

## Primer aislamiento de *Salmonella* Javiana con portación de KPC-2 en Paraguay

### *First isolation of Salmonella Javiana with KPC-2 in Paraguay*

Melgarejo T., Nancy<sup>1</sup>, Martínez Mario<sup>1</sup>, Rossana Franco<sup>1</sup>, Falcón Miryan<sup>1</sup>, Álvarez, Mercedes<sup>1</sup>, Ortiz Helena<sup>1</sup>, Irala Juan<sup>2</sup>.

#### RESUMEN

Varios mecanismos de resistencia a diversos agentes antimicrobianos que se han incorporado al arsenal terapéutico, han emergido en los últimos años, destacando la aparición de carbapenemasas en enterobacterias, siendo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) una de las más importantes, identificada originalmente en los Estados Unidos en 1996.

En Paraguay, los primeros aislamientos de cepas portadoras de carbapenemasa tipo KPC se obtuvieron en septiembre del año 2009, a partir del cual se confirmaron la presencia en varias especies de enterobacterias, siendo *Klebsiella pneumoniae* la de mayor prevalencia entre ellas.

Según datos del centro de referencia, *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium es el serovar más común identificado en muestras de heces hasta la fecha, y el serotipo Javiana el cuarto.

En este informe se describe el primer aislamiento resistente a carbapenemes por carbapenemasa del tipo KPC-2 en *Salmonella* entérica serotipo Javiana aislado en febrero de 2015 de una muestra fecal. Además, en muestras de la misma paciente, fueron aisladas las especies *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenemes por presencia de la misma enzima (KPC-2) en secreción orotraqueal y *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina en muestra fecal.

Este hallazgo, confirma la portación del gen que codifica para la carbapenemasa tipo KPC-2 por cepa de *Salmonella* entérica, y que el mismo ocurre en un serotipo poco frecuente (serotipo Javiana). Además, la recuperación en otra muestra de la paciente de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC-2 evidencia la diseminación de este mecanismo de resistencia entre las enterobacterias.

**Palabras claves:** *Salmonella*, KPC, carbapenemasas, enterobacterias.

#### ABSTRACT

At the global level have emerged over the years, microorganisms resistant to various antimicrobial agents that have been incorporated to the therapeutic arsenal. Several mechanisms of resistance have emerged in recent years, highlighting the emergence of carbapenemases in enterobacterias, entity which *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC), being one of the most important, originally identified in the United States in 1996.

In Paraguay, the first isolates of KPC carbapenemase-carrying strains were obtained in september 2009, from which the presence of several Enterobacteria species was confirmed, with *Klebsiella pneumoniae* being the most prevalent among them.

According to data from the reference center, *Salmonella* enterica serotype Typhimurium is the most common serovar identified in stool samples to date, and the Javiana serotype the fourth.

This report describes the first KPC-2 carbapenemase isolate in *Salmonella* enterica serovar Javiana isolated in February 2015 from a fecal sample. In addition, in samples from the same patient, *Klebsiella pneumoniae* species resistant to carbapenems were isolated by the presence of the same enzyme (KPC-2) in orotracheal secretion and vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in fecal samples.

**Key words:** *Salmonella*, KPC, carbapenemases, enterobacterias.

Recibido el 6 de octubre de 2017, aprobado el 12 de diciembre de 2017

Melgarejo T., Nancy<sup>1</sup>, Martínez Mario<sup>1</sup>, Rossana Franco<sup>1</sup>, Falcón Miryan<sup>1</sup>, Álvarez, Mercedes<sup>1</sup>, Ortiz Helena<sup>1</sup>, Irala Juan<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Laboratorio Central de Salud Pública, Dpto. Bacteriología y Micología, Asunción, Paraguay

<sup>2</sup> Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, Instituto de Medicina Tropical, Laboratorio de Bacteriología, Asunción, Paraguay

Correspondencia: Nancy Melgarejo: nmtouchet@gmail.com

## INTRODUCCION

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa (KPC) se identificó originalmente en los EE.UU. en 1996. Desde entonces, se han expandido a nivel internacional entre las bacterias Gram negativas, especialmente en *K. pneumoniae*, aunque su epidemiología es diversa en todos los países y regiones. La mortalidad en los pacientes infectados con organismos positivos para KPC es alta, tal vez como resultado de las opciones terapéuticas limitadas (a menudo colistina, tigeciclina, o aminoglucósidos) <sup>(1,2)</sup>.

Argentina reportó los primeros casos en el año 2006, en cepas de una *K. pneumoniae* y *C. freundii* aisladas de colección abdominal de una paciente transplantada <sup>(3)</sup>.

En Paraguay, los primeros aislamientos de cepas portadoras de carbapenemasa tipo KPC aparecieron en setiembre del año 2.009, en cepas de *K. pneumoniae* y *E. cloacae*, simultáneamente en 2 centros hospitalarios de Asunción, la capital del país <sup>(4)</sup>.

## DESCRIPCION DEL CASO

La cepa de *Salmonella* aislada, provino de una paciente de sexo femenino, de 1 año 4 meses de edad, quien ingresó a la unidad de cuidados intensivos (UCI) de un centro hospitalario de Asunción, Paraguay, por cuadro de insuficiencia respiratoria aguda, remitida desde un hospital de Ciudad del Este, distante a 325 km, donde estuvo hospitalizada 14 días. La paciente además presentaba al ingreso cuadro de desnutrición proteico-calórica (Marasmo-Kwashiorkor). Estudios laboratoriales para VIH y RK 39 resultaron negativos. En el Hospital de Ciudad del Este fue aislada *K. pneumoniae* portadora de beta-lactamasa de espectro extendido a partir de una muestra del aparato respiratorio. Posteriormente, ya internada en UCI fueron aislados otros gérmenes multirresistentes de diferentes muestras clínicas: Enterococo Vancomicina Resistente a partir de heces y *K. pneumoniae* multiresistente de una muestra de punción pulmonar; la cual fue remitida al Laboratorio Central de Salud Pública, laboratorio de referencia nacional, para estudios de portación de mecanismos de resistencia. También, a partir de una muestra de heces, se aisló *Salmonella* sp., y ante la observación de halos reducidos frente a carbapenemes por el método de difusión de *Kirby Bauer* <sup>(9)</sup> la cepa fue remitida al laboratorio de referencia nacional.

A partir de esos aislamientos, fueron detectados en otros centros asistenciales, incluyendo el interior del país. Además fue confirmada la presencia de la enzima en varias otras especies de enterobacterias, siendo *K. pneumoniae* la prevalente entre todas ellas; sin embargo, ninguna en *Salmonella* spp., en el que es poco frecuente <sup>(5,6,7,8)</sup>.

En cuanto a las cepas de *Salmonella* spp., la Sección Enteropatógenos del Laboratorio Central de Salud Pública confirmó en el año 2.014 que de las 73 cepas remitidas para estudios de serotipificación, solo el 8% correspondieron al serotipo Javiana, siendo Typhimurium el prevalente (33%).

Este es reporte del primer caso de hallazgo de esta enzima en el género *Salmonella* en nuestro país, aislada de una paciente pediátrica, y uno de los pocos reportados en la región. Además, fueron aislados en muestras de la misma paciente otros gérmenes multirresistentes.

## RESULTADOS

**Tipificación:** La cepa de *Salmonella* sp. fue identificada por pruebas bioquímicas utilizando el Manual de Procedimientos del Servicio de Enteropatógenos del Laboratorio de Referencia <sup>(10)</sup> y los estudios de serotipificación se realizaron con antiseros específicos Denka-Seiken <sup>(11)</sup> que confirmaron a la cepa como serotipo Javiana.

**Sensibilidad:** Los estudios de sensibilidad fueron realizados por los métodos de difusión de discos (*Kirby Bauer*), Concentración Inhibitoria Mínima por el método epsilométrico (E-test <sup>(9)</sup>) y con el equipo automatizado (VITEK-2 Compact <sup>(9)</sup>). Tabla 1.

**Tabla 1. Susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella Javiana* portadora de carbapenemasa, aislada de la paciente internada en UCI**

| Antibióticos                | Halos de inhibición (mm) | CIM (ug/ml): E-test | CIM(ug/ml): VITEK-2compact |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------|
| Ampicilina                  | 6                        | >256                | NT                         |
| Amoxicilina/Ac. clavulánico | 6                        | >256                | NT                         |
| Ceftazidima                 | 6                        | 32                  | 16                         |
| Gentamicina                 | 24                       | 2                   | ≤1                         |
| Amikacina                   | 21                       | 4                   | NT                         |
| Ciprofloxacina              | 34                       | 0,094               | ≤0,25                      |
| Levofloxacina               | 32                       | 0,094               | NT                         |
| Piperacilina/Tazobactam     | 8                        | >256                | ≥128                       |
| Trimetoprim/Sulfametoxazol  | 30                       | 0,047               | ≤20                        |
| Tetraciclina                | 18                       | 2                   | NT                         |
| Cloranfenicol               | 28                       | 6                   | NT                         |
| Imipenem                    | 16                       | >32                 | ≥16                        |
| Meropenem                   | 16                       | >32                 | ≥16                        |
| Colistin                    | 14                       | 1                   | ≤0,5                       |

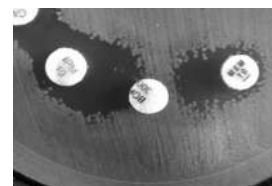
NT: No testado

**Estudios fenotípicos:** Las pruebas fenotípicas realizadas a ambas cepas fueron: Test de Hogde modificado (Foto 1) siguiendo pautas del CLSI<sup>(9)</sup>, BLUE CARBA-método colorimétrico para detección rápida de carbapenemasas<sup>(12,13,14,15)</sup> siendo ambos resultados positivos y el método de inactivación del carbapenem<sup>(16)</sup> arrojó 6 mm de diámetro para el meropenem.

Además se llevaron a cabo las pruebas de sinergia, utilizando los discos de ethylen diamino tetra acético (EDTA) para la detección de carbapenemasas del tipo metalo-beta-lactamasa (MBL) y de ácido fenil borónico (PBA) para carbapenemasas clase A, obteniendo resultado positivo solo para la prueba con el PBA (Foto 2), sugiriendo la presencia de carbapenemasa de clase A en ambas cepas.

**Estudios genotípicos:** La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) evidenció la presencia del gen que codifica para la enzima carbapenemasa KPC. El protocolo de amplificación utilizado: desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, annealing a 50°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min, y

extensión final a 72°C por 10 min<sup>(17)</sup> (termociclador THERMO Electrón Corporation (PXE 0,5 Thermal Cycler). Los productos de la amplificación separamos por electroforesis en gel de agarosa 2%, en buffer TAE 0,5 X y teñidos con bromuro de etidio al 1% para una observación posterior con luz UV con el equipo BIORAD UV Transilluminator 2000.

**Foto 1. Prueba de HODGE modificada****Foto 2. Prueba de sinergia IMP-APB-MEM**

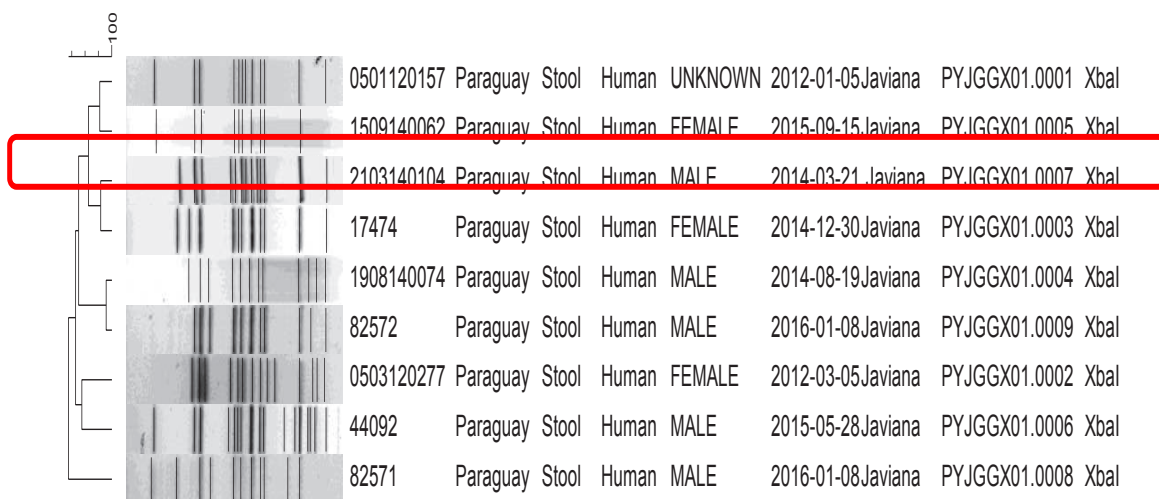
**Tabla 2. Cebadores utilizados para detección molecular de genes de resistencia.**

| Cebadores               | Secuencia 5' .... 3'          |
|-------------------------|-------------------------------|
| <i>bla</i> KPC-F        | AAC AAG GAA TAT CGT TGA TG    |
| <i>bla</i> KPC-R        | AGA TGA TTT TCA GAG CCT TA    |
| <i>bla</i> CTX-MU-F     | ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT    |
| <i>bla</i> CTX-MU-R     | TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA   |
| <i>bla</i> CTX-M2-PLUS  | CGGAATTCATGATGACTCAGAGCATTTCG |
| <i>bla</i> CTX-M2-MINUS | GCTCTAGATTATTGCATCAGAAACCGTG  |
| <i>bla</i> PER-2-PLUS   | GTAGTATCAGCCCAATCCCC          |
| <i>bla</i> PER-2-MINUS  | CCAATAAAGGCCGTCCATCA          |

Los cebadores (primers) utilizados para la detección molecular (PCR) de mecanismos de resistencia antimicrobiana se detallan en la Tabla 2. Además de cebadores para la búsqueda de KPC, también fueron utilizados otros para la detección de beta lactamasas de espectro extendido (CTX-MU y PER-2)

**Estudios de relación genética:** La subtipificación molecular se realizó por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) con equipo CHEFF DR

III-BioRad®, enzima de restricción XbaI (Promega, EE.UU.), cepa estándar CDC-H98-12 (Salmonella Braenderup), de acuerdo al protocolo estandarizado de Pulse Net internacional para *Salmonella*(18,19) el análisis del patrón de restricción obtenido se realizó con el software Gelcompare II versión 5.1, el cual mostró que el aislamiento posee un patrón único XbaI de *Salmonella* Javiana diferente a todos los patrones presentes actualmente en la Base de Datos Nacional. (Figura 1).



**Figura 1. Dendrograma de relación genética correspondiente a patrones únicos de Salmonella Javiana presentes en Base de Datos Nacional (BDN)**

**Estudios de secuenciación:** El estudio de secuenciación fue realizado por Macrogen, y los resultados fueron analizados por National Center for Biotechnology Information (NCBI BLAST). Para ello fue utilizada la secuencia de *bla*KPC genérica. El resultado obtenido revela una identidad del 100% con la variante KPC-2 (*Klebsiella pneumoniae* ssp. *pneumoniae* HS11286 plasmid pKPHS2,

que contiene el gen de la carbapenemasa *bla* KPC-2<sup>(20)</sup>. **Otros resultados:** La cepa *K. pneumoniae* aislada de la punción pulmonar de la misma paciente resulto ser portadora de varios genes de resistencia: CTX-M2, Qnr B, *aac*(6')-Ib-cr, KPC-2 (este último sometido también a estudio de secuenciación) y Concentración Inhibitoria Mínima para colistin 12 ug/ml.

**Referencia de las cepas:** Macrogen: Orden número 151210FN-007

## DISCUSION Y CONCLUSIÓN

Publicaciones hechas en la región revelan que cepas de *Salmonella* spp. portadoras de KPC son extremadamente raras(5,6,7), siendo este aislamiento en el año 2015 el primero y el único, hasta la fecha reportado en Paraguay.

Este hallazgo, además de confirmar la portación del gen que codifica para la carbapenemasa por cepa de *Salmonella entérica*, revela que el mismo ocurre en un serotipo poco frecuente (8% en el año 2014), e incluso analizando los patrones genéticos de los aislados en el país, se vio la no relación clonal entre los mismos.

Los estudios de secuenciación han revelado que la secuencia de la enzima tiene 100% de similitud con la variante KPC-2, lo cual confirma la circulación de dicha variante en Paraguay.

## AGRADECIMIENTO

A Diego Faccone. ANLIS Dr. C. G. Malbrán. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriología. Servicio de Antimicrobianos. Buenos Aires, Argentina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, Cornaglia G, Garau J, Gniadkowski M, Hayden MK, Kumarasamy K, Livermore DM, Maya JJ, Nordmann P, Patel JB, Paterson DL, Pitout J, Villegas MV, Wang H, Woodford N, Quinn JP. 2013. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect. Dis.* 13:785–796. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70190-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70190-7).
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. 2001. Novel carbapenemhydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1151–1161. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>.
- Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccone D, Di Martino A, Galas M. 2008. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1178–1180. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1407.070826>.
- Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Lird G, Laconich M, Aguilar G. Detección de carbapenemasa (KPC) en *Enterobacter* en un hospital de Asunción, Paraguay. VII Congreso paraguayo de Infectología. I Jornada de Microbiología Clínica. V Jornada de Enfermería. 6, 7, 8 de noviembre de 2009.
- Jure, M. A., Duprilot, M., Musa, H. E., López, C., de Castillo, M. C., Weill, F. X., Decré, D. Emergence of KPC-2-Producing *Salmonella enterica* Serotype Schwarzengrund in Argentina. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014;58 (10), 6335–6336. <http://doi.org/10.1128/AAC.03322-14>
- Rodríguez, E., Bautista, A., & Barrero, L. First Report of a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolate with Carbapenemase (KPC-2) in Colombia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2014;58(2), 1263–1264. <http://doi.org/10.1128/AAC.02423-13>
- Miriagou, V., Tzouveleki, L. S., Rossiter, S., Tzelepi, E., Angulo, F. J., & Whichard, J. M. Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2003; 47(4), 1297–1300. <http://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1297-1300.2003>.
- Melgarejo N, Martínez M, Franco R, Falcón M. *Enterobacterias* resistentes a Carbapenemes por producción de KPC, aisladas en hospitales de Asunción y Departamento Central. *Revista de Salud Pública del Paraguay.* 2013; 3(1):30-5.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2015.
10. Manual de Procedimientos Detección de patógenos asociados a Enfermedad Diarreica Aguda, Incluyendo Vibrio Cholerae. INEI. ANLIS. Organización Panamericana de la Salud, 2011.
11. Antigenic Formulae of the Salmonella serovars. Patrick A.D. Grimont and Francois-Xavier Weill. OMS. 2007.
12. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 4281-3
13. Pasteran F, Veliz O, Lucero C, Rapoport M, Ceriana P, Corso A. Blue Carba Test (BCT) for Rapid Detection of Carbapenemases in Gram negative Species: Performance against a Panel of Challenging Carbapenemases. 54th ICAAC, Abstract 963; 2014.
14. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 1503–1507.
15. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, et al. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. *PLoS ONE.* 2015;10(3):e0123690. doi: 10.1371/journal.pone.0123690
16. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016; 71(1):274-276.
17. Protocolo de PCR para detección de carbapenemasas. Servicio Antimicrobianos, Dpto. Bacteriología, Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas Dr. Carlos Malbran. [Internet]. [Acceso 28 de setiembre 2017] Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/2013/02/protocolo-de-pcr-para-la-deteccion-del-gen-oxa-48-en-aislamientos-de-bacilos-gram-negativos/>
18. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of Escherichia coli O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* 2006; 3:59–67. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>.
19. PulseNet International, 2013. Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Escherichia coli O157:H7, Escherichia coli non-O157 (STEC), Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri. PNL05, effective date 03-04-2013. [Internet]. [Acceso 28 de setiembre 2017]. Disponible en: [http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05\\_Ec-SalShigPFGEprotocol.pdf](http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL05_Ec-SalShigPFGEprotocol.pdf)
20. Liu P. Complete genome sequence of Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum. *J Bacteriol.* 2012; 194(7):1841–1842.