

CHROMagar KPC. Comparación con el método propuesto por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, EE.UU.) para el estudio de portación rectal y evaluación de falsos positivos

LAURA ERRECALDE*, SANDRA COGUT, MARIANA ERBÍN, LILIANA JORDÁ VARGAS, EUGENIA CATTANI, TAMARA POSSE, SILVIA TUTZER, RICARDO HERMES, SARA KAUFMAN

Hospital Juan A. Fernández. Cerviño 3356 (1425) Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

*Correspondencia. E-mail: lerrecalde@yahoo.com.ar

RESUMEN

Se cultivaron 81 hisopados rectales en el medio CHROMagar KPC y por el método del CDC. Fueron positivos para *Klebsiella pneumoniae* KPC en CHROMagar KPC, 9/81 y 6/81 con el método del CDC. El medio CHROMagar KPC tuvo dos falsos positivos: 1 *K. pneumoniae* y 1 *Acinetobacter* sp. Los falsos positivos del método CDC fueron: 25 *Acinetobacter* spp., 2 *Escherichia coli* y 4 *K. pneumoniae*. El empleo del medio CHROMagar KPC resultó ser un método con mayor recuperación de aislamientos productores de KPC y menos falsos positivos que el método del CDC. Para evaluar los falsos positivos en el medio CHROMagar KPC se cultivaron 1247 hisopados rectales. Se obtuvieron 1021 negativos, 171 *K. pneumoniae* KPC y 55 (4,4 %) falsos positivos. Debido al desarrollo de falsos positivos en el medio CHROMagar KPC, se debe confirmar por caracterización fenotípica la presencia de KPC en las bacterias aisladas.

Palabras clave: CHROMagar KPC, KPC, vigilancia KPC

ABSTRACT

CHROMagar KPC. Comparison with the method proposed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC, USA) for rectal screening and evaluation of false positive results. Eighty one rectal swabs (RS) were cultured on CHROMagar KPC and the CDC method. Of the 81 samples, 9 were positive for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* on CHROMagar KPC, and 6 for the CDC method. CHROMagar KPC had two false positive (FP) results: 1 *K. pneumoniae* and 1 *Acinetobacter* sp. FP results on the CDC method were: 25 *Acinetobacter* spp., 2 *Escherichia coli* and 4 *K. pneumoniae*. CHROMagar KPC yielded a better recovery of KPC-producing bacteria and less FP results than CDC method. In order to evaluate FP results on CHROMagar KPC, 1247 RS were cultured and yielded 1021 negatives, 171 KPC-producing *K. pneumoniae* and 55 FP (4.4 %). Because of the FP results growing on CHROMagar KPC, KPC must be phenotypically confirmed in the bacteria isolated.

Key words: CHROMagar KPC, KPC, screening KPC

La resistencia a carbapenems en la familia *Enterobacteriaceae* puede deberse a dos mecanismos principales:

- 1) Modificaciones en la permeabilidad de la membrana externa, asociadas con β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) o hiperproducción de AmpC.
- 2) Producción de β -lactamasas con actividad hidrolítica específica sobre los carbapenems, llamadas carbapenemasas (8).

El primer mecanismo no parece tener potencial epidémico, probablemente debido a que el microorganismo posee una capacidad reducida por haber perdido su porina mayor, mientras que las cepas que poseen carbapenemasas suelen ser altamente epidémicas (14).

La enzima KPC (de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa) es una serincarbapenemasa que pertenece

a la clase A de Ambler y al grupo 2f de Karen Bush, y es una de las más frecuentemente aisladas, no solo en *K. pneumoniae* sino también en otros géneros y especies. Tiene la capacidad de hidrolizar a todos los antibióticos β -lactámicos incluyendo sus combinaciones con inhibidores. Está localizada en elementos genéticos móviles/movilizables (transposones/plásmidos), lo que le otorga un gran potencial de diseminación. Las resistencias asociadas que acarrearán estos plásmidos producen cepas con resistencia a la mayoría de las familias de antibióticos, lo que deja muy pocas alternativas de tratamiento. Una gran proporción de los brotes descritos en el mundo se deben a *K. pneumoniae* ST258 (8).

En nuestro país, el primer aislamiento de KPC se produce a fines del año 2006 en *K. pneumoniae* y

Citrobacter freundii (10). Sin embargo, a partir de agosto de 2009 se produjo un incremento de seis veces en el número de aislamientos de bla_{KPC-2} , 94 % de los cuales fueron ST258 (5). Para limitar la diseminación de estas cepas epidémicas dentro del ámbito hospitalario, el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) propone la detección temprana de portadores gastrointestinales por un método de vigilancia activa y la implementación de medidas de control de infecciones. Estas medidas incluyen el aislamiento de contacto de los pacientes infectados o colonizados, la intensificación del lavado de manos y el establecimiento de protocolos de limpieza, entre otras (1).

En nuestro hospital, el primer aislamiento de *K. pneumoniae* portadora de KPC se obtuvo en abril de 2010 de un paciente con infección urinaria (4). El aislamiento fue caracterizado en el Centro Nacional de Referencia como ST258 y portador del gen bla_{KPC-2} . Además, este aislamiento presentó identidad clonal con otros aislamientos de *K. pneumoniae* portadores de KPC aislados en 16 hospitales del área metropolitana de Buenos Aires (12). Durante el mes de junio de 2010 se producen dos nuevos aislamientos confirmados bla_{KPC-2} y, ante la sospecha de transmisión de la bacteria entre pacientes dentro del hospital, se inició la vigilancia activa de portadores intestinales en las unidades de cuidados intensivos y clínica médica. Para esta búsqueda fue necesario elegir un método de *screening* rápido, sensible y específico.

El medio CHROMagar KPC (CHROM) constituye un método de *screening* para detectar la producción de KPC altamente sensible y específico (7, 9, 13).

Consiste en un agar cromogénico con el agregado de un suplemento que inhibe el desarrollo de bacterias gram positivas y negativas sensibles a los carbapenems. Las bacterias crecen de distintos colores de acuerdo con sus propiedades enzimáticas específicas. Permite informar resultados negativos en 24 h y positivos en 48 h. También existen otros métodos para detectar microorganismos que producen KPC, entre ellos el propuesto por el CDC (2, 6). Este último es un método en dos etapas, la primera utiliza un enriquecimiento en caldo y la segunda un medio selectivo y diferencial como el agar EMB de Levine. Permite informar resultados negativos en 48 h y positivos en 72 h.

Los objetivos de nuestro trabajo fueron:

- 1) Comparar el desempeño del medio CHROM con el método propuesto por el CDC para el estudio de colonización rectal.
- 2) Evaluar el desarrollo de falsos positivos (FP) en el medio CHROM.

En una primera instancia (10/6 al 17/6/2010), los hisopados rectales se procesaron según las dos metodologías, para lo cual se tomaron dos hisopados rectales por paciente (n = 81).

Un hisopado rectal se cultivó en CHROM preparado según las instrucciones del fabricante. Se incubó 24 h a 35 °C en atmósfera aeróbica y se estudiaron todas las colonias positivas que podían indicar presencia de carbapenemasas: colonias azul metálico (*Klebsiella*, *Citrobacter* y *Enterobacter*) y colonias rosadas (*Escherichia coli*) (Figura 1). Estas se tipificaron mediante métodos convencionales y se realizó la prueba de sinergia entre carbapenems (imipenem, meropenem

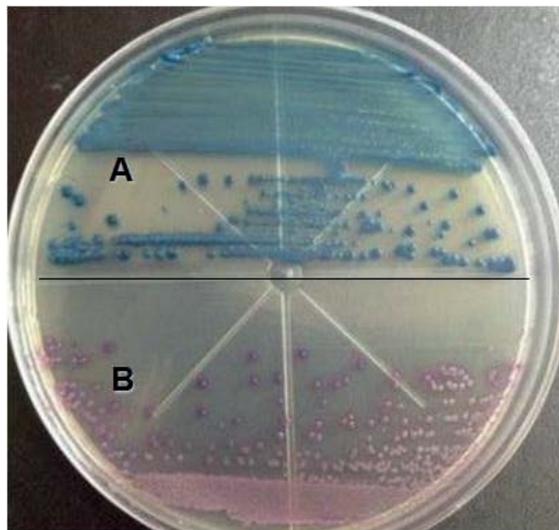


Figura 1. Aspecto de las colonias que desarrollaron en CHROMagar KPC. A) *K. pneumoniae* KPC, B) *E. coli* KPC

y ertapenem 10 µg) y el ácido 3-aminofenilborónico (APB 300 µg, Britania) para la búsqueda de serincarbapenemasas de clase A, y con EDTA/SMA (740/2000 µg, Britania) para la búsqueda de metalo β-lactamasas. La distancia entre los discos se calculó de la siguiente manera: radio del carbapenem + radio del APB + 5 mm. El disco de EDTA se ensayó a 1,5 cm de centro a centro de los discos del carbapenem.

Se consideraron productores de KPC aquellos aislamientos que presentaron sinergia entre el APB y los carbapenems. Los halos de inhibición para los carbapenems se interpretaron según las normas del CLSI (3). En las bacterias productoras de AmpC se utilizaron tabletas diagnósticas (Rosco Diagnostica A/S, Taastrup, Dinamarca) con meropenem (10 µg), meropenem + APB y meropenem + cloxacilina para descartar la presencia de carbapenemasas. El APB tiene la doble capacidad de inhibir a las carbapenemasas de clase A y también a las β-lactamasas AmpC, mientras que la cloxacilina inhibe solamente a las AmpC. Para interpretar los resultados se utilizaron los puntos de corte sugeridos por el fabricante.

El segundo hisopado rectal se cultivó según el método propuesto por el CDC. Se suspendió el hisopo en 5 ml de caldo tripteína de soja con el agregado de un disco de ertapenem o meropenem de 10 µg y se incubó el caldo a 35 °C en atmósfera aeróbica durante 24 h. Luego se repicaron 100 µl del caldo a agar EMB de Levine, se incubó a 35 °C en atmósfera aeróbica durante 24 h. Se estudiaron las colonias mucosas fermentadoras de lactosa mediante tipificación por métodos convencionales y búsqueda de carbapenemasas de igual manera que en el paso anterior.

Se consideró resultado positivo el desarrollo de bacterias productoras de carbapenemasa por el método fenotípico. Se consideró resultado negativo la ausencia de desarrollo bacteriano. Se consideró resultado FP toda vez que se obtuvieron colonias de color azul metálico o de color rosado en el medio CHROM, o colonias fermentadoras de lactosa con el método del CDC, en las que no se detectó carbapenemasa por el método fenotípico. Se comparó la recuperación de enterobacterias productoras de carbapenemasa y de FP por ambos métodos.

Abarcando un período de mayor extensión (10/6/2010 al 31/5/2011), se realizó la evaluación de FP en el medio CHROM sobre un total de 1247 hisopados rectales (uno por paciente). Las bacterias que desarrollaron se estudiaron de la misma manera que en la etapa anterior.

De los 81 hisopados rectales sembrados según

ambos métodos, 9 fueron positivos para *K. pneumoniae* (fenotipo probable KPC) en CHROM, mientras que solo 6 fueron positivos por el método del CDC. Los FP en CHROM correspondieron a los siguientes casos: 1 *K. pneumoniae* resistente a carbapenems (probable BLEE e impermeabilidad) y 1 *Acinetobacter* sp. Por el método del CDC se obtuvieron los siguientes FP: 4 *K. pneumoniae*, 3 sensibles y 1 resistente a carbapenems (probable BLEE e impermeabilidad), 25 *Acinetobacter* spp. y 2 *E. coli* sensibles a carbapenems. Todos los aislamientos sensibles a carbapenems presentaron halos de inhibición ≥ 23 mm para imipenem, meropenem y ertapenem. Se puede observar el desempeño comparativo de ambos métodos en la Tabla 1.

De 1247 hisopados rectales evaluados en el medio CHROM, 1021 (81,9 %) fueron negativos, 171 (13,7 %) fueron positivos para *K. pneumoniae* APB (+) (probable KPC) (2 muestras positivas en cultivo mixto con *E. coli* APB +) y 55 (4,4 %) resultaron FP. Los FP se distribuyeron como sigue: 38 *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems (probable BLEE e impermeabilidad), 15 *Acinetobacter* spp., 1 *E. coli* resistente a carbapenems (probable hiperexpresión de AmpC e impermeabilidad) y 1 *Enterobacter* sp. resistente a carbapenems (probable AmpC desreprimida e impermeabilidad). Todos los FP presentaron resistencia al ertapenem, mientras que respecto del imipenem y meropenem fueron sensibles, intermedios o resistentes.

Para realizar la vigilancia de portación intestinal se compararon dos metodologías: la propuesta por el CDC y el agar cromogénico CHROMagar KPC. El método propuesto por el CDC tiene la ventaja de ser accesible para cualquier laboratorio de microbiología y tener bajo costo. La concentración del carbapenem en el caldo sería de 2 µg/ml, si se considera que todo el antibiótico eluye del disco. Como desventajas, la técnica requiere dos días de incubación.

En la Tabla 1 podemos observar que el medio CHROM detectó 3 *K. pneumoniae* KPC que no fueron detectadas por el método del CDC. Ambas metodologías tuvieron desarrollo de FP, pero a diferencia de lo que ocurrió con el sistema CHROM, donde solo desarrollaron bacterias resistentes a carbapenems, por el método del CDC se aislaron 2 *E. coli* y 3 *K. pneumoniae* sensibles a carbapenems. Además, por el método del CDC se obtuvo desarrollo de *Acinetobacter* spp. en 25 muestras. Si bien *Acinetobacter* no forma colonias fermentadoras de lactosa, su desarrollo dificultó la observación de otras colonias, de modo que este método resulta muy engorroso y exige reaislar, con

Tabla 1. Desempeño comparativo del CHROMagar KPC y del método propuesto por el CDC

| N.º de hisopados n = 81 | CHROMagar KPC | Método del CDC |
|----------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|
| 6 | Positivo | Positivo |
| 3 | Positivo | Negativo |
| 43 | Negativo | Negativo |
| 3 | Negativo | <i>K. pneumoniae</i> sensible a carbapenems |
| 23 | Negativo | <i>Acinetobacter</i> spp. |
| 1 | Negativo | <i>Acinetobacter</i> sp. + <i>E. coli</i> sensible a carbapenems |
| 1 | <i>K. pneumoniae</i> resistente a carbapenems | <i>K. pneumoniae</i> resistente a carbapenems |
| 1 | <i>Acinetobacter</i> sp. | <i>Acinetobacter</i> sp. + <i>E. coli</i> sensible a carbapenems |

la consiguiente demora del resultado en un día más (96 h). Entendemos que el intenso desarrollo de bacterias con el método del CDC se debe a que el caldo TS actúa como multiplicador, tanto de cepas sensibles como resistentes. En la publicación donde originalmente se presenta este método, se señala que el antibiótico no eluye al 100 %, dado que aísla cepas con CIM de hasta 0,25 µg/ml (6).

La recuperación de FP en el medio CHROM fue de 55/1247 hisopados rectales (4,4 %); 38/55 fueron *K. pneumoniae* resistentes a carbapenems (probable BLEE e impermeabilidad). Es importante distinguir estas cepas de las productoras de KPC, ya que estas últimas requieren aislamiento del paciente, mientras que en el caso de cepas con BLEE e impermeabilidad esto no es necesario. También obtuvimos un aislamiento de *E. coli* y uno de *Enterobacter cloacae* con probable AmpC desreprimida (o hiperexpresión de AmpC en *E. coli*) e impermeabilidad. Con ambos microorganismos resultó útil en la detección el uso de las tabletas diagnósticas que contienen meropenem + cloxacilina como inhibidor exclusivo de AmpC. En ambos casos, al igual que en presencia de cepas de *K. pneumoniae* no productoras de carbapenemasa, no es necesario aislar al paciente.

No fueron calculadas la sensibilidad y la especificidad del método, por carecer de un método de referencia, pero el porcentaje de *K. pneumoniae* con BLEE e impermeabilidad es mayor que el comunicado por otros autores (13), lo que sugiere que este sería un método menos específico. Probablemente esto se deba a que en nuestro país estas cepas existen en alta proporción (aproximadamente 14 % de 6700 cepas nosocomiales examinadas por la red Whonet en 2007) (11).

Cabe destacar que entre los hisopados rectales positivos, en dos muestras se obtuvo *E. coli* productora de KPC (confirmada por el Centro Nacional de Referencia) en cultivo mixto con *K. pneumoniae* KPC. Hasta el momento no se aislaron en materiales clínicos distintos a los hisopados de este estudio (Errecalde L, comunicación personal).

Las conclusiones de nuestro trabajo son:

a) Comparando el medio CHROMagar KPC con el método del CDC, el primero resultó ser un método más rápido, con mayor recuperación de aislamientos productores de KPC y menor detección de FP que el segundo.

b) Debido a las características epidemiológicas de la Argentina, se observa el desarrollo en el CHROMagar KPC de cepas resistentes a carbapenems por mecanismos no enzimáticos, que no requieren poner al paciente en aislamiento de contacto. Por este motivo es importante caracterizar fenotípicamente a todas las bacterias que desarrollan en este medio.

Agradecimientos: al Servicio de Antimicrobianos del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" por la caracterización molecular de las cepas. A la Dra. Liliana Guelfand por la lectura crítica de este manuscrito. Al personal médico y de enfermería del hospital Juan A. Fernández, por la colaboración en la toma de muestras. A la enfermera en control de infecciones Lic. Carmen Ramallo.

BIBLIOGRAFÍA

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2009; 58: 256-60.

2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) . 17/3/2009. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs. http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/Klebsiella_or_Ecoli.pdf.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk diffusion. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20th Informational Supplement Update, 2010; M100-S20 U. CLSI, PA, EE.UU.
4. Errecalde L, Tutzer S, Jordá Vargas L, Cogut S, Cattani E, Elbert G, Pasterán F, Corso A, Kaufman S. *Klebsiella pneumoniae* productora de serincarbapenemasa tipo KPC (KPKPC): comunicación de 4 aislamientos. Evaluación del CHROMagar KPC (CHROM) para estudios de portación rectal. XII Congreso Argentino de Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica-SADEBAC. I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental-DiMayA, Presentación oral 27471. Rev Argent Microbiol 2010; 42 Supl 1: 8.
5. Gomez S, Pasterán F, Faccione D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovetska O, Albornoz E, Galas M, KPC group, Melano R, Corso A, Petroni A. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. Clin Microbiol Infect 2011; 17: 1520-4.
6. Landman D, Salvani J, Bratu S, Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. J Clin Microbiol 2005; 43: 5639-41.
7. Moran Gilad J, Carmeli Y, Schwartz D, Navon-Venezia S. Laboratory evaluation of the CHROMagar KPC medium for identification of carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae*. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70: 565-7.
8. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. Lancet Infect Dis 2009; 9: 228-36.
9. Panagea T, Galani I, Souli M, Adamou P, Antoniadou A, Giamarellou H. Evaluation of CHROMagar KPC for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures. Int J Antimicrob Agents 2011; 37: 124-8.
10. Pasterán F, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccione D, Di Martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis 2008; 14: 1178-80.
11. Pasterán F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2009; 47: 1631-9.
12. Pasterán F, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, Gómez S, Faccione D, Petroni A, Grupo KPC, Corso A. Emergencia y diseminación en múltiples hospitales de Argentina del clon pandémico ST258 de *Klebsiella pneumoniae* productor de KPC: ¿camino a la endemidad? XII Congreso Argentino de Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica-SADEBAC. I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental-DiMayA, Resumen 27202. Rev Argent Microbiol 2010; 42 Supl 1: 153.
13. Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2008; 46: 3110-1.
14. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, Chmelnitsky I, Schwaber M, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the *Enterobacteriaceae* family. J Clin Microbiol 2009; 47: 3261-5.

Recibido:25/10/2011- Aceptado:2/1/2012