

**Prevalencia de Klebsiella Variicola en aislados clínicos de Klebsiella Pneumoniae y su resistencia antimicrobiana en cuatro Hospitales del Estado de Guerrero**

JARDÓN-PINEDA, Dámaris\*†, CUEVAS-PEÑA, José Manuel, TORIBIO-JIMÉNEZ, Jeiry y GARZA-RAMOS MARTÍNEZ, Jesús Ulises

\*Unidad Académica de Ciencias Químico Biológicas - UAGro.

†Departamento de Resistencia Bacteriana, Centro de Investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Cd. Universitaria Sur, Chilpancingo, Guerrero

Recibido Junio 4, 2014; Aceptado Octubre 13, 2014

**Resumen**

El género *Klebsiella*, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, dentro de estas especies se incluyen a *K. oxytoca* (clados oxy-1 y oxy-2) y *K. variicola*. *K. pneumoniae* presenta diversos factores de virulencia en los cuales se incluyen las fimbrias que le confieren la capacidad de adhesión a las células epiteliales, la cápsula le protege de la acción de los antibióticos y de la respuesta inmune al poder evadir a los macrófagos. Así mismo, produce sideróforos, los cuales tienen la función de quelar o atrapar el hierro de los eritrocitos, conllevando al paciente a una anemia y los lipopolisacáridos que actúan como endotoxinas bacterianas que pueden llegar a causar un choque anafiláctico en los pacientes infectados con esta bacteria en los Hospitales o en la comunidad.

***Klebsiella Variicola, Klebsiella Pneumoniae, prevalencia.***

**Abstract**

The genus *Klebsiella*, belonging to the family Enterobacteriaceae within these species include *K. oxytoca* (oxy-1 clades and oxy-2) and *K. variicola*. *K. pneumoniae* presents several virulence factors in which the fimbriae that confer the ability to adhere to epithelial cells include, the capsule protects you from the action of antibiotics and the immune response to evade macrophages. Likewise, siderophores produced, which have the function of catching the iron chelate or erythrocytes, leading to anemia patient and acting as bacterial lipopolysaccharide endotoxins which may eventually cause anaphylactic shock in patients infected with the bacteria in hospitals or in the community.

***Variicola Klebsiella, Klebsiella pneumoniae, prevalence.***

**Citación:** JARDÓN-PINEDA, Dámaris, CUEVAS-PEÑA, José Manuel, TORIBIO-JIMÉNEZ, Jeiry y GARZA-RAMOS MARTÍNEZ, Jesús Ulises Prevalencia de *Klebsiella Variicola* en aislados clínicos de *Klebsiella Pneumoniae* y su resistencia antimicrobiana en cuatro Hospitales del Estado de Guerrero. Foro de Estudios sobre Guerrero. Mayo 2013 Abril 2014, 1-1: 582-586

\* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: damajardon9@gmail.com)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

**Introducción**

Aunado a los factores de virulencia de *K. pneumoniae*, es su alto grado de resistencia a antibióticos de tipo quinolonas, aminoglucósidos y  $\beta$ -lactámicos.

La producción de  $\beta$ -lactamasas por *K. pneumoniae* se considera el principal mecanismo de resistencia bacteriana, dado que estas son enzimas que hidrolizan el anillo  $\beta$ -lactámico de estos antibióticos y dan lugar a su inactivación (Garza-Ramos et al., 2009). La alta prevalencia de  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (BLEE) en *K. pneumoniae* sugiere restringir de estos antibióticos e implementar medidas rigurosas de higiene para la prevención de la diseminación del microorganismo en el ambiente hospitalario y en el control de infecciones que puede conllevar a la falla terapéutica y por tanto al fracaso clínico que desencadena en la muerte del paciente.

La Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) reporta que entre los años de 1998-2003 *K. pneumoniae* se encontró como uno de los principales microorganismos que estaban asociados a la morbilidad de infecciones nosocomiales con un ~7%, ocupando así el 5° lugar en aislamientos, y como 2° lugar asociados a mortalidad en IN, representado el ~10% de los aislados.

En el 2004 se descubrió una nueva especie que presenta una estrecha similitud fenotípica con *K. pneumoniae*, esta nueva especie es *K. variicola*, está se creía propia del ambiente y que ahora representa el ~10% de los aislamientos clínicos de *K. pneumoniae*. Dicha especie no se puede identificar con pruebas bioquímicas convencionales o métodos automatizados, *K. variicola* solo puede diferenciarse de *K. pneumoniae* a través de pruebas moleculares, como análisis filogenético de genes house keeping (*rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *phoE*, *infB*, *nifH*) e hibridación ADN-ADN.

Sin embargo, se ha descrito un PCR Multiplex, que amplifica fragmentos de genes únicos de cada especie, de *K. pneumoniae* y *K. variicola*, permitiendo así la diferenciación de estas dos especies.

**Objetivos**

- Conocer la prevalencia de *K. variicola* en aislados clínicos de *K. pneumoniae*
- Diferenciar a nivel molecular a *K. variicola* de *K. pneumoniae* mediante PCR Multiplex.
- Determinar la resistencia antimicrobiana en las cepas de *K. pneumoniae* y *K. variicola* de los cuatro Hospitales.

**Metodología**

Se recolectaron 49 cepas de *K. pneumoniae* obtenidas de dos Hospitales de la Cd., de Acapulco, Gro., Hospital General (HGA) e Instituto Estatal de Cancerología (IEC), y dos de la Cd. de Chilpancingo, Gro., Clínica Hospital ISSSTE (CHI) y Unidad Especializada de Gastroenterología y Endoscopia (UEGE), las cuales se identificaron mediante pruebas bioquímicas convencionales y/o por sistema automatizado (Vitek). Dichas cepas fueron aisladas de muestras clínicas: urocultivos, exudados vaginales, biopsias de antro gástricas, exudados faríngeos, secreciones bronquiales y líquido céfaloraquídeo. A estas cepas se les realizó el siguiente procedimiento:

Extracción de ADN cromosomal de las cepas de *K. pneumoniae*. La técnica que se empleó fue la de choque térmico, donde primero se tomó de dos o tres colonias del medio donde se encuentre la cepa a la cual se le extrajo el ADN y se colocó en un tubo eppendorf con agua estéril.

Se sometió a baño maría a una temperatura de aprox. 90 °C durante 10 min., después se pasó a frío a -20°C durante 5 min (realizar por triplicado), se puso a centrifugar durante 12 minutos a 13 000 rpm y finalmente se conservaron a -20°C.

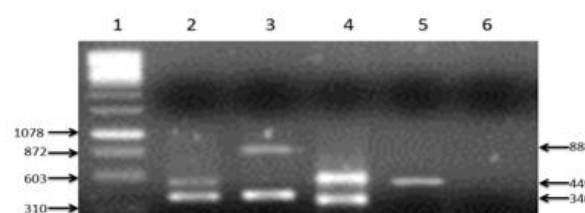
PCR Multiplex y electroforesis. La mezcla de reacción para PCR se llevó a cabo a un volumen final de 25 µl con una concentración final de 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada deoxinucleotido trifosfato, 2.5 pmol de cada oligonucleótido del género *Klebsiella* y de la especie *K. variicola*, 12.5 pmol de los oligonucleótidos de la especie *K. pneumoniae*, 1U de Taq ADN polimerasa y 4 µl de la solución que contenga el ADN. La mezcla de reacción estuvo sujeta a un paso de desnaturalización inicial de 5 min. a 95°C, seguida por 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 60°C, 1 min. a 72°C y una extensión final de 7 min. a 72°C. Los amplificados de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1.3% con bromuro de etidio (3 µl/100 ml) a 100 V por 1 h en solución amortiguadora TAE 1X (40 mM Tris- HCl, 2 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Posteriormente, se visualizaron con luz UV. Para la validación de la técnica de PCR Multiplex se utilizaron cepas control: género *Klebsiella*, una banda en 340 pb; *K. pneumoniae*, banda de 888 pb; *K. variicola*, una banda de 449 pb.

Prueba de resistencia antimicrobiana por el método de Kirby Bauer: Screening y prueba confirmatoria para detección de BLEEs. Se seleccionó colonias aisladas que se prepararon en suspensión de solución salina, el cual se ajustó a 0.5 en la escala de MacFarland, utilizando un hisopo estéril, se sumergió en el tubo con solución salina y se inoculó en agar Mueller Hinton realizando estría masiva en 2 direcciones.

Posterior a esto, se colocaron los discos de antibióticos (amikacina 30µg, amoxicilina con ácido clavulánico 30µg, ampicilina 10µg, cefotaxima 30µg, ceftriaxona 30µg, ceftazidime 30µg y ciprofloxacino 5µg) con ayuda de unas pinzas estériles. Se llevó a incubar de 18-24 horas y con ayuda del Vernier se midió el diámetro del halo de inhibición de cada disco.

## Resultados

Se evaluaron por PCR Multiplex solo 49 cepas obteniendo el 85.72%(42/49) que fueron confirmadas como *K. pneumoniae*, el 10.2%(5/49) no amplificaron y el 4.08%(2/49) se confirmaron como *K. variicola* (figura 1).

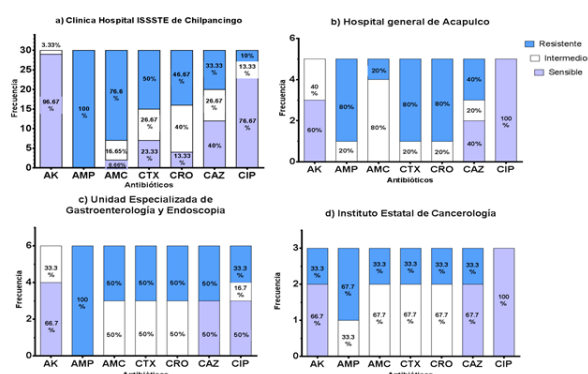


**Figura 1.** Carril 1: Marcador de peso molecular  $\phi$ X174/HaeIII; Carril 2: *K. variicola* 10239; Carril 3: *K. pneumoniae* 10235; Carril 4: Kp-24; Carril 5: Kp-09; Carril 6: Control negativo.

En la Clínica Hospital ISSSTE de Chilpancingo se aislaron 30 cepas, de las cuales, el 76.6%(23/30) son resistentes a amoxicilina con ácido clavulánico y el 50%(15/30) a cefotaxima (fig. 2-a). Mientras que en el HGA, de las 5 cepas aisladas, el 80%(4/5) tienen mayor resistencia frente a cefotaxima y ceftriaxona (fig. 2-b).

En la UEGE se aislaron 6 cepas que presentaron un 50%(3/6) de resistencia frente a amoxicilina con ácido clavulánico, cefotaxima, ceftriaxona y ceftazidime, mientras que en el IEC, de las 3 cepas aisladas, el 33.3% fueron resistentes a estos mismos antibióticos (fig. 2-c y 2-d).

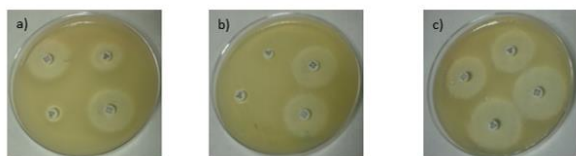
La mayoría de las cepas de todos los hospitales presentan resistencia frente a ampicilina.



**Figura 2** Perfil de resistencia microbiana de las 40 cepas analizadas, agrupadas por Hospital.

Se seleccionaron a las cepas que presentaron mayor resistencia a las cefalosporinas de 3a generación para realizarles la prueba confirmatoria de producción de BLEEs (Ver figura 3).

De acuerdo a lo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013), se toman como positivas las cepas que presenten un incremento  $\geq 5$ mm en el halo de inhibición en los discos con ácido clavulánico en comparación de los que no contienen ácido clavulánico.



**Figura 3** a) cepa control *K. pneumoniae* 700603; b) Kp-26 positiva a esta prueba; c) Kp-19 negativa a esta prueba.

## Discusión

En este estudio se analizaron 49 cepas fenotípicamente identificadas como *K. pneumoniae* aisladas de infecciones comunitarias provenientes de cuatro hospitales del Estado de Guerrero. A estas se les realizó PCR Multiplex y el 10.2% (5/49) no amplificaron, que sugiere no pertenecer al género *Klebsiella* y por lo tanto en el método de identificación empleado en los hospitales existen falsos positivos para la identificación fenotípica, el 85.72% (42/49) son *K. pneumoniae* y 4.08% (2/49) *K. variicola*, sin embargo Tinoco-Carrillo, (2010) reporta un 2.63% (5/190) en aislados intrahospitalarios.

A estas cepas se les determinó la resistencia antimicrobiana a diversos antibióticos reportados en la norma internacional del CLSI (2013). Obteniendo que en el IEC de Acapulco el 33.3% de las cepas son resistentes a amikacina, estas podrían contener genes que codifican enzimas modificadoras de aminoglucósidos por lo que resisten a este antibiótico (Díaz et al., 2004). La UEGE presentan una resistencia a ciprofloxacino del 33.3%, debido a mutaciones puntuales en los genes que codifican la ADN girasa y topoisomerasa IV (Díaz et al., 2004). Y casi en su totalidad de las cepas presentaron mayor resistencia a ampicilina, por la presencia de la  $\beta$ -lactamasas SHV-1 en el cromosoma de la bacteria.

Por otro lado se empleó más de una cefalosporina de 3a generación para detectar la producción de BLEEs. Y a las cepas que presentaron mayor resistencia a estos antibióticos se les aplicó la prueba confirmatoria de BLEEs, obteniendo que el 18.18% (8/44) fueron positivas a dicha prueba.

**Conclusión**

De las 49 cepas analizadas por PCR Multiplex, solo la cepa Kp-09 (Kv-09) y Kp-24 (Kv-24) resultaron ser *K. variicola*. La identificación de *K. variicola* mediante pruebas bioquímicas convencionales y sistemas automatizados no es posible debido a la alta similitud fenotípica que presenta con *K. pneumoniae* por ello es necesario realizar la identificación genotípica mediante técnicas moleculares que permitan diferenciar a estas dos especies.

A las 40 cepas que se identificaron como *K. pneumoniae* y *K. variicola*, se les realizó un antibiograma, de las cuales se seleccionaron las cepas más resistentes a las cefalosporinas de 3a generación y se les realizó la prueba fenotípica confirmatoria para BLEEs, el 18.18% (8/44) fueron positivas y por tanto son productoras de BLEEs.

La resistencia antimicrobiana de *K. variicola* no es concreta, de acuerdo a diferentes estudios, por lo que hace falta averiguar si alguna de estas dos cepas pueden producir alguna otra BLEEs.

**Referencias**

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2013) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M-100-S23, 33 (1), 50-53.

Díaz, P., Bello, H., Domínguez, M., Mella, S., Zemelman, R. & González, R. (2004) Resistance to gentamicin, amikacin and ciprofloxacin among nosocomial isolates of *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases. *Rev Méd Chile*, 132, 1173-1178.

Garza-Ramos, U., Silva-Sanchez, J. & Martinez-Romero, E. (2009) Genetics and genomics for the study of bacterial resistance. *Salud Publica Mex*, 51 Suppl 3, S439-46.

Martinez, J., Martinez, L., Rosenblueth, M., Silva, J. & Martinez-Romero, E. (2004) How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int Microbiol*, 7, 261-8.

Tinoco-Carrillo, P. (2010) Identificación y validación de marcadores moleculares que permitan diferenciar a *Klebsiella variicola* de *Klebsiella pneumoniae*. Centro de Investigación Sobre Enfermedades Infecciosas. Cuernavaca, Morelos, Escuela de Salud Pública de México.