

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**Doble mutación en N501Y que impide su identificación mediante un kit de RT-PCR de uso habitual en los laboratorios de Microbiología Clínica****Double N501Y mutation hindering its detection by RT-PCR kit widely used at Clinical Microbiology laboratories**

Las nuevas tecnologías de secuenciación (NGS, del inglés *Next Generation Sequencing*) se han convertido en una herramienta indispensable para el estudio y control de la pandemia causada por el virus SARS-CoV-2¹. La secuenciación del genoma completo viral ha sido vital no solo para el desarrollo de vacunas y fármacos específicos, sino también para el descubrimiento y la monitorización de las variantes de interés que, desde la aparición de la ahora conocida como variante alpha², han ido sucediéndose y relacionándose con los recrudecimientos puntuales de la pandemia. No obstante, y pese a los esfuerzos realizados por los laboratorios de Microbiología en todo el mundo, no se dispone de la capacidad de secuenciación suficiente para caracterizar todas las muestras positivas a SARS-CoV-2 con esta tecnología. Por ello se han desarrollado diferentes estrategias para la caracterización del virus mediante RT-PCR de combinaciones conocidas de mutaciones^{3–5}; sin embargo, no debemos olvidar las limitaciones que este tipo de estudios presentan y que pueden llevar a una asignación de variante errónea^{6,7}.

En la actualidad, en nuestro servicio se caracterizan todas las primeras muestras de un episodio con Cts por debajo de 32 mediante los paneles AllplexTM Variants I&II (Seegene, Corea) que estudian las mutaciones de la espícula más relevantes en las últimas variantes de interés (H69/V70-, W152C, K417N, K417T, L452R, E484K y N501Y). A partir de febrero de 2022, en un escenario totalmente dominado por la variante ómicron, aquellas muestras que presentaron las mutaciones H69/V70-, K417N y N501Y fueron clasificadas como variante ómicron mediante RT-PCR. En caso de no presentar la delección se consideró que pertenecían a la subvariante BA.2 mediante RT-PCR.

Ante la aparición de una muestra con H69/V70- y K417N, pero sin N501Y, se optó por secuenciar esta muestra ya que estos resultados no permitían asignarla a ninguna variante mediante RT-PCR. Para ello se utilizó una adaptación del protocolo ARTIC para Oxford Nanopore mediante la ampliación del genoma completo con el esquema VarSkip⁸. La librería resultante se procesó en un secuenciador MinION mk1c (Oxford Nanopore). Las lecturas obtenidas fueron posteriormente ensambladas mediante el *pipeline* de ARTIC para datos obtenidos de secuenciadores con tecnología de Oxford Nanopore y se analizaron mediante la webApp de Nextstrain⁹ comprobando su consistencia mediante el programa Integrative Genomics Viewer (IGV)¹⁰.

La secuencia obtenida (depositada en GISAID como EPI_ISL_10968563) pertenece al clado 21K (ómicron) y al linaje BA.1.17 y presentaba entre otras mutaciones características en la

* 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.

espícula las tres mutaciones empleadas por el esquema de Allplex Variants I&II: H69/V70-, K417N y N501Y; si bien, la mutación N501Y, además del cambio habitual A23063T, presentaba también T23065C. Todas las mutaciones se encontraron con suficiente cobertura. En este caso T23065C acompañando a A23063T produce una mutación silente ya que el codón que conforman sigue codificando una tirosina y mantiene la mutación N501Y.

Por lo tanto, es de esperar que esta mutación no suponga una ventaja evolutiva para el virus ni un cambio fundamental para su comportamiento. No obstante, sí que puede suponer un problema para los esquemas de caracterización que se basen en el estudio de mutaciones concretas, como el que empleamos en nuestro laboratorio en la actualidad; ya que, si este cambio se hubiese dado, por ejemplo, en una variante del linaje BA.2 en los paneles Allplex Variants I&II solo sería positiva la mutación K417N.

En resumen, creemos que este caso se trata de un ejemplo más de la enorme utilidad que presentan las NGS en los laboratorios de Microbiología Clínica en la actualidad, ya que nos permiten no solo la correcta asignación de las variantes circulantes, sino también la monitorización de la evolución de esas mismas variantes.

Bibliografía

- Oude Munnink BB, Nieuwenhuijsen 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.
- 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* [Internet]. Virological. 2020 [consultado 17 Mar 2022]. Disponible en: <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>
- 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.
- 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.
- 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.
- 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* [Internet]. 2022 [consultado 17 Mar 2022]. Disponible en: <https://link.springer.com/10.1007/s00705-022-05395-w>
- 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.
- VarSkip multiplex PCR designs for SARS-CoV-2 sequencing [Internet]. New England Biolabs Inc. 2021 [consultado 17 Mar 2022]. Disponible en: <https://github.com/nebiolabs/VarSkip>
- 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.
- Integrative genomics viewer | Nature Biotechnology [Internet]. [consultado 6 Jun 2021]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/nbt.1754>

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

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

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

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mikel.j.urruti@gmail.com
(M. Urrutikoetxea-Gutierrez).

<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2022.04.004>

0213-005X/ © 2022 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

***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 mucoide A, responsable de la hipermucoviscosidad 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 hipermucoviscosidad. 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 mucoide 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 patogenidad 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