

David Sánchez Fabra^{a,*}, Tina Herrero Jordán^b^a F.E.A (Facultativo Especialistas de Área) de Medicina Interna, Servicio de Medicina Interna del Hospital Reina Sofía de Tudela, Tudela, Navarra, Spain^b F.E.A (Facultativo Especialista de Área) de Neumología, Servicio de Medicina Interna del Hospital Reina Sofía de Tudela, Tudela, Navarra, Spain**Double N501Y mutation hindering its detection by RT-PCR kit widely used at Clinical Microbiology laboratories****Doble mutación en N501Y que impide su identificación mediante un kit de RT-PCR de uso habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica**

Next-generation sequencing (NGS) techniques have become an indispensable tool for the study and control of the SARS-CoV-2 virus pandemic¹. The sequencing of the complete viral genome has been vital not only to the development of vaccines and specific drugs, but also to the discovery and monitoring of the variants of interest which, since the appearance of what is now known as the alpha variant², have occurred and been related to the specific resurgences of the pandemic. However, and despite the efforts made by microbiology laboratories all over the world, there is insufficient sequencing capacity to characterise all SARS-CoV-2 positive samples with this technology. For this reason, different strategies have been developed for the characterisation of the virus by means of RT-PCR of known combinations of mutations^{3–5}. However, the limitations involved in this type of study, which can lead to an erroneous variant assignment, must not be forgotten^{6,7}.

Currently, in our department, all the first samples of an episode with Cts under 32 are characterised using the AllplexTM Variants I&II (Seegene, Korea) panels, which study the most relevant spike mutations in the latest variants of interest (H69/V70-, W152C, K417N, K417T, L452R, E484K and N501Y). As of February 2022, in a scenario totally dominated by the Omicron variant, the samples that presented the H69/V70-, K417N and N501Y mutations were classified as Omicron by RT-PCR. If the deletion was not present, they were considered to belong to the BA.2 subvariant by RT-PCR.

Given the appearance of a sample with H69/V70- and K417N, but without N501Y, the decision to do sequencing was taken, since these results did not allow it to be assigned to any variant by RT-PCR. To do this, an adaptation of the ARTIC protocol for Oxford Nanopore was used by amplifying the entire genome with the VarSkip scheme⁸. The resulting library was processed in a MinION mk1c sequencer (Oxford Nanopore). The readings obtained were subsequently assembled using the ARTIC pipeline for data obtained from sequencers with Oxford Nanopore technology and analysed using the Nextstrain web app⁹ with consistency verified using the Integrative Genomics Viewer (IGV) program¹⁰.

The sequence obtained (deposited in GISAID as EPI_ISL_10968563) belongs to the 21K clade (Omicron) and to the BA.1.17 lineage and presented, among other characteristic spike mutations, the three mutations used by the Allplex Variants I&II scheme: H69/V70-, K417N and N501Y; although, the N501Y mutation, in addition to the usual A23063T change, also had T23065C. All mutations were found with sufficient coverage. In

* Corresponding author.

E-mail address: dauidsanchezfabra@gmail.com (D. Sánchez Fabra).<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.04.007>

0213-005X/ © 2022 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

this case, T23065C accompanying A23063T produces a silent mutation since the codon they form continues to encode a tyrosine and maintains the N501Y mutation.

Therefore, this mutation is not expected to involve an evolutionary advantage for the virus or a fundamental change in its behaviour. However, it may pose a problem for characterisation schemes based on the study of specific mutations, such as the one we currently use in our laboratory; since if this change had occurred, for example, in a variant of the BA.2 lineage in the Allplex Variants I&II panels, only the K417N mutation would be positive.

In summary, we believe that this case is a further example of the enormous utility offered by NGS in Clinical Microbiology laboratories today, since it allows us not only to correctly assign circulating variants but also to monitor the evolution of the same variants.

References

1. Oude Munnink BB, Nieuwenhuijse DF, Stein M, O'Toole Á, Haverkate M, Mollers M, et al. Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. *Nat Med*. 2020;26:1405–10.
2. Rambaut A, Loman N, Pybus OG, Barclay W, Barrett J, Carabelli A, et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations – SARS-CoV-2 coronavirus/nCoV-2019 genomic epidemiology. *Virological*. 2020 [Accessed 17 March 2022]. Available from: <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>
3. Ong DSY, Koeleman JGM, Vaessen N, Breijer S, Paltansing S, de Man P. Rapid screening method for the detection of SARS-CoV-2 variants of concern. *J Clin Virol*. 2021;141:104903.
4. Nörz D, Grunwald M, Olearo F, Fischer N, Aepfelbacher M, Pfefferle S, et al. Evaluation of a fully automated high-throughput SARS-CoV-2 multiplex qPCR assay with built-in screening functionality for del-HV69/70- and N501Y variants such as B.1.1.7. *J Clin Virol*. 2021;141:104894.
5. Kami W, Kinjo T, Arakaki W, Oki H, Motooka D, Nakamura S, et al. Rapid and simultaneous identification of three mutations by the NovaplexTM SARS-CoV-2 variants I assay kit. *J Clin Virol*. 2021;141:104877.
6. Alejo-Cancho I, Gual-de-Torrella A, Gallego M, Urrutikoetxea-Gutierrez M, Lejarraga C, López de Goikotxea MJ. Misidentification of the SARS-CoV-2 Mu variant using commercial mutation screening assays. *Arch Virol*. 2022 [Accessed 17 March 2022]. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s00705-022-05395-w>
7. Camp JV, Buchta C, Jovanovic J, Puchhammer-Stöckl E, Benka B, Griesmacher A, et al. RT-PCR based SARS-CoV-2 variant screening assays require careful quality control. *J Clin Virol*. 2021;141:104905.
8. VarSkip multiplex PCR designs for SARS-CoV-2 sequencing. New England Biolabs Inc.; 2021 [Accessed 17 March 2022]. Available from: <https://github.com/nebiolabs/VarSkip>
9. Hadfield J, Megill C, Bell SM, Huddleston J, Potter B, Callender C, et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018;34:4121–3.
10. Integrative genomics viewer | Nature Biotechnology. [Accessed 6 June 2022]. Available from: <https://www.nature.com/articles/nbt.1754>

Mikel Urrutikoetxea-Gutierrez^{a,b,*},
Domingo Fernández Vecilla^{a,b}, María Carmen Nieto Toboso^{a,b},
José Luis Díaz de Tuesta Del Arco^{a,b}

^a Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario Basurto, Bilbao, Spain

^b Grupo de Microbiología y Control Infección, IIS Biocruces Bizkaia, Barakaldo, Spain

* Corresponding author.

E-mail address: mikel.j.urruti@gmail.com
(M. Urrutikoetxea-Gutierrez).

<https://doi.org/10.1016/j.eimce.2022.10.010>

2529-993X/ © 2022 Published by Elsevier España, S.L.U.
on behalf of Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

***Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta ST23 como causa de neumonía cavitada y sepsis**



Cavitary pneumonia and sepsis caused by ST23 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*

Paciente de 42 años, búlgaro que vive en la calle, fue llevado a urgencias por la ambulancia debido a cuadro progresivo de disnea con comienzo 72 h antes. También presentaba expectoración hemoptoica, dolor en hemitórax derecho y fiebre > 38,5 °C. Como antecedentes médicos destacaban diabetes mellitus tipo 2, infección pasada de hepatitis C y bebedor de 1 l de cerveza al día. A la exploración presentaba mal estado general, sudoración profusa, crepitantes en lóbulo superior derecho pulmonar, taquipnea (> 40 rpm) con trabajo respiratorio global y saturaciones de oxígeno < 85% a pesar de gafas nasales de oxígeno de alto flujo. En la analítica de sangre destacaban una PCR de 256,29 mg/l (0-5) y una procalcitonina de 17,06 ng/ml (0-0,5), bilirrubina de 6,5 mg/dl (< 1,2), $10,94 \times 10^3/\mu\text{l}$ leucocitos (4,50-11,00) en niveles normales cercanos al límite superior con $8,85 \times 10^3$ neutrófilos (2,0-5,0), 43×10^3 plaquetas (135-450), dímero D de 3.300 ng/ml, tiempo de protrombina del 48% (65-120) y fibrinógeno de 691 mg/dl (200-450) compatible con shock séptico de origen respiratorio. También se hallaron GPT de 73 U/l (5-41) y bilirrubina de 6,5 mg/dl (< 1,2). En muestra de serología se observan anticuerpos de hepatitis C mediante inmunoanálisis Elecsys® Anti-HCV II (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) con un valor: 21,40 (positivo > 1), confirmando después mediante técnica *immunoblot* INNO-LIA™ HCV Score (Fujirebio, Tokyo, Japón). Se realiza cuantificación de ARN mediante el sistema Cobas® 4800 (Roche Diagnostics) con resultado indetectable, que confirma ausencia de infección aguda y, por tanto, infección pasada.

Se realizó una tomografía computerizada (TC) toraco-abdominal en la que se informa de gran consolidación en el lóbulo superior derecho (LSD), en el lóbulo medio (LM), pericisural y opacidad nodular en el lóbulo superior izquierdo, compatibles con neumonía (figura 1 a). También se observan signos de hepatopatía crónica con hipertrofia del lóbulo caudado, lóbulo hepático izquierdo y disminución de la densidad de manera difusa, sin observar lesiones focales de sospecha (ver material suplementario). Además, presentaba colelitiasis única sin signos de colecistitis. Se decidió intubación orotraqueal, sufriendo parada cardiorrespiratoria. Se realizaron maniobras de reanimación, requiriéndose desfibrilación a 360J, durante la cual recibió 2 mg de adrenalina y 300 mg de amiodarona. Finalmente, el paciente recuperó el ritmo sinusal y fue ingresado con antibioterapia de amplio espectro con meropenem (1 g/cada 8 h IV), vancomicina (1 g/cada 8 h IV) y levofloxacino (1 g/cada 24 h IV). Previa instauración de antibioterapia se recogieron muestras de orina, hemocultivo y broncoaspirado, aislándose en estas 2 últimas *Klebsiella pneumoniae*, únicamente resistente a ampicilina (ver material suplementario).

El paciente sufrió empeoramiento progresivo, realizándose de nuevo una TC toraco-abdominal con aparición de zonas de cavitación junto con extensa condensación con broncograma aéreo en LSD y LM (figura 1 b) respecto a anteriores pruebas de imagen. A pesar de escalada de tratamiento antibiótico, el paciente progresó hacia situación clínica con abundante hemoptisis, evidenciándose

aumento de las áreas de necrosis y de las cavitaciones (figura 1 b). El paciente falleció 2 días después.

Tanto en la muestra de hemocultivo como en la de broncoaspirado se aisló *Klebsiella pneumoniae* con elevada producción de moco en las placas de cultivo con *string test* positivo (> 5 mm). Previa a la realización de antibiograma se realizó prueba rápida de inmunocromatografía NG-Test CTX-M Múltiple (NG Biotech, Guipry-Messac, Francia) que permite detectar los tipos más frecuentes de betalactamasas de espectro extendido (grupos CTX-M-1, 2, 8, 9 y 25), con resultado negativo. La determinación de la sensibilidad a antimicrobianos se realizó mediante difusión con discos en agar Mueller-Hinton y mediante el panel ID/NMIC 503 (BD™ Phoenix; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

El aislado procedente del broncoaspirado se envió al Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid), donde se realizó la secuenciación genómica completa y se confirmó la ausencia de mecanismos de resistencia. Los datos relacionados con factores de virulencia de la cepa fueron los siguientes: serotipo capsular K1, ST23 (mediante tipificación molecular por *multilocus sequence typing*- MLST), presencia de los genes de virulencia *rmpA* y *rmpA2* (regulador del fenotipo mucóide A, responsable de la hiper mucoviscosidad de la cepa) característicos del patotipo hipervirulento de *Klebsiella pneumoniae* y otros genes de virulencia como *lucABCD-iutA* (que forman el complejo operón del sideróforo aerobactina) e *iroBCN* (perteneciente al cluster de genes del sideróforo salmochelina).

Las cepas pertenecientes al patotipo hipervirulento de *K. pneumoniae* (hvKp) se caracterizan por la capacidad de producir infecciones graves y la diseminación desde el sitio de infección. El factor diferencial y característico de estas cepas frente al fenotipo clásico es la elevada producción de polisacárido capsular, que les confiere la propiedad de hiper mucoviscosidad. Esta característica radica en el gen *magA* (gen A relacionado con la mucoviscosidad, específico del serotipo capsular K1), así como el gen *rmpA/rmpA2* de localización plasmídica y la producción de sideróforos (quelantes de hierro que aumentan la supervivencia bacteriana como aerobactina o salmochelina, entre otros). Esta característica les confiere a las hvKp resistencia a la opsonofagocitosis del suero humano¹. El *string test* o prueba del hilo mucóide permite predecir en la mayoría de los casos la asociación de las cepas con el patotipo hipervirulento, aunque en un pequeño porcentaje cepas con test positivo podrían no mostrar patogenicidad grave como las hvKp. De modo que parece más eficiente utilizar tanto el *string test* como la detección de *rmpA* y otros factores de virulencia como la producción de sideróforos para poder detectar todas las cepas hvKp².

No hay datos epidemiológicos a nivel nacional acerca de la incidencia de estas cepas, aunque Cubero M et al. publicaron un estudio prospectivo en el que estudiaron 878 cepas aisladas en hemocultivos entre los años 2007 y 2013 de *K. pneumoniae* en un hospital de Barcelona. Del total de cepas aisladas, 53 (5,4%) fueron categorizadas como hiper mucoviscosas (*string test*), aunque solo la mitad (28/53) contaban con los genes *magA* y/o *rmpA* siendo categorizadas como hipervirulentas. En este sentido, sería importante realizar más estudios epidemiológicos nacionales para conocer la incidencia de estas cepas³.