

Detección fenotípica y genotípica de la producción de carbapenemasas tipo NDM-1 y KPC en enterobacterias aisladas en un laboratorio clínico en Maracay, Venezuela

Phenotypic and genotypic detection of the production of carbapenemases type NDM-1 and KPC in isolated Enterobacteriaceae in a clinical laboratory in Maracay, Venezuela

Davana Reguena S.^{1,2}, Ysvette Vásguez C.^{3,4}, Alexander Gil T.^{1,2}, Juruany Cedeño P.¹, María Chabin J.1, Eglhis Delgado R.1, Dorielys Díaz C.1 y Joselyn Dos Santos P.1

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana-Alonso", Facultad de Ciencias de la Salud sede Aragua, Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela. ²Departamento Clínico Integral, Escuela de Bioanálisis "Profa. Omaira Figueroa H.", Facultad de Ciencias de la Salud sede Aragua, Universidad de Carabobo, La Morita, Venezuela. ³Laboratorio Clínico Delgado Launois, C.A. Maracay estado Aragua, Venezuela.

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

La presente investigación no ha recibido ayudas específicas provenientes de agencias del sector público, sector comercial o entidades sin ánimo de lucro.

Recibido: 28 de julio de 2020 (segunda versión: 26 de enero de 2021) / Aceptado: 6 de febrero de 2021

Resumen

Introducción: La producción de β-lactamasas capaces de hidrolizar a los carbapenémicos es uno de los mecanismos de resistencia más preocupantes porque eliminan la última opción terapéutica frente a los microorganismos multi-resistentes. Objetivo: Determinar la producción de carbapenemasas tipo KPC y NDM-1, empleando métodos fenotípicos y genotípicos, en enterobacterias aisladas en un laboratorio clínico de la ciudad de Maracay, Venezuela. Métodos: Se determinó la producción de carbapenemasas mediante métodos fenotípicos (según algoritmo de Malbrán) y genotípicos (amplificación de los genes bla_{NDM-1} y bla_{KPC} por RPC) en enterobacterias aisladas en un laboratorio clínico durante el período marzo-agosto 2018. Resultados: Se identificaron 605 enterobacterias de diferentes especies, siendo Escherichia coli la cepa con mayor porcentaje de aislamiento (61,3%), seguida por *Klebsiella pneumoniae* (14,9%). Diez y seis enterobacterias (2,64%) fueron positivas para la producción de carbapenemasas: 13 cepas de K. pneumoniae y tres del complejo Enterobacter cloacae. La RPC demostró que 14 cepas (87,5%) contienen el gen bla_{NDM-1} y dos (12,5%) el gen bla_{KPC}; se observó 100% de concordancia entre la determinación

Abstract

Background: The production of carbapenem-hydrolyzing β-lactamases is one of the most concerning resistance mechanisms since it eliminates the last therapeutic option against multidrug resistant microorganisms. Aim: To determine the production of KPC and NDM-1 type carbapenemases, using phenotypic and genotypic methods, in isolated enterobacteria in a clinical laboratory in the city of Maracay, Venezuela. Methods: The production of carbapenemases was determined by phenotypic (according to the Malbrán algorithm) and genotypic methods (amplification of the $bla_{\rm NDM-1}$ and $bla_{\rm KPC}$ genes by PCR) in clinical isolates of Enterobacteriaceae during the period March-August 2018. Results: 605 Enterobacteriaceae of different species were identified, being Escherichia coli the strain with the highest percentage of isolation (61.3%), followed by Klebsiella pneumoniae (14.9%). Sixteen strains (2.64%) were positive for carbapenemases production: 13 strains of K. pneumoniae and three of the Enterobacter *cloacae* complex. PCR showed that 14 strains (87.5%) carry the *bla*_{NDM-1} gene and two strains (12.5%) the bla_{KPC} gene; 100% agreement was observed between phenotypic determination and PCR for both groups

Correspondencia a:

Dayana Requena Sarcolira dayanacrs@gmail.com

⁴Servicio de Bacteriología, Hospital Estatal "Los Samanes", CORPOSALUD, Maracay, Venezuela.

— 🎇 🏋 🕻 Laboratorio e Infectología

fenotípica y la RPC para ambos grupos de enzimas. *Conclusiones:* Los resultados mostraron mayor incidencia de la metalo-β-lactamasa tipo NDM-1, reconocida como una alarma epidemiológica debido a que su rápida diseminación dificulta su control, por lo que la identificación del tipo de enzima permitiría establecer estrategias de manejo y control más certeras con la finalidad de erradicar a dichos patógenos.

Palabras clave: enterobacterias; resistencia bacteriana; carbapenemasas; NDM-1, KPC.

of enzymes. Conclusions: The results of this study showed a higher incidence of metallo- β -lactamase type NDM-1, which rapid dissemination and consequently difficult control has been cause of epidemiological alert. The identification of the type of enzyme would allow establishing more accurate management and control strategies in order to eradicate these pathogens.

Keywords: Enterobacteriaceae; resistance mechanisms; carbapenemase; NDM-1, KPC.

Introducción

as enterobacterias son patógenos humanos comunes y colonizadores del tracto intestinal humano que pueden causar una amplia gama de enfermedades, incluyendo infecciones del tracto urinario, neumonía, infecciones del torrente sanguíneo, intra-abdominales, de piel y tejidos blandos en entornos comunitarios y hospitalarios^{1,2}.

La resistencia a antimicrobianos es considerada un fenómeno evolutivo natural, que han desarrollado las bacterias como mecanismo de defensa; ante esto, cuentan con la producción de enzimas inactivadoras, mutación de sitios de acción, bombas de expulsión, entre otros³. En los últimos años se ha generado alarma y preocupación por la gran dispersión de los bacilos gramnegativos resistentes a los carbapenémicos en los que el mecanismo implicado es la producción de β -lactamasas capaces de hidrolizar este grupo de antimicrobianos y que se han asociado a elementos genéticos transferibles. Entre las de mayor interés se encuentran las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) y las carbapenemasas⁴.

Las carbapenemasas, son enzimas inactivadoras de carbapenémicos, antimicrobianos β -lactámicos de amplio espectro con actividad bactericida frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, tanto aeróbicas como anaeróbicas. Son utilizados sólo en cuadros de gran resistencia bacteriana, por lo que, este mecanismo de resistencia inhibe prácticamente el último escalón terapéutico frente a microorganismos gramnegativos multi-resistentes³.

Se clasifican en el sistema de Ambler de la siguiente manera: las carbapenemasas de clase A (GES, KPC) que son inhibidas por el ácido clavulánico; las de clase B o metalo-β-lactamasas (VIM, IMP, NDM) que son inhibidas por el ácido etilen-diamino-tetra-acético (EDTA); y las oxacilinasas de clase D que no se ven afectadas por el ácido clavulánico o el EDTA⁵.

Dentro de las carbapenemasas de clase A, las que mayor importancia epidemiológica tienen son las denominadas KPC que reciben este nombre por haberse encontrado inicialmente en *Klebsiella pneumoniae* (KPC = *K. pneumoniae carbapenemases*)^{6,7}. Por el momento se conocen 61 variantes (gen *bla*_{KPC-61}, GenBank MK559426.1), siendo KPC-2 y KPC-3 las variantes descritas con mayor frecuencia en Latinoamérica³.

El grupo más importante de carbapenemasas lo constituyen las metalo- β -lactamasas (MBL) pertenecientes a la clase B. La más recientemente descrita es la enzima Nueva Delhi metalo- β -lactamasa (NDM) que ha creado una importante alarma mediática debido al perfil muti-resistente o pan-resistente de los aislados que la producen. Esta

enzima, cuyo origen podría situarse en la India, se detectó por primera vez en *K. pneumoniae* y también está presente en *Escherichia coli* y en otras enterobacterias, y asimismo en *Acinetobacter* spp.^{8,9}.

En un estudio realizado en Venezuela, se evidenció la variabilidad de aislados productores de carbapenemasa de tipo KPC, describiendo aislados que permanecieron en el tiempo y la posible diseminación inter e intrahospitalaria en aislados que se encontraron genéticamente relacionados¹⁰. Sin embargo, son pocos los estudios sobre la existencia de otros tipos de carbapenemasas como la NDM-1. Por esa razón, el objetivo de este estudio fue determinar la producción de carbapenemasas tipo KPC y NDM-1, empleando métodos fenotípicos y genotípicos, en enterobacterias aisladas en un laboratorio clínico de la ciudad de Maracay, estado Aragua.

Material y Métodos

Se realizó la determinación de carbapenemasas a las enterobacterias aisladas de los cultivos procesados en el Servicio de Bacteriología de un laboratorio clínico, ubicado en Maracay, estado Aragua, Venezuela, durante el período marzo-agosto de 2018, sin importar el tipo de muestra, edad o sexo del paciente.

Cada muestra se inoculó de manera manual en los distintos medios de cultivo a utilizar. Se observó el desarrollo bacteriano en las placas de agar MacConkey como colonias rojas que corresponden a bacterias que han metabolizado la lactosa debido al indicador de pH ácido (rojo neutro). La identificación de enterobacterias, se realizó mediante el uso de pruebas bioquímicas convencionales siguiendo el protocolo estándar de las bacterias gramnegativas. Una vez realizada la identificación del microorganismo se evaluó la susceptibilidad a los diferentes antimicrobianos (placa estratégica) siguiendo las recomendaciones del CLSI 2018¹¹ (por sus siglas en inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*), empleando el método de difusión en disco por la técnica de Kirby-Bauer¹².

Detección fenotípica de carbapenemasas

Se utilizó el algoritmo de trabajo establecido por el Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas "Dr. Carlos Malbrán" de Argentina, consensuado para la Red Latinoamericana de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana (RELAVRA), el cual indica que el primer paso para la identificación del mecanismo de resistencia tipo KPC o MBL, es evaluar la disminución de la susceptibilidad antimicrobiana

198 www.revinf.cl Rev Chilena Infectol 2021; 38 (2): 197-203



a carbapenem. El algoritmo se basa en un tamizaje inicial utilizando el tamaño de la zona de inhibición de imipenem (IPM) por el método de difusión de disco, considerando como sospechoso de carbapenemasas a todas las cepas con halos menores o iguales a 22 mm¹³. Posteriormente, se confirmó fenotípicamente por medio de la prueba de sinergia con discos de EDTA 750 μg/mL con tioglicolato de sodio 300 mg/mL para el tipo MBL14,15 y la prueba de sinergia con discos de ácido fenil borónico (sigla en inglés: APB) 300 µg/mL para el tipo KPC14. Adicionalmente, se emplearon los métodos: Blue-Carba¹⁶, donde se utilizó como control negativo la cepa K. pneumoniae ATCC BAA 1706, el que sirvió de comparación para la interpretación de los resultados; test de Hodge modificado con Tritón (THT) empleando E. coli ATCC 25922 como cepa indicadora^{11,17} y prueba confirmatoria de carbapenemasas (estuche comercial MASTDISCSTM Combi).

Detección de genes de resistencia

Se realizó amplificación de los genes bla_{NDM-1} y bla_{KPC} mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC). En primer lugar, se realizó la extracción del ADN bacteriano empleando el método de ebullición¹⁸. En los ensayos de RPC se emplearon condiciones reportadas previamente¹⁴ en un volumen final de 50 µL: 1,5 mM de MgCl₂; 0,125 uM de una mezcla de desoxi nucleótidos trifosfato (dNTP mix); 1 µM de cada cebador (Tabla 1) en ensayos individuales para los dos genes¹⁹, 1 U de ADN polimerasa y 5 uL de ADN en tampón de reacción 1X proporcionado por el fabricante (Promega®). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Thermo Pxe 0.2. El primer paso fue una desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 34 ciclos de desnaturalización (1 min a 95 °C), hibridación por 1 min (52 °C para NDM-1 y 55 °C para KPC), y extensión a 72 °C por 1 min, con un último ciclo de desnaturalización a 95 °C por 1 min, extensión final por 5 min a 72 °C y enfriamiento a 4 °C por 10 min.

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE (Tris 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,3). Las imágenes de los patrones electroforéticos obtenidas por trans-iluminación UV, se digitalizaron en el equipo GelDoc 1000 (BIO-RAD) y se analizaron con el programa Quantity One (BIO-RAD).

Las reacciones de amplificación para los genes se consideraron positivas al observar una banda única de 621 pb para el gen bla_{NDM-1} y de 798 pb para el gen bla_{KPC} .

Resultados

Para el estudio se incluyó un total de 2.671 muestras, de las cuales se identificaron 605 enterobacterias de diferentes géneros y especies, que estuvieron distribuidas

de la siguiente manera: 371 cepas de E. coli (61,3%), 90 cepas de K. pneumoniae (14,9%), 74 cepas de Proteus spp. (12,2%), y otras especies en menor proporción (Tabla 2).

Detección fenotípica de carbapenemasas

Se realizó el antibiograma a las 605 cepas de enterobacterias, obteniéndose como resultado que 16 cepas (2,64%) presentaron un patrón de multi-resistencia sugestivo de carbapenemasas positivas (halo de inhibición < 22 mm para el disco de IPM), siendo 13 aislados de la especie K. pneumoniae (81,25%) y tres se identificaron como complejo Enterobacter cloacae (18,75%). Estas cepas fueron aisladas de forma independiente a partir de muestras de pacientes internados en diferentes centros hospitalarios de la ciudad de Maracay, estado Aragua, Venezuela. En ningún caso se aisló más de una cepa por paciente. El origen de las muestras fue: secreciones (n: 6), hemocultivos (n: 4), punta de catéter (n: 3), v en menor proporción orina (n: 1), líquido cefalorraquídeo (n: 1) y exudado uretral (n: 1).

Nombre	Secuencia	Tamaño del producto	
NDM-1 directo	5'-GGTTTGGCGATCTGGTTTTC-3'	624	
NDM-1 reverso	3'-CGGAATGGCTCATCACGATC-5'	621 pb	
KPC directo	5'-CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3'	798 pb	
KPC reverso	3'-CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-5'		

Tabla 2. Especies de enterobacterias aisladas en el estudio							
Especie Estudio	Copro- cultivo	Secreción o líquido estéril		Uro- cultivo	Total	%	
BGN sin identificación	0	0	1	0	1	0,2	
Escherichia coli	2	73	0	296	371	61,3	
Complejo Enterobacter cloacae	0	12	2	0	14	2,3	
Enterobacter spp.	0	5	7	6	18	3,0	
Klebsiella pneumoniae	0	37	6	47	90	14,9	
Klebsiella spp.	0	4	1	4	9	1,5	
Pantoea agglomerans	0	1	0	0	1	0,2	
Proteus spp.	0	43	0	31	74	12,2	
Providencia spp.	0	8	0	0	8	1,3	
Serratia marcescens	0	5	13	1	19	3,1	
Total	2	188	30	385	605	100	
BGN: bacilo gramnegativo.							

Con las pruebas fenotípicas Blue-Carba y THT se obtuvo un resultado positivo para carbapenemasas en 100% de las cepas sospechosas. Adicionalmente, en 87,5% de los aislados se evidenció la sinergia entre los discos de EDTA y los carbapenémicos evaluados, demostrando la producción MBL; 12 cepas corresponden a la especie *K. pneumoniae* y dos del complejo *E. cloacae*. El 12,5% de los aislados mostró sinergia entre los discos de APB y los carbapenémicos utilizados, demostrando la producción de serinoenzimas. Este resultado se reprodujo al realizar la prueba confirmatoria de carbapenemasas, e indican que, en las muestras analizadas en este estudio, existe una mayor prevalencia de carbapenemasas tipo MBL en comparación con el tipo KPC.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de las pruebas fenotípicas realizadas para la detección de carbapene-

masas en las 16 muestras que presentaron un halo de inhibición < 22 mm para el disco de IPM. Todas las técnicas mostraron 100% de sensibilidad.

Detección de genes de resistencia

En la amplificación de genes que codifican carbapenemasas, los ensayos de RPC mostraron que en los aislados clínicos positivos fenotípicamente para la producción de carbapenemasas, 87,5% (n: 14) tienen el gen $bla_{\rm NDM-1}$ y 12,5% (n: 2) son portadores del gen $bla_{\rm KPC}$. En ambos ensayos de RPC, no se observó la amplificación de productos secundarios inespecíficos (Figura 1). Estos resultados concuerdan con la identificación fenotípica realizada con la prueba de sinergia con discos de EDTA y APB y con la prueba confirmatoria de carbapenemasas.

Tabla 3. Detección fenotípica de carbapenemasas según el algoritmo de Malbrán								
Resultados positivos según el método fenotípico ensayado								
	Blue-Carba	Sinergia con EDTA/IPM	doble disco APB/IPM	Hodge modificado	Prueba confirmatoria (MASTDISCS™ Combi)			
n = 16	16/16	14/16	2/16	16/16	16/16			
Sensibilidad (%)	100	100	100	100	100			

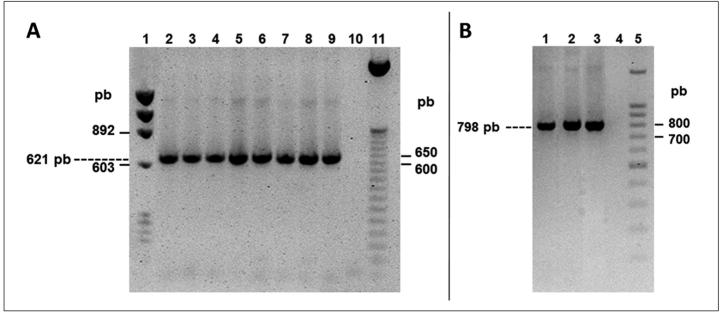


Figura 1. A) Detección del gen bla_{NDM-1} mediante RPC. Canal 1: marcador $BenchTop\ PhiX174\ DNA\ Hae\ III\ Marker\ (Promega®)$. Canales 2 al 8: productos de 621 pb que indica la presencia del gen bla_{NDM-1} en siete cepas del estudio. Canal 9: control positivo, cepa K. $pneumoniae\ INH\ 79534\ NDM$. Canal 10: control negativo. Canal 11: marcador $50\ bp\ DNA\ Step\ Ladder\ (Promega®)$. B) Detección del gen bla_{KPC} mediante RPC. Canales 1 y 2: productos de 798 pb que indica la presencia del gen bla_{KPC} en dos cepas del estudio. Canal 3: control positivo, cepa de K. $pneumoniae\ 4238-09\ HUAPA$. Canal 4: control negativo. Canal 5: marcador $100\ bp\ DNA\ Step\ Ladder\ (Promega®)$.

200 www.revinf.cl Rev Chilena Infectol 2021; 38 (2): 197-203



Discusión

Los carbapenémicos son considerados uno de los pocos antimicrobianos útiles para el tratamiento de infecciones causadas por bacterias gramnegativas multi-resistentes, por lo que, la aparición de enterobacterias productoras de cabapenemasas representan una gran amenaza, dejando sin opciones terapéuticas disponibles para bacterias multi-resistentes20.

En el presente trabajo, se aislaron 605 cepas de enterobacterias, de las cuales, 2,64% (n: 16) fueron productoras de carbapenemasas, siendo K. pneumoniae el microorganismo más aislado, seguido por el complejo E. cloacae. El porcentaje de carbapenamasas encontrado en este trabajo fue superior al reportado en un estudio previo, donde aislaron 14 cepas con sospecha de presentar enzimas carbapenemasas, y esto representó 1,59% del total de muestras analizadas; de igual manera, K. pneumoniae fue la bacteria con mayor porcentaje de aislamiento, seguida por E. coli, E. cloacae y Klebsiella oxytoca²¹.

Las 16 cepas presentaron resultados positivos para la producción de carbapenemasas. Las pruebas de sinergia con discos de EDTA y APB permitieron clasificar el tipo de enzima presente en MBL y KPC. De las 16 muestras aisladas, 14 cepas (87,5%) fueron positivas para la prueba de sinergia con discos de EDTA (MBL positivas), y dos cepas (12,5%) fueron positivas para la prueba de sinergia con APB (KPC positivas).

La identificación molecular de los genes de resistencia mediante cebadores específicos indicó que la mayoría correspondía al gen $bla_{{\rm NDM-1}},$ y el resto a $bla_{{\rm KPC}},$ en franca concordancia con las pruebas de sinergia. A destacar con este resultado es que la presencia del gen bla_{NDM-1} infiere su rápida diseminación en los últimos años, resaltando que hasta ahora, cepas portadoras de bla_{NDM-1} no habían sido reportadas en el estado Aragua, Venezuela.

En la última década, se han detectado brotes epidémicos por enterobacterias productoras de carbapenemasas en diversas regiones del mundo, incluida Latinoamérica, siendo la carbapenemasa tipo KPC una de las más frecuentemente reportadas²²⁻²⁵. Colombia fue el primer país de América Latina que notificó un brote de K. pneumoniae productora de KPC, el que se originó en un paciente que había viajado a Israel26. Desde entonces, Argentina, Chile, México y Brasil también han informado la detección de enterobacterias resistentes a carbapenémicos productoras de KPC23.

En cuanto al tipo NDM-1, la presencia de esta carbapenemasa en Latinoamérica, se detectó en Guatemala en el año 2011 y posteriormente en Colombia y Brasil, en el año 2013. Después, al igual que las KPC, se diseminaron rápidamente por toda Sudamérica. En Venezuela, el primer aislamiento de una enterobacteria productora de carbapenemasa de tipo NDM fue reportado en el año 2016, en dos cepas de E. coli aisladas de pacientes en un centro hospitalario²⁷. En cuanto al tipo KPC, un estudio publicado en el año 2019 mostró la amplia distribución del gen $bla_{\rm KPC}$ en diferentes estados de Venezuela 10 y, recientemente, Martínez y cols., 28 identificaron cuatro cepas de K. pneumoniae productoras de carbapenemasas por métodos fenotípicos, y la RCP demostró la co-existencia de los genes bla_{NDM} y bla_{KPC} en las cuatro cepas.

En Latinoamérica, K. pneumoniae es la principal productora de KPC y NDM-129 y se ha demostrado que es la primera en causar la transmisión del gen $bla_{\text{NDM-1}}$ a otras enterobacterias como las del complejo E. cloacae, siendo la segunda especie resistente a carbapenems aislada en este estudio. Si bien la presencia de carbapenemasas es poco frecuente en el complejo E. cloacae, en la última década se han descrito carbapenemasas de clase A (en especial KPC), clase B y clase D (en especial OXA-48) con frecuencias variables entre países, lo que ha contribuido al aumento de la resistencia a carbapenémicos y dificultado su manejo³⁰. En este trabajo se observó mayor aislamiento de bla_{NDM-1} (66,7%) en comparación con bla_{KPC} (33,3%) en el complejo *E. cloacae*. Estos resultados son similares a los observados en un estudio previo donde, se reportó una alta incidencia (72,7%) y propagación endémica de aislados de E. cloacae resistentes a carbapenem, productores de la enzima tipo NDM-1³¹, lo que indica la diseminación de este gen hacia especies diferentes a K. pneumoniae.

El hecho de que en este estudio se encontró mayor frecuencia del gen $bla_{{\rm NDM-1}}$ en comparación con el gen bla_{KPC}, tanto en K. pneumoniae como en el complejo E. cloacae, resulta preocupante, ya que NDM-1 ha sido reconocido como una alarma epidemiológica y, por lo tanto, un importante tema de salud pública debido a que su rápida diseminación dificulta su control en las enfermedades infecciosas³². Estudios sugieren que parece haber una posible transferencia de $bla_{{}_{\mathrm{NDM-1}}}$ in vivo desde K. pneumoniae a E. coli o viceversa³³. Esto se explica porque NDM-1 puede encontrarse en plásmidos conjugativos³². Este tipo de plásmidos tiene la capacidad de promover la diseminación horizontal de un gran número de genes de resistencia, contribuyendo al incremento de las poblaciones bacterianas resistentes y promoviendo la aparición de cepas patógenas multi-resistentes³⁴. De esta manera, poseen una amplia variedad de hospederos e incluso garantiza su fácil transferencia entre géneros de la familia Enterobacteriaceae, así como en Pseudomonas spp. 32.

Teniendo en cuenta que los carbapenem son el último recurso para tratar infecciones graves causadas por Enterobacteriaceae, es obligatorio controlar la diseminación de los mecanismos de resistencia a estos antimicrobianos³. La producción de carbapenemasas puede ser identificada a través de pruebas fenotípicas implementadas en los laboratorios de microbiología. Debido a la versatilidad de

— 🎇 🏋 Ci Laboratorio e Infectología

estas enzimas, hasta la fecha, no existe una sola prueba fenotípica con la suficiente capacidad de detección y diferenciación de todos los tipos de enzimas que existen. En la actualidad, el uso de métodos moleculares basados en la RPC, constituye la técnica más confiable de detección de este tipo de enzimas. La elevada especificidad y sensibilidad, y el poco tiempo requerido, hacen de las técnicas moleculares las más apropiadas^{35,36}.

Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el empleo de diferentes métodos fenotípicos permite sugerir el tipo de enzima presente en el microorganismo, ya que se observó 100% de concordancia en los resultados obtenidos por esta metodología en comparación con la RPC, lo que adquiere gran importancia, sobre todo en los laboratorios con recursos limitados, que no cuentan con los reactivos y equipos necesarios para la aplicación de técnicas moleculares que permitan la detección del gen específico que produce la carbapenemasa.

Una de las limitantes del trabajo es no poder realizar la relación genética entre los aislados mediante electroforesis de campo pulsado o por ERIC-PCR (en inglés *enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based PCR*), por lo que en este momento no es posible determinar cuáles son los clones que circulan en el estado Aragua. La rápida detección de bacterias

productoras de carbapenemasas y la diferenciación del tipo de enzima presente, es de gran importancia para estudios epidemiológicos que permitirían tomar medidas de control con el fin de evitar la diseminación de estas bacterias a nivel hospitalario.

Conclusiones

El presente estudio muestra que 2,64% de las enterobacterias aisladas en el período establecido son resistentes a carbapenémicos y de éstas, 87,5% son portadoras del gen bla_{NDM-1} , y 12,5% poseen el gen bla_{KPC} . Las especies identificadas como portadoras de estos genes fueron K. pneumoniae y complejo E. cloacae. Este estudio representa el primer reporte de enterobacterias productoras de carbapenemasas tipo NDM-1 en el estado Aragua, Venezuela.

Agradecimientos. Al Laboratorio Clínico Delgado Launois, por permitirnos realizar parte del trabajo en sus instalaciones, y al Dr. Marcos De Donato de la Escuela de Ingeniería y Ciencias del Tecnológico de Monterrey, por facilitarnos los cebadores para amplificar el gen $bla_{\rm KPC}$ y los ADN utilizados como control en este trabajo.

Referencias bibliográficas

- Wang J, Wu U, Lauderdale T, Chen M, Li S, Hsu L, et al. Carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae in Taiwan. PLoS One 2015; 10:e0121668. doi: 10.1371/journal. pone.0121668.
- 2.- Hammoudi D, Ayoub Moubareck C, Aires J, Adaime A, Barakat A, Fayad N, et al. Countrywide spread of OXA-48 carbapenemase in Lebanon: surveillance and genetic characterization of carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in 10 hospitals over a one-year period. Int J Infect Dis. 2014; 29: 139-44. doi: 10.1016/j.ijid.2014.07.017.
- García M. Carbapenemasas, una amenaza actual. Rev Cub Med Int Emerg. 2012; 11 (4): 2613-8. https://www.medigraphic.com/pdfs/ revcubmedinteme/cie-2012/cie124e.pdf
- 4.- Navarro F, Calvo J, Cantón R, Fernández-Cuenca F, Mirelis B. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en microorganismos gramnegativos. Enferm Infece Microbiol Clin. 2011; 29-(7): 524-34. doi: 10.1016/j. eimc.2011.03.011.
- Sahin K, Tekin A, Ozdas S, Akin D, Yapislar H, Dilek A, et al. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates.

- Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2015; 14: 44. doi: 10.1186/s12941-015-0105-1.
- 6.- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemaseproducing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009; 9: 228-36. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4.
- 7.- Curiao T, Morosini M, Ruíz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque T, et al. Emergence of bla_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 Klebsiella pneumoniae clones in Spain. J Antimicrob Chemother. 2010; 65: 1608-14. doi: 10.1093/jac/dkq174.
- Walsh T R. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents 2010; 36: S8-14. doi: 10.1016/S0924-8579(10)70004-2.
- Kumarasamy K, Toleman M, Walsh T, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis. 2010; 10:5 97-602. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
- 10.- Cuaical-Ramos N M, Montiel M, Marcano Zamor D. Variabilidad genética de Klebsiella pneumoniae con carbapenemasa tipo KPC proveniente de diferentes estados de Venezuela. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2019; 37 (2): 76-81. doi: 10.1016/j.eimc.2017.12.004.

- 11.- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentyeighth Informational Supplement M100-S28, Wayne, PA (USA), 2018.
- Bauer A W, Kirby W M, Sherris J C, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am J Clin Pathol. 1966; 45 (4): 493-6. PMID: 5908210
- 13.- Servicio Antimicrobianos, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán". Algoritmos 2016 Enterobacterias [Internet]. Buenos Aires: INEI, ANLIS; 2016. Disponible en: http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wpcontent/uploads/2014/10/Algoritmos-2016-Enterobacterias1.pdf.
- 14.- Marcano D, De Jesús A, Hernández L, Torres L. Frecuencia de enzimas asociadas a sensibilidad disminuida a betalactámicos en aislados de enterobacterias, Caracas, Venezuela. Rev Panam Salud Pública 2011; 30 (6): 529-34. PMID: 22358397.
- 15.- Velásquez J, Hernández R, Pamo O, Candiotti M, Pinedo Y, Sacsaquispe R, et al. Klebsiella pneumoniae resistente a los carbapenemes. Primer caso de carbapenemasa tipo KPC en Perú. Rev Soc Perú Med Interna 2013; 26 (4):

202 www.revinf.cl Rev Chilena Infectol 2021; 38 (2): 197-203

Laboratorio e Infectología 🛴 🔭 🗀



- 192-6. http://revistamedicinainterna.net/index. php/spmi/article/view/214.
- 16.- Pires A, Novais L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of device carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol. 2013; 51 (12): 4281-3. doi: 10.1128/JCM.01634-13.
- 17.- Pasteran F, González L, Albornoz E, Bahr G, Vila A, Corso A. Triton Hodge test: improved protocol for modified Hodge test for enhanced detection of NDM and other carbapenemase producers. J Clin Microbiol. 2016; 54 (3): 640-9. doi: 10.1128/JCM.01298-15.
- 18.- Zhang K, Sparling J, Chow B, Elsayed S, Hussain Z, Church D. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of Staphylococcus aureus from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol. 2004; 42 (11): 4947-55. doi: 10.1128/JCM.42.11.4947-4955.2004.
- 19.- Poirel L, Walsh T, Cuvillier V, Nordmann P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 70 (1): 119-23. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
- 20.- Mlynarcik P, Roderova M, Kolar M. Primer evaluation for PCR and its application for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9 (1): e29314. doi: 10.5812/jjm.29314.
- 21.- Somily A, Garaween G, Abukhalid N, Absar M, Senok A. Comparison of molecular and phenotypic methods for the detection and characterization of carbapenem resistant Enterobacteriaceae. Acta Microbiol Immunol Hung. 2016; 63 (1): 69-81. doi: 10.1556/030.63.2016.1.5.
- 22.- van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Virulence 2017; 8 (4): 460-9. doi: 10.1080/21505594.2016.1222343.
- 23.- Logan L, Weinstein R. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace.

- J Infect Dis. 2017; 215 (suppl 1): S28-S36. doi: 10.1093/infdis/jiw282.
- 24.- Lespada M, Córdova E, Roca V, Gómez N, Badia M, Rodríguez C. Bacteremia caused by Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)producing K. pneumoniae. A retrospective study of 7 years. Rev Esp Quimioter. 2019; 32 (1): 15-21. PMID: 30512080. https://seq.es/wpcontent/uploads/2018/12/lespada04dec2018.
- 25.- Cejas D, Elena A, Guevara Nunez D, Sevillano Platero P, De Paulis A, Magariños F, et al. Changing epidemiology of KPCproducing Klebsiella pneumoniae in Argentina: emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. J Glob Antimicrob Resist. 2019; 18: 238-42. doi: 10.1016/j. jgar.2019.06.005.
- 26.- Maya J J, Ruiz S J, Blanco V M, Gotuzzo E, Guzman-Blanco M, Labarca J, et al. Current status of carbapenemases in Latin America. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013; 11 (7): 657-67. doi: 10.1586/14787210.2013.811924.
- 27.- De Sousa L, Chacare M, Cuaica N, Ashby J. Primer aislamiento de Escherichia coli productora de carbapenemasa tipo New Delhi (NDM) en un hospital de Ciudad Guayana, Venezuela. A propósito de dos casos. Rev Soc Ven Microbiol. 2016; 36 (2): 40-5. http:// ve.scielo.org/pdf/rsvm/v36n2/art03.pdf
- 28.- Martínez D, Caña L, Rodulfo H, García J, González D, Rodríguez L, et al. Characteristics of dual carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae strains from an outbreak in Venezuela: a retrospective study. Rev Panam Salud Publica 2020; 44: e50. doi: 10.26633/ RPSP. 2020.50.
- 29.- Resurrección C, Montenegro J, Chiappe A, Vargas R, Cucho C, Mamani D, et al. Klebsiella pneumoniae Nueva Delhi metalobetalactamasa en el Hospital Nacional Dos de Mayo. Lima, Perú. Rev Per Med Exp Salud Pública 2017; 34 (2): 261-7. doi: 10.17843/ rpmesp.2017.342.2615.
- 30.- Silva F, Martínez O. Complejo Enterobacter

- cloacae. Rev Chilena Infectol. 2018: 35 (3): 297-8. doi: 10.4067/s0716-10182018000300297.
- 31.- Liu C, Oin S, Xu H, Xu L, Zhao D, Liu X, et al. New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM-1), the dominant carbapenemase detected in carbapenem-resistant Enterobacter cloacae from Henan Province, China. PLoS One. 2015; 10 (8): e0135044. doi: 10.1371/journal. pone.0135044.
- 32.- Walsh T, Weeks J, Livermore D M, Toleman M. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect Dis. 2011; 11 (5): 355-62. doi: 10.1016/S1473-3099(11)70059-7.
- 33.- Yong D, Toleman M, Giske C, Cho H, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla_{NDM-1} , and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53 (12): 5046-54. doi: 10.1128/AAC.00774-09.
- 34.- Narváez P, Pedroza R, Alonso G, Rodríguez-Lemoine V. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. Rev Soc Ven Microbiol. 2005; 25 (1): 29-34. http://ve.scielo.org/ scielo.php?script=sci arttext&pid=S1315-25562005000100006&lng=es&nrm=iso&tlng=
- 35.- Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter S, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. Gut Pathog. 2014; 613. doi: 10.1186/1757-4749-6-13.
- 36.- Villegas M V, Jiménez A, Esparza G, Appel T M. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: A diagnostic, epidemiological and therapeutic challenge. Infectio. 2019; 23 (4): 358-68. doi: 10.22354/ in.v23i4.808.

203