Vigilancia rectal de carbapenemasas en *Klebsiella pneumoniae*: comparación de RPC y cultivo.

Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real time PCR and culture using two selective screening agar plates. Singh K, Mangold KA, Wyant K, Schora DM, Voss B, Kaul KL, et al. *J Clin Microbiol* 2012; 50: 2596-600.

Las carbapenemasas de *Klebsiella pneumoniae* (KPC), son las enzimas más comunes entre las *Enterobacteriaceas* en E.U.A. Su diseminación se ha convertido en un problema nacional. Recientemente, las *Enterobacteriaceas* portadoras de KPC han sido descritas en Chicago, en centros de larga estadía, convirtiéndose en sitios de amplificación y propagación de estos agentes. La identificación de pacientes colonizados, ha sido una estrategia importante para disminuir su diseminación. Los cultivos de vigilancia se realizan en caldo tripticasa soya o Mac Conkey con discos de imipenem; sin embargo, para disminuir el tiempo de respuesta, se utilizan métodos directos cromogénicos o agar Mac Conkey con discos de ertapenem. El desarrollo de RPC para detección de *K. pneumoniae* resistente a carbapenémicos en hisopado rectal, se han sumado a las otras técnicas de vigilancia. El objetivo de este estudio fue comparar dos métodos fenotípicos de cultivo con RPC para la identificación de pacientes portadores de KPC en dos centros de larga estadía en Chicago.

Material y Métodos: Se realizó una búsqueda de KPC en muestras de hisopado rectal en pacientes residentes en dos centros de larga estadía de Chicago, en junio de 2011. Las muestras fueron recolectadas utilizando tórulas de rayón dobles, prehumedecidas, en medio de transporte Amies. Se utilizaron dos medios de cultivo. El primer método utilizó un medio cromogénico, CHROMagar® ESB. Las placas fueron incubadas a 35°C, en aerofilia y se identificaron como *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* y *Citrobacter* spp. por la presencia de colonias azul metálico; *E. coli*, colonias rosado oscuro y *Proteus* sp. por colonias con halo color café. Cada colonia fue subcultivada en agar Mac Conkey y agar sangre cordero al 5%. La identificación y susceptibilidad fueron determinadas por Microscan® combo negativo, para orinas, panel 51. La susceptibilidad fue determinada utilizando los criterios CIM de CLSI 2011. Las cepas de *K. pneumoniae* fueron clasificadas como KPC si la CIM de imipenem y meropenem era > 8 µg/ml (previamente confirmadas como *bla*_{KPC} positiva por RPC). Todos los otros aislados con CIM ≥ 2 µg/ml para carbapenémicos se les realizaron pruebas adicionales, como el test modificado de Hodge y búsqueda de *bla*_{KPC}. El segundo método de cultivo fue realizado con agar selectivo con vancomicina, anfotericina B, ceftazidima y clindamicina (agar VACC). Las tórulas fueron directamente inoculadas en placas y caldo tripticasa soya, con disco de ceftazidima e incubadas a 35° C, en aerobiosis. Una alícuota del caldo enriquecido se utilizó para realizar RPC en búsqueda de *bla*_{KPC}. Las cepas de bacilos gramnegativos fueron subcultivadas en agar Mac Conkey. Posteriormente 3-5 colonias se escogieron para RPC. Las cepas KPC positivas fueron identificadas por sistema Vitek2® y la susceptibilidad con técnica de Kirby Bauer según el CLSI. Para realizar RPC para búsqueda de

*bla*_{KPC} se utilizó caldo de cultivo enriquecido con disco de ceftazidima, incubado durante la noche. A 250 µl se agregó a 200 µl de buffer de lisis calentado por 10 min a 99°C, luego fue microcentrifugada y 2 µl fueron utilizados para RPC en tiempo real utilizando LighCycler® 2.0. Se utilizaron partidores y sondas del gen *bla*_{KPC}. El límite de detección de *bla*_{KPC} fue 1-100 copias de genoma bacteriano. **Análisis de discrepancias:** Para muestras *bla*_{KPC} positivas que no presentaron desarrollo microbiano en los métodos anteriormente descritos, el caldo de enriquecimiento fue subcultivado en placas agar VACC. Cualquier desarrollo de bacilos gramnegativos fueron subcultivados en agar Mac Conkey y 3-5 colonias fueron estudiadas para *bla*_{KPC} por RPC e identificadas por sistema Vitek2®. **Análisis estadístico:** Sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictor positivo (VPP) y negativo (VPN) fueron calculados utilizando el método VassarStats, según desarrollo en CHROMagar®, VACC, caldo de enriquecimiento o todos combinados, considerados como métodos de referencia. También se calculó el tiempo de entrega de los resultados desde su recepción hasta la confirmación de la presencia de *bla*_{KPC} o desarrollo de KPC por cultivo. Se utilizó prueba t para la comparación entre los tiempos de respuesta de los métodos estudiados.

Resultados: Fueron recolectadas 95 muestras rectales de vigilancia, una por paciente, a las que se realizó cultivo y estudio molecular. Diecisiete (18%) resultaron positivas para KPC de muestras clínicas y 66 (69,5%) fueron consideradas positivas para la vigilancia de KPC. Hubo concordancia de 76% (72) entre CHROMagar® y VACC con la RPC; de éstas 44 fueron positivas por todos los métodos y 28 fueron negativas. **Rendimiento de los cultivos de KPC:** El rendimiento del CHROMagar® fue de 54 % (51). La mayoría de los aislados fueron *K. pneumoniae* (42), *E. coli* (3), ambos agentes (3), *K. pneumoniae* y *Citrobacter freundii* (1), *E. coli* y *Citrobacter koseri* (1) y *C. freundii* (1). Cultivos con VACC fueron positivos en 51 pacientes: *K. pneumoniae* (45), *E. coli* (3), *K. pneumoniae* y *E. coli* (2) y *Pseudomonas aeruginosa* (1). **Rendimiento de RPC:** 64 de 66 muestras (97%) fueron positivas por RPC, incluyendo 9 muestras que fueron negativas por ambos métodos de cultivo. Dos muestras positivas por cultivo, fueron negativas para *bla*_{KPC}, lo que fueron consideradas falsas negativas. Una muestra fue positiva para *bla*_{KPC} y negativa por ambos métodos de cultivo, considerándose falso positivo. Hubo 22 muestras con resultados discordantes entre los tres métodos: 10 positivas por RPC y negativas por ambos métodos de cultivo, 9 con *K. pneumoniae* (incluyendo una *P. aeruginosa* KPC positiva) que fueron consideradas como verdaderas KPC, una cepa clasificada como falsa positiva y dos como falsas negativas. Seis muestras positivas crecieron en CHROMagar® solamente, 5 fueron *bla*_{KPC} positivas desde el caldo de enriquecimiento, 6

fueron confirmadas por RPC y 6 fueron confirmadas por RPC directa de la colonia. Seis muestras de vigilancia fueron positivas sólo en agar VACC y todos los aislados fueron positivos por RPC.

Análisis estadístico: La S de CHROMagar®, VACC y RPC fue de 77,3%; 77,3% y 97%; respectivamente. La E fue de 100%; 100% y 96,6%; respectivamente. El VPP fue de 100 %; 100% y 98,5%; respectivamente. El VPN fue de 65,9%; 65,9% y 93,3%; respectivamente. El tiempo de entrega de los resultados fue de 64, 72 y 24 h; respectivamente.

Discusión: La vigilancia activa de colonización rectal por cepas KPC ha mostrado ser efectiva, cuando forman parte de un programa integral de control de infecciones, con el fin de prevenir su diseminación. Los centros de larga estadía son reconocidos reservorios de microorganismos multi-resistentes, incluyendo cepas KPC positivas. Hasta ahora, su identificación se realiza mediante cultivos, lo que puede llevar a la falta de detección de portadores. Este estudio comparó dos métodos de cultivo tradicional con RPC, demostrando mayor sensibilidad del método molecular. Los cultivos tuvieron una sensibilidad de 77,3% ($p = 0,0018$). La RPC detectó 13 cepas más en pacientes colonizados, incluyendo una *P. aeruginosa* portadora del gen. El tiempo de entrega de resultados fue menor con RPC: 24 h vs 64-72 h para los métodos tradicionales ($p < 0,0001$). Los hallazgos fueron similares a los de Schechner y cols.¹ que compararon RPC con cultivo en agar Mac Conkey con imipenem en muestras rectales. La sensibilidad fue de 77,8% para el cultivo y 96,3% para RPC y con un menor tiempo de respuesta (30 vs 75 h). Hindiyeh y cols.² compararon RPC para *bla*_{KPC} con cultivos rectales en agar Mac Conkey con carbapenémicos, obteniendo 7 cepas más detectadas por RPC que por cultivo tradicional ($p = 0,016$), con un tiempo de respuesta de 4 h. El agar cromogénico tiene la ventaja de permitir una fácil interpretación luego de 24 h de incubación. Se utilizó el CHROMagar® ESBL en vez del KPC, porque la literatura ha mostrado mayor sensibilidad del primero, cuando hay baja resistencia a carbapenémicos. Este estudio permitió detectar también co-colonización con cepas productoras de BLEE en 14

pacientes. Los cultivos tienen la ventaja de que permiten el estudio adicional de otros métodos de resistencia. Las placas con agar VACC demostraron una sensibilidad similar al CHROMagar®, pero comparadas con RPC, tuvieron mayor tiempo de respuesta: 72 vs 24 horas ($p < 0,001$). La mayor ventaja de RPC *bla*_{KPC} es su fácil aplicación, alta sensibilidad y menor tiempo de respuesta. La principal desventaja de RPC es la falta de microorganismos viables para estudios de caracterización, como tipificación molecular y clonalidad. Otra desventaja es la necesidad de personal entrenado y equipo especializado, no siempre disponibles. Las limitaciones del estudio incluyen la pequeña muestra utilizada, en una población con alta prevalencia de portación de KPC, lo que influye en los VPP y VPN. Dado que no hay un método estándar para determinar portación de KPC, el estudio consideró sólo resultados de cultivo positivo en medios selectivos y de enriquecimiento como evidencia real de portación y sólo una muestra con KPC *bla*_{KPC} positivo fue considerado falso positivo. Se concluye que la RPC tiene una excelente sensibilidad y especificidad para vigilancia rectal de KPC *bla*_{KPC}, con la gran ventaja del ahorro de tiempo. En lugares con alta endemia de colonización rectal por KPC, se hace necesario un método sensible que entregue resultados rápidos en la identificación de pacientes portadores y así evitar su diseminación.

Referencias bibliográficas

1. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, et al. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. J Clin Microbiol 2009; 47: 3261-5.
2. Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR. J Clin Microbiol 2008; 46: 2879-83.

Andrea Sakurada

Clínica Tabancura

Hospital Clínico Universidad de Chile