denis y Nilufer Aksoz, 2015). Se estudiaron genes asociados a: resistencia a la fagocitosis (*uge*, *ycfM*, *Wca6*), fimbrias (*fimH*, *mrkD*, *kpn*), elementos capsulares (*magA*, *k2A*, *rmpA*), sideróforos (*entB*, *iroN*, *iutA*), estructuras de pared (*WabG*), metabolismo de alantoína (*allS*), proteínas (*hly*) y citotoxina (*cnf-1*). Los primers fueron combinados de forma tal que cada multiplex PCR contenía representantes de diferentes grupos, con productos resultantes de la amplificación fácilmente observables: **MixA** (*magA-fimH-uge-iutA*), **MixB** (*wabG-rmpA-cnf1-ycfM*), **MixC** (*hly-iroN-k2A-mrkD*) y **MixD** (*kpn-allS-entB-wcaG*). El ADN total se extrajo por boiling y posteriormente conservada a -20°C. Se

utilizaron 2.5 µL de ADN en una mezcla de reacción con volumen final de 50 µL. Esta mezcla contenía Buffer de PCR 1X (40 mM Tris-HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM KCl, 4 mM MgSO₄), 0,2 mM dNTP, 2 U de Taq Polimerasa y 2,5 µmol/L de cada primer. Las condiciones de ciclado fueron: 5 minutos de predesnaturalización a 95°C, seguida de 30 ciclos: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58 °C, 1 minuto a 72 °C y 10 minutos de elongación final a 72°C. Los productos de PCR se analizaron en un gel con 1,8% agarosa en TAE 1X, corrido 2 horas a 150 V.

Estructura poblacional

La caracterización molecular se realizó por electroforesis en campo pulsado (PFGE). El ADN genómico fue tratado con la endonucleasa de restricción *SpeI* (TaKaRa, Tokio, Japón), y los fragmentos separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1% SeaKem Gold (BioRad, USA) en buffer TBE 0,5X (45mM Tris, 45 mM ácido Bórico, 1,9 mM EDTA; pH 8.0) a 6 V/cm y 14^o alternando pulsos en un ángulo de 120^o cada 2,2-54,2 segundos por 20 horas. *Salmonella* entérica serovariedad Braenderup H9812 y Lambda Ladders (ProMega-Markers®) se utilizaron como marcadores de corte. El análisis de los fragmentos y la determinación de la relación entre los aislamientos se realizó con el software BioNumerics versión 8.0

(AppliedMaths, Kortrijk, Belgium). Los resultados fueron interpretados siguiendo los criterios de Tenover. Los aislamientos fueron considerados de un mismo clon (tipo) si ellos mostraban una identidad genética $\geq 70\%$, o menos de 4 fragmentos diferentes en los perfiles de PFGE. En cada uno de los aislamientos que presentaron diferentes pulsotipos se amplificaron siete genes conservados (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) mediante PCR y posterior secuenciación de los productos de amplificación según el protocolo descrito universalmente (Pasteur Institute, France). Las variables alélicas permitieron definir el secuenciotipo (ST) utilizando el banco de datos provisto por MLST.net.

Resultados y Discusión

Del estudio de la ficha clínico-epidemiológica; el 62% de los pacientes fueron del sexo masculino, 42.85% presentaron alguna comorbilidad, se encontraron distribuidos en todas las salas del hospital, siendo más frecuentemente aisladas en la Unidad de Terapia Intensiva (UTI) (45%) y Quirófano (15%). Las muestras correspondieron a: 28.57% muestras respiratorias (Espustos, BAL, miniBAL), 31.43% urinarias (micción espontánea, punción suprapúbica), 14.28% purulentos (secreciones, punciones del piel y partes blandas), 5.71% a hemocultivos y 20.01% otros tipos de

muestras (LCR, muestras óseas, Liq. de punción).

Se aislaron 46 cepas con sensibilidad disminuida/resistentes a carbapenemes, 35 de ellas cumplieron con los criterios estrictos de selección propuestos. Los 35 aislamientos seleccionados presentaron disminución de los halos a los carbapenemes en el método por difusión con discos e incremento en el valor de la CIM registrado en Vitek2®, sinergia positiva entre el ácido borónico y los carbapenemes ensayados. No se observó sinergia entre los carbapenemes y EDTA, lo cual descartó la presencia de metalo- β -lactamasas. El Test de Hodge resultó positivo en todos los aislamientos que demostraban sinergia entre el ácido borónico y los carbapenemes. Todos los aislamientos seleccionados demostraron el fenotipo hipermucoviscoso en los 3 medios de cultivo ensayados, principalmente en agar nutritivo enriquecido con sangre y CLED. Adicionalmente, los aislamientos mostraron resistencia a todos los β -lactámicos y ciprofloxacina, además de resistencia parcial a otros antibióticos: 91.43% a gentamicina, 88.57% de resistencia a Trimetoprima Sulfametoxazol, 6% a Tigeciclina, y 3% a Fosfomicina.

La confirmación molecular de carbapenemasas por multiplex PCR

resultó positiva para *bla*_{KPC} y negativa para *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} y *bla*_{NDM}. Se detectaron BLEE tipo SHV (n=5), CTX-M Universal (n=17) asociación entre SHV y CTX-M (n=4); y 9 cepas fueron negativas para BLEE. Todas las cepas fueron positivas a TEM-1. La caracterización molecular de los factores de virulencia resultó: fimbrias (97.14%), sideróforos (94.29%) y factores asociados a la resistencia a la fagocitosis (74.28%). El 68.57% de los aislamientos pertenecían al serotipo capsular K2 mientras que un 31.43% de los aislamientos fueron considerados No Tipificables (NT). Ningún aislamiento resultó positivo al serogrupo K1. Los determinantes de virulencia presentaron diferentes agrupamientos independientemente del tipo clonal. Se observaron 17 patrones diferentes de PFGE que correspondieron con 10 secuenciotipos; se observó un marcado predominio de ST25, seguido de ST 629, ST17, ST147, ST268, ST258, ST11, ST111, ST133, ST551 y 4 aislamientos cuyas combinaciones alélicas no se encuentran aún documentadas. La incidencia global de *K.pneumoniae* en el nosocomio productora de KPC-2 fue de 0.290 cada 1000 pacientes hospitalizados.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS), considera en Latinoamérica a Argentina como uno de los países con más especies "pandroga

resistentes" en aislamientos clínicos intrahospitalarios, cuando se compara con otros países de la región. Esta situación genera gran preocupación en salud pública ya que no se prevé la aparición de nuevos antimicrobianos. En nuestro país se vigila activamente la aparición y proporción de cepas de *K.pneumoniae* resistentes a carbapenemes. La diseminación de estas cepas asociada con resistencia a piperacilina/tazobactam, cefalosporinas de tercera y cuarta generación, fluoroquinolonas y aminoglucósidos es alarmante [9], resultados que coinciden con nuestro trabajo ya que las cepas de *K.pneumoniae* productoras de KPC-2 presentaron resistencia asociada con otros antibióticos y sensibilidad a colistina, tigeciclina y ampicacina.

En este estudio, un elevado porcentaje de pacientes presentaron comorbilidades y factores de riesgo asociados a la infección por *K.pneumoniae* productora de KPC-2, como internación prolongada y administración previa de antimicrobianos, resultados coincidentes con otros autores [18-20] en los cuales también identificaron la presencia de enfermedad severa y el uso previo de antimicrobianos, principalmente cefalosporinas y quinolonas, como factores de riesgo (Gasink et al., 2009; Cordova et al., 2012; Lucena et al., 2014). Falagas et al. 2007, llevaron a cabo un estudio

controlado y encontraron que las fluoroquinolonas y penicilinas anti-pseudomonas fueron factores de riesgo independientes en infecciones por *K.pneumoniae* resistentes a carbapenemes. Así, la transmisión nosocomial puede jugar un rol más crítico en la diseminación de *K.pneumoniae* resistente a carbapenemes que sólo la presión impuesta por el uso de antibióticos en nuestro hospital. El tiempo medio de internación previo a la adquisición de la infección fue de 30 días, que denota la elevada permanencia hospitalaria previa a la adquisición de la infección, similar a lo informado Cordova et al., 2012. La terapia intensiva fue el lugar de mayor frecuencia de adquisición de las *K.pneumoniae* productoras de KPC, habitualmente descrito (Lucena et al., 2014; Hoxha et al., 2016; Zheng et al., 2017; Lee et al., 2016), dada la mayor complejidad, el uso más frecuente de medidas invasivas y la utilización de antibióticos de amplio espectro. La sensibilidad a ampicacina y colistina en las cepas estudiadas fue mayor a la descrita por De Laveleye et al., 2017, dado que la totalidad de los aislamientos fue sensible a ambos antibióticos; en cuanto a la sensibilidad a tigeciclina (94%), ésta fue similar a la descrita por este grupo de trabajo (95.4%).

En la revisión de las historias clínicas se observó que los esquemas de

tratamientos empíricos aplicados apropiadamente fueron escasos (11.5%) por múltiples razones: multiresistencia de las cepas estudiadas, desconocimiento de la magnitud del brote por parte del personal médico y la falta de disponibilidad de otras opciones terapéuticas (tigeciclina y fosfomicina) en la farmacia del hospital.

En las infecciones por *K.pneumoniae* productora de KPC-2 predominaron las muestras respiratorias (12/35, 34.29%) y Orina (12/35, 34.29%), seguidas de purulentos (5/35, 14.28%); Bing Zheng et al., 2017, estudiaron 51 pacientes infectados *K.pneumoniae* productora de KPC y encontraron que las muestras predominantes fueron del tracto respiratorio (32/51, 62.7%) seguidas de hemocultivo (5/51, 9.8%) y tracto urinario (5/51, 9.8%), mientras que otros estudios refieren bacteriemia (Falagas et al., 2007) e infecciones del tracto urinario (Teo et al., 2012) como los principales sitios de infección.

Enfocados en la caracterización molecular de las cepas de este estudio, encontramos la emergencia de BLEE en las cepas productoras de KPC con marcado predominio de enzimas CTX-M, similar a Cantón et al., 2003; detectamos CTX-M-2 epidemiológicamente predominante en Argentina, mientras que en otros países como España predomina

CTX-M-15 (Cantón et al., 2003); con respecto a las carbapenemasas el 100% fueron *bla* KPC-2 a diferencia de otros países latinoamericanos que presentan KPC-2 y KPC-3 (Andrade et al., 2011; Castanheira et al., 2012; Gomez et al., 2011). No detectamos metalo- β -lactamasas, a diferencia otros países Latinoamericanos como Perú en el que han sido reportadas junto con NDM (Resurreccion-Delgado et al., 2017) u otros países como Reino Unido donde predominan carbapenemasas mixtas como VIM y NDM, o India donde predominan las de tipo NDM seguidas por OXA-48. En este trabajo se identificaron un total de 17 patrones de PFGE diferentes que se correspondieron con 10 secuenciotipos; se observó marcado predominio de ST25, seguido de ST 629, ST17, ST147, ST995, ST268, ST258, ST111, ST133, ST551 y 4 aislamientos cuyas combinaciones alélicas no están aún documentadas. Otros estudios muestran una gran diversidad genética en sus secuenciotipos portadores de carbapenemasas dentro de los ambientes nosocomiales (De Laveleye et al., 2017). En Latinoamérica los tipos clonales ST11 y ST437, se encuentran asociados a la diseminación de *bla*KPC-2 y *bla*KPC-3 (Andrade et al., 2011; Castanheira et al., 2012; Gomez et al., 2011). En Argentina, a la fecha se describe como tipo clonal dominante ST 258.

En comparación a las tasas de incidencia global de *K.pneumoniae* productora de carbapenemasas de otros centros hospitalarios, en nuestro estudio la misma fue de 0.290 cada 1000 pacientes hospitalizados, mayor a la registrada en un estudio realizado en Bélgica donde la incidencia promedio entre 9 hospitales fue de 0.223 cada 1000 pacientes (De Laveleye et al., 2017) y con mayor diferencia aún de Alemania donde ésta es significativamente menor (0.047 cada 1000 pacientes) (Kaase et al., 2016).

Desde la aparición de variantes hipermucoviscosas de *K.pneumoniae* en el mundo, muchos casos de infecciones invasivas causadas por estos patógenos se describieron y la hipermucoviscosidad parecía estar asociada con esta forma de infección agresiva, actualmente estos términos no son sinónimos y sabemos que estos fenotipos son completamente diferentes e independientes, así un string test negativo sería insuficiente para concluir si una cepa es o no capaz de producir una infección invasiva. En este trabajo se estudiaron los genes asociados a la virulencia en las cepas hipermucoviscosas causantes de infección.

Si bien en cepas hipervirulentas los tipos capsulares K1 y K2 fueron los más exhaustivamente descritos, está

demostrado que las cepas de *K.pneumoniae* productoras de infección y no hipervirulentas también pueden presentar el serotipo K2, en este estudio se observó un elevado porcentaje de cepas K2. Nuestras cepas no portaron los genes *iutA*, *fimH*, *rpmA*, *WcaG*, *cnf-1*, *hly* o *allS*. Los genes *magA* (mucoviscosidad asociada con el gen A y específico del serotipo capsular K1), *k2A* (específico del serotipo capsular K2) y *allS* (asociado al metabolismo de la alantoína) juegan un papel decisivo en la patogénesis del absceso hepático (Fang et al., 2004; Ku y Chaung, 2008). La ausencia de alguno de estos genes indica que no hay cepas de absceso hepático en este estudio. Estudios de Chou et al., 2004, y Compain et al., 2014, apoyan esta conclusión. Además de esto, se informa la ausencia de *cnf-1*, *hly* y *allS* en *Klebsiella* en otros estudios [31, 32].

Los genes asociados a la cápsula (*wabG*, *uge* y *ycfM*) promueven la infección por resistencia a la fagocitosis (Yu et al., 2008). Estos genes encontrados frecuentemente en aislamientos de *K.pneumoniae* son la base de la patogenicidad de *K.pneumoniae*. En este estudio, las regiones génicas de virulencia que encontramos entre las cepas de *K.pneumoniae* fueron *wabG* (48.57%), *uge* (80%), *ycfM* (57.14%), codificando cápsula, lipoproteína y proteína de membrana externa. Estas tasas son

consistentes con estudios previos reportando que aislamientos clínicos de *K.pneumoniae* fueron productores de estos factores de virulencia (Fertas-Aissani, Messai y Alouache, 2013) pero la frecuencia de *wabG* y *ycfM* fue menor a la descrita por Esra Denis y Nilufer Aksox, 2015. De acuerdo con la distribución de los genes de virulencia de las cepas de *K.pneumoniae*, la mayor diversidad en virulencia fue vista en aislamientos urinarios y respiratorios. Esta situación es cercana a las tasas de infecciones urinarias y neumonía en humanos.

Las cepas clínicas de *K.pneumoniae* expresan 2 tipos de adhesinas fimbriales; fimbrias tipo 1 y tipo 3 [36, 37]. Mientras que las fimbrias tipo 1, codificada por *fimH*, juegan un papel importante en las infecciones de tracto urinario, las fimbrias de tipo 3, codificadas por *mrkD*, promueven el desarrollo de biofilm. Además, los sideróforos codificados por *entB*, *iutA* y *iroN*, son proteínas fijadoras de hierro y son promotoras de la formación de biofilm [36, 38]. En este estudio, las adhesinas fimbriales totales (*mrkD* y *kpn*) fueron observadas en 34 aislamientos (97.14%) y los sideróforos (*entB* y *iroN*) en 33 aislamientos (94.28%).

Es sabido que los factores de virulencia y la resistencia antibiótica juegan

un papel importante en la patogénesis bacteriana (Beceiro, Thomas y Bou, 2013). Muchos estudios han reportado que los factores de virulencia están asociados con la resistencia antibiótica en bacterias patógenas (Fertas-Aissani, Messai y Alouache, 2013), contrariamente, en el estudio realizado por Esra Denis y Nilufer Aksox, 2015, no hay correlación significativa entre los factores de virulencia, resistencia a carbapenemes y tipos de infección. La regulación/expresión de todos estos mecanismos podría estar regulada por *quórum sensing* (Yang et al., 2012; Wang et al., 2013).

Conclusiones

En resumen, este estudio provee la primer caracterización clínica y molecular de *K.pneumoniae* hipermucoviscosas productoras de KPC; nuestros hallazgos indicarían que no existen asociaciones representativas entre virulencia, patogénesis y multiresistencia. Por otra parte, la elevada incidencia de estas cepas asociadas a múltiples clones en un corto periodo de tiempo explica la gran diversidad genética y su alto poder de diseminación que constituye un gran problema de salud pública.

Bibliografía

1. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, Jenney A, Connor TR, Hsu LY, Severin J, Brisse S, Cao H, Wilksch J, Gorrie C, Schultz

- MB, Edwards DJ, Nguyen KV, Nguyen TV¹⁵, Dao TT, Mensink M, Minh VL, Nhu NT, Schultsz C, Kuntaman K, Newton PN, Moore CE, Strugnell RA, Thomson NR. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(27):E3574-81. doi: 10.1073/pnas.1501049112.
2. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 25(4):682-707. doi: 10.1128/CMR.05035-11.
3. Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. 2017. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes?. ISSN: 2150-5594 2150-5608 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kvir20>
4. Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 17(10):1791-8. doi: 10.3201/eid1710.110655.
5. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. 1998. *Clin Microbiol Rev*. 11(4):589-603.
6. Kitchel B, Rasheed JK, Patel J, Srinivasan A, Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, and Giske C. 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.
7. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo MJ, Clímaco EC, Carneiro E, Martinez R, Baquero F, Canton R, Coque T. 2011. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother*. 55:3579–3583. Doi: 10.1128/AAC.01783-10
8. Castanheira M, Costello JA, Deshpande LM, Jones RN. 2012. Expansion of Clonal Complex 258 KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American Hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob. Chemother*. 56:1668–1669. Doi: 10.1128/AAC.05942-11.

9. Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovetska O, Albornoz E, Galas M, KPC Group, Melano RG, Corso A, Petroni A. 2011. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin. Microbiol. Infect.* 17:1520–1524. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03600.x>
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2013. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-four informational supplement. CLSI document M100-24. CLSI, Wayne.
11. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). 2014. Clinical breakpoints version 4.0. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). <http://www.eucast.org>.
12. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. 2009. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 47(6):1631-9. doi:10.1128/JCM.00130-09.
13. Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. 2011. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(1):349-54. doi: 10.1128/AAC.00773-10. Epub 2010 Oct 18.
14. Lee HC, Chuang YC, Yu WL, Lee NY, Chang CM, Ko NY, et al. 2006. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. 259:606–14.
15. C Fang, Y Chuang, C Shun, S Chang, J Wang. 2004. A Novel Virulence Gene in *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Primary Liver Abscess and Septic Metastatic Complications. *JEM* DOI: 10.1084/jem.20030857.
16. Esra Deniz Candan and Nilüfer Aksöz. 2015. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. Vol. 62, No 4/2015 867–874 http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1148
17. Antimicrobial Surveillance Program SENTRY. 2014. World Health Organization. www.who.int
18. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. 2009. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*, pp. 1180-1185

19. Córdova E, Lespada MI, Gómez N, Pasterán F, Oviedo V, Rodríguez-Ismael C. 2012. Clinical and epidemiological study of an outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in Buenos Aires, Argentina. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 30(7):376-9. doi: 10.1016/j.eimc.2011.12.003.
20. Lucena A, Dalla Costa LM, Nogueira KS, Matos AP, Gales AC, Paganini MC, Castro ME, Raboni SM. 2014. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. *J Hosp Infect*. 87(4):234-40. doi: 10.1016/j.jhin.2014.05.007.
21. Falagas ME, Bliziotis IA, Michalopoulos A, Sermaidis G, Papaioannou VE, Nikita D, Choulis N. 2007. Effect of a policy for restriction of selected classes of antibiotics on antimicrobial drug cost and resistance. *J Chemother*; 19(2):178-84.
22. Hoxha, A., Karki, T., Giambi, C., Montano, C., Sisto, A., Bella, A., et al. Attributable mortality of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in a prospective matched cohort study in Italy, (2012)-2013. 2016. *J. Hosp. Infect*. 92, 61–66. doi: 10.1016/j.jhin.2015.06.018.
23. Zheng B, Dai Y, Liu Y, Shi W, Dai E, Han Y, Zheng D, Yu Y and Li M, 2017. Molecular Epidemiology and Risk Factors of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Eastern China. *Front Microbiol* 8: 1061. doi: 10.3389/fmicb.2017.01061
24. Lee C.-R., Lee J. H., Park K. S., Kim Y. B., Jeong B. C., Lee S. H. 2016. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front. Microbiol*. 7:895
25. De Laveleye M, Huang TD, Bogaerts P, Berhin C, Bauraing C, Sacré P. 2017. Increasing incidence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Belgian hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:139-146
26. Teo J, Cai Y, Tang S, Lee W, Tan T. Y, Tan T.T, et al. 2012. Risk factors, molecular epidemiology and outcomes of ertapenem-resistant, carbapenem-susceptible *Enterobacteriaceae*: a case-case-control study. *PLoS ONE* 7:e34254. doi: 10.1371/journal.pone.0034254
27. Cantón R, Coque TM, Baquero F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. 2003 *Curr Opin Infect Dis*. 16(4):315-25.
28. Resurrección-Delgado C, Montenegro-Idrogo JJ, Chiappe-Gonzalez A, Vargas-

- Gonzales R, Cucho-Espinoza C, Mamani-Condori DH, Huaroto-Valdivia LM. 2017 Klebsiella pneumoniae NEW DELHI METALO-LACTAMASE IN A PERUVIAN NATIONAL HOSPITAL Rev Peru Med Exp Salud Publica. 34(2):261-267. doi: 10.17843/rpmesp.2017.342.2615.
29. Kaase M, Schimanski S, Schiller R, Beyreiß B, Thürmer A, Steinmann J, Kempf VA, Hess C, Sobottka I, Fenner I, Ziesing S, Burckhardt I, von Müller L, Hamprecht A, Tammer I, Wantia N, Becker K, Holzmann T, Furitsch M, Volmer G, Gatermann SG. 2016. Multicentre investigation of carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in German hospitals. Int J Med Microbiol. doi:10.1016/j.ijmm.2016.05.009
30. Ku YH, Chuang YC, Yu WL. 2008. Clinical spectrum and molecular characteristics of Klebsiella pneumoniae causing community-acquired extrahepatic abscess. J Microbiol Immunol Infect 41: 311–317.
31. Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. 2004. Isolation of a chromosomal region of Klebsiella pneumoniae associated with allantoin metabolism and liver infection. Infect Immun 72: 3783–3792. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004>.
32. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F, Kassis-Chikhani N, Arlet G, Decré D. 2014. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of Klebsiella pneumoniae. J Clin Microbiol 52: 4377–4380. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02316-14>.
33. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC (2008) Comparison of prevalence of virulence factors for Klebsiella pneumoniae liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. Diagn Microbiol Infect Dis 62:1–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007>.
34. Mamlouk K, Boutiba-Ben Boubaker I, Gautier V, Vimont S, Picard B, Ben Redjeb S. 2006. Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae strains in a Tunisian hospital. J Clin Microbiol 44: 4049–4056. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01076-06>.
35. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Sauleda J, Albertí S. 2002. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a murine model of pneumonia. Infect Immun 70: 2583–2590.

<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.5.2583-2590.2002>

36. El Fertas-Aissani R, Messai Y, Alouache S, Bakour R. 2013. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathol Biol* 61: 209–216. <http://dx.doi.org/10.1016/j.patbio.2012.10.004>

37. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. 1998. *Clin Microbiol Rev*. 11(4):589-603.

38. May T and Okabe S. 2011. Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*. *Environ Microbiol* 13: 3149–3162. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02607.x>.

39. Beceiro A, Tomás M, Bou G. 2013. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clin Microbiol Rev* 26: 185–230. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00059-12>

40. Arisoy M, Yousefi Rad A, Akin A, Akar N. 2008. Relationship between susceptibility to antimicrobials and virulence factors in pediatric *Escherichia coli* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 31: 4–

8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.07.030>.

41. Yang YX, Xu ZH, Zhang YQ, Tian J, Weng LX, Wang LH. 2012. A new quorum-sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* 50: 987–993. <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-012-2149-7>.

42. Wang H, Tu F, Gui Z, Lu X, Chu W. 2013. Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Indian J Microbiol* 53: 163–167. <http://dx.doi.org/10.1007/s12088-013-0370-7>.

Agradecimientos

Agradecemos a la Dra. Carmen Rosa de Campo, Marta Cobos y al resto de su equipo de trabajo en el Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) perteneciente al Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid por la ayuda brindada y a la Bqca Silvana Mochi del Hospital Ángel C. Padilla por su colaboración en el trabajo propuesto.