

# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Asociación en un mismo plásmido de *bla*<sub>VIM-1</sub> y *qnrS2* en *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella oxytoca* aisladas en Sevilla

José M. Rodríguez-Martínez<sup>a,\*</sup>, M. Carmen Conejo<sup>a</sup>, Paula Díaz de Alba<sup>b</sup>, Lorena López-Cerero<sup>b</sup>, Pedro Fernandez-Echauri<sup>b</sup> y Álvaro Pascual<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

<sup>b</sup> Servicio de Microbiología, Universidad de Sevilla, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 8 de junio de 2011

Aceptado el 10 de septiembre de 2011

On-line el 16 de enero de 2012

#### Palabras clave:

*bla*<sub>VIM-1</sub>

*qnrS*

*Klebsiella*

### R E S U M E N

**Introducción:** La resistencia combinada a quinolonas y β-lactámicos es frecuente en enterobacterias. La aparición en enterobacterias de metalo-β-lactamasas y determinantes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos constituyen un problema emergente en nuestro país.

**Métodos:** La sensibilidad se determinó mediante tiras de E-test. Los genes de resistencia se detectaron mediante PCR y se procedió a la caracterización de los plásmidos portadores.

**Resultados:** En este estudio se describen 2 cepas (1 *Klebsiella oxytoca* y 1 *Klebsiella pneumoniae*) portadoras de los genes *bla*<sub>VIM-1</sub> y *qnrS2* en un plásmido transferible de 70-Kb aisladas en cultivos de vigilancia en el Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

**Conclusión:** Esta es la primera asociación de *bla*<sub>VIM-1</sub> y *qnrS2* en un mismo plásmido no tipable en nuestro centro.

© 2011 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## Combination of *bla*<sub>VIM-1</sub> and *qnrS2* on the same plasmid in *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Seville

### A B S T R A C T

**Background:** Combined resistance to quinolones and β-lactams is common in Enterobacteriaceae. The appearance in enterobacteria coding for metallo-β-lactamases and determinants of plasmid-mediated quinolone resistance are an emerging problem in our country.

**Methods:** The susceptibility was determined by E-test. The resistance genes were detected by PCR and the corresponding plasmids were characterised.

**Results:** This study describes 2 strains (1 *Klebsiella oxytoca*, 1 *Klebsiella pneumoniae*) carrying the genes *qnrS2* and *bla*<sub>VIM-1</sub> in a transferable plasmid of 70-Kb isolated in surveillance cultures at the University Hospital Virgen Macarena in Seville.

**Conclusion:** This is the first combination of *qnrS2* and *bla*<sub>VIM-1</sub> on the same non-typeable plasmid isolated in our centre.

© 2011 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

#### Keywords:

*bla*<sub>VIM-1</sub>

*qnrS*

*Klebsiella*

### Introducción

Los carbapenémicos son los antimicrobianos de elección para el tratamiento de las infecciones por enterobacterias productoras de β-lactamasas de espectro extendido (BLEE). Las metalo-β-lactamasas (MBLs) son enzimas pertenecientes a la clase B de Ambler capaces de hidrolizar a todos los β-lactámicos, incluidos

los carbapenémicos, con la excepción de aztreonam, y su actividad resulta inhibida por EDTA. La aparición de enterobacterias productoras de MBLs empieza a ser un problema clínico y epidemiológico de importancia en España<sup>1,2</sup>.

Los miembros de la familia Qnr son proteínas pentapeptídicas capaces de proteger a las topoisomerasas bacterianas de la acción de las quinolonas. Estas presentan una distribución amplia en diferentes especies de Enterobacteriaceae como determinantes de resistencia a quinolonas mediada por plásmidos (RQMP), junto con el enzima AAC(6')-Ib-cr, una variante de una acetiltransferasa de aminoglucósidos capaz de inactivar quinolonas, y los sistema

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jmrodriguez@us.es (J.M. Rodríguez-Martínez).

de expulsión activa QepA y OqxAB<sup>3</sup>. La prevalencia de estos genes en enterobacterias oscila entre el 1% y >20% dependiendo de las características de las colecciones estudiadas. Los genes *qnr* así como *aac(6')-Ib-cr* se han asociado previamente a BLEEs o MBLs<sup>3–5</sup>.

En este trabajo se describe la asociación de los genes de resistencia *qnrS2* y *bla<sub>VIM-1</sub>* en dos aislados clínicos de *Klebsiella* spp., uno de *K. pneumoniae* y otro de *K. oxytoca*, procedentes del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla en un mismo plásmido transferible. Para nuestro conocimiento esta es la primera descripción de la asociación de los genes *qnrS2* y *bla<sub>VIM-1</sub>* en España.

## Métodos

### Cepas bacterianas

Se estudiaron 2 aislados de *Klebsiella* spp. (1 *K. pneumoniae* y 1 *K. oxytoca*), procedentes de muestras de frotis rectal para vigilancia de infección nosocomial de 2 pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Estos aislados se recuperaron en la misma semana de placas de agar MacConkey con cefotaxima (4 mg/L). La identificación se realizó mediante el sistema automático WIDER (Francisco Soria Melguizo S.A.) y se confirmó posteriormente mediante el sistema API 20E (bioMérieux). Las cepas *E. coli* Dh10B y *E. coli* J53 resistente a azida sódica se utilizaron en los ensayos de clonación y conjugación, respectivamente.

### Estudios de sensibilidad antimicrobiana

Se realizó mediante el sistema automático WIDER (Francisco Soria Melguizo S.A.) y mediante tiras de E-test para quinolonas y carbapenémicos. La presencia de BLEE y MBLs se estudió fenotípicamente siguiendo las recomendaciones del CLSI<sup>6</sup>.

### Detección molecular de genes de resistencia

Mediante PCR y secuenciación se evaluó la presencia de genes codificadores de MBLs *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>GIM</sub>* y *bla<sub>SPM-1</sub>*<sup>7</sup>, así como de los genes de RQMP *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *aac(6')-Ib-cr* y *qepA*<sup>3</sup>.

### Caracterización de los plásmidos

Los plásmidos fueron purificados, transformados en *E. coli* Dh10B y seleccionados en placas con amoxicilina (100 mg/L) para valorar la transmisión del fenotipo de resistencia. Se realizaron ensayos de conjugación utilizando como receptor la cepa *E. coli*

J53 y siembra en placas con azida sódica (150 mg/L) y amoxicilina (100 mg/L). Los grupos de incompatibilidad plásmidica se estudiaron siguiendo el protocolo descrito por Carattoli et al.<sup>8</sup>.

Para determinar el entorno genético de los genes de resistencia, los plásmidos fueron digeridos con un enzima de restricción (BamHI, EcoRI o Sau3A), clonados en el vector pBK-CMV, electroporados en *E. coli* Dh10B y seleccionados en placas con kanamicina (30 mg/L) y amoxicilina (100 mg/L) o ciprofloxacino (0,05 mg/L).

## Resultados y discusión

El número de aislados de enterobacterias portadoras de MBLs en España está aumentando, particularmente en el género *Klebsiella*<sup>1,2</sup>. La aparición de aislados productores de carbapenemasas y proteínas de RQMP, aunque todavía infrecuente en España, supone un importante problema de salud pues resultan difíciles de detectar en el laboratorio. Los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de los aislados productores de carbapenemasas tipo VIM y KPC<sup>1,9</sup> muestran una gran variabilidad y baja reproducibilidad en sistemas automatizados. Esto dificulta en gran medida su control epidemiológico, y el tratamiento de las infecciones que provocan resulta complicado, pues quedan muy pocas opciones terapéuticas.

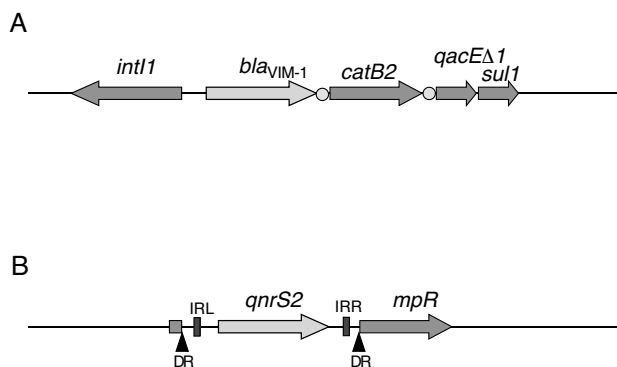
Este trabajo describe la presencia en un mismo plásmido transferible de los genes de resistencia *qnrS2* y *bla<sub>VIM-1</sub>* en dos aislados de frotis rectal de *Klebsiella oxytoca* y *K. pneumoniae*, respectivamente, de dos pacientes ingresados en la UCI del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla en marzo de 2010. Se trataba de dos varones, uno de 72 años, diabético y cardiópata, y otro de 70 años, hipertenso con EPOC y carcinoma vesical con posible metástasis pulmonar. Uno de los pacientes presentaba una estancia prolongada en UCI (5 meses), habiendo recibido previamente tratamiento antibiótico con cefepime, meropenem, piperacilina/tazobactam y levofloxacino. En el otro paciente el aislado se detectó en una muestra de control al ingreso en UCI y no había recibido antibióticos previamente. Ambos pacientes habían sido sometidos a cirugía previa.

Los dos aislados de *Klebsiella* mostraron sensibilidad disminuida o resistencia a todos los β-lactámicos no carbapenémicos ensayados, con la excepción de aztreonam (tabla 1). Las CMIs de imipenem frente al aislado de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* fueron de 2 mg/L y 4 mg/L, respectivamente, en tanto que los valores de CMI de meropenem y ertapenem fueron de <= 2 mg/L frente a los dos aislados. La prueba de confirmación de BLEE fue negativa mientras que la prueba de Hodge modificada para la detección de carbapenemasas fue positiva (discos de ertapenem y meropenem). En cuanto a quinolonas, ambos aislados presentaron una CMI de ciprofloxacino de 0,5 mg/L (sensible pero con sensibilidad reducida), mientras

**Tabla 1**

Sensibilidad a β-lactámicos y quinolonas de los aislados de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, y sus respectivos transformantes en *E. coli* Dh10B que contienen los plásmidos pKp y pKo que codifican ambos para VIM-1 y QnrS2

Antimicrobianos	Aislados clínicos y transformantes en <i>E. coli</i>				
	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i> Dh10B (pKp)	<i>E. coli</i> Dh10B (pKo)	<i>E. coli</i> Dh10B
Amoxicilina-clavulánico	> 16/8 (R)	> 16/8 (R)	> 16/8 (R)	> 16/8 (R)	2/1 (S)
Piperacilina-tazobactam	64/4 (I)	> 64/4 (R)	64/4 (I)	64/4 (I)	1/4 (S)
Cefoxitina	> 16 (R)	> 16 (R)	> 16 (R)	> 16 (R)	2 (S)
Cefotaxima	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	0,125 (S)
Ceftazidima	> 16 (R)	> 16 (R)	> 16 (R)	> 16 (R)	0,25 (S)
Cefepima	8 (S)	8 (S)	8 (S)	8 (S)	0,125 (S)
Aztreonam	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S)	0,125 (S)
Imipenem	4 (S)	2 (S)	1 (S)	1 (S)	0,125 (S)
Meropenem	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	0,06 (S)
Ertapenem	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)	2 (S)	2 (S)	0,015 (S)
Ácido nalidíxico	16 (S)	16 (S)	8 (S)	8 (S)	1 (S)
Ciprofloxacino	0,25 (S)	0,5 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,002 (S)
Levofloxacino	0,25 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,002 (S)
Moxifloxacino	0,125 (S)	0,25 (S)	0,125 (S)	0,125 (S)	0,002 (S)



**Figura 1.** Estructura esquemática del entorno genético de *bla*<sub>VIM-1</sub> y *qnrS2*. Cada gen se representa mediante flechas horizontales y los sitios *attC* mediante círculos. Además se indican las repeticiones invertidas (IRR y IRL), y los sitios de duplicación de la diana (DR).

que la CMI de ácido nalidíxico fue de 16 mg/L (sensible) (tabla 1). Este fenotipo es compatible con la presencia de determinantes de RQMP y descarta la presencia de mecanismos de resistencia a quinolonas por modificación de topoisomerasas de tipo II. Mediante PCR y secuenciación se confirmó la presencia de los genes *bla*<sub>VIM-1</sub> y *qnrS2* en ambos aislados. La PCR para el resto de genes que codifican MBLs o genes de RQMP fue negativa. En ambos pacientes se procedió a las medidas oportunas de control de infección nosocomial (aislamiento de los pacientes y limpieza de los dos boxes de UCI), no observándose posteriormente ningún otro caso, y ninguno de los dos pacientes desarrolló infección clínica por estos microorganismos.

En ambos aislados de *Klebsiella* estos genes se localizaron en un mismo plásmido de aproximadamente 70-Kb. Este plásmido no se pudo transferir mediante ensayos de conjugación bajo nuestras condiciones experimentales, mientras que si fue transferible a *E. coli* mediante ensayos de transformación. Estos plásmidos pertenecieron a un grupo de incompatibilidad plasmídica no tipable de acuerdo a protocolo de Carattoli et al.<sup>8</sup> Los genes *qnrS1* y *bla*<sub>VIM-1</sub> han sido previamente asociados a los grupos de incompatibilidad plasmídica IncN<sup>10</sup>.

El entorno genético de los genes *qnrS2* y *bla*<sub>VIM-1</sub> fue analizado. *bla*<sub>VIM-1</sub> se encontró como el primer gen casete de un integron de clase 1, el cual contuvo adicionalmente el gen de resistencia a clo-ranfenicol *catB2*. *qnrS2* fue encontrado en una estructura idéntica a la descrita en *Aeromonas punctata* en el plásmido pAS37, formando parte de un elemento para la inserción de casetes (MIC)<sup>11</sup> (fig. 1).

En conclusión este trabajo describe la presencia en un mismo plásmido transferible de los genes de resistencia *qnrS2* y *bla*<sub>VIM-1</sub> en dos aislados diferentes de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* en la UCI del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla. Para nuestro conocimiento esta es la primera descripción de la asociación de

los genes *qnrS2* y *bla*<sub>VIM-1</sub> en España. Los sistemas de vigilancia activa son fundamentales para controlar su diseminación, dado que cuando estos microorganismos causan infecciones plantean serios problemas terapéuticos.

## Financiación

Este trabajo fue financiado por la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía (P07-CTS-02908) y por la Consejería de Salud, Junta de Andalucía (PI-0282-2010). Parcialmente financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III - cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional «Una manera de hacer Europa» FEDER, Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI RD06/0008).

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity. Clin Infect Dis. 2007;45:1171–8.
2. Tortola MT, Lavilla S, Miro E, Gonzalez JJ, Larrosa N, Sabate M, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two enterobacteriaceae isolates in Spain. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49:3492–4.
3. Rodríguez-Martínez JM, Cano ME, Velasco C, Martínez-Martínez L, Pascual A. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. J Infect Chemother. 2011;17:149–82.
4. Miro E, Segura C, Navarro F, Sorli L, Coll P, Horcjada JP, et al. Spread of plasmids containing the *bla*(VIM-1) and *bla*(CTX-M) genes and the *qnr* determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. J Antimicrob Chemother. 2010;65:661–5.
5. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clin Microbiol Rev. 2009;22:664–89.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 20th informational supplement M100-S20. Wayne, PA, EE. UU., 2010.
7. Conejo MC, Domínguez MC, López-Cerero L, Serrano L, Rodríguez-Bano J, Pascual A. Isolation of multidrug-resistant *Klebsiella oxytoca* carrying *bla*IMP-8, associated with OXY hyperproduction, in the intensive care unit of a community hospital in Spain. J Antimicrob Chemother. 2010;65:1071–3.
8. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods. 2005;63:219–28.
9. Bulik CC, Christensen H, Li P, Sutherland CA, Nicolau DP, Kuti JL. Comparison of the activity of a human simulated, high-dose, prolonged infusion of meropenem against *Klebsiella pneumoniae* producing the KPC carbapenemase versus that against *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro pharmacodynamic model. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:804–10.
10. March A, Aschbacher R, Dhanji H, Livermore DM, Bottcher A, Slegel F, et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multiresistant bacteria. Clin Microbiol Infect. 2010;16:934–44.
11. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. Emerg Infect Dis. 2008;14:231–7.