Vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en cultivos rectales en un hospital universitario de Santiago, Chile

Catalina Gutiérrez, Jaime Labarca, Juan C. Román, Francia Sanhueza, Marcela Moraga, Aniela Wozniak y Patricia García

Surveillance of carbapenem-resistant enterobacteria in stool cultures in a university hospital in Santiago, Chile

Background: Clinical cultures detect only one-third of colonized patients with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Early identification and contact precautions implementation would help to interrupt transmission. In our hospital no carbapenemase-producing enterobacteria infections have been described. **Aim:** To perform stool surveillance cultures in patients hospitalized in critical care unit with the purpose to detect carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Material and Methods:** Rectal swabs were obtained of patients after five or more days of hospital stay, on a monthly basis from July to December 2011. Phenotypic assays (modified test Hodge and phenylboronic acid test) and polymerase chain reaction (PCR) searching for six carbapenemasas of group A and B of Ambler's classification were performed. **Results:** During this period, 241 surveillance rectal cultures were performed. Thirty eight enterobacteria isolated from 30 patients presented a decreased susceptibility to carbapenems by agar dilution method. All PCR were negative. **Conclusion:** We found that despite the significant number of resistant isolates, patients hospitalized in our institution are not colonized with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. We highlight the importance of screening before having the problem in place.

Key words: Beta-lactamases, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacteriaceae*, beta-lactamase KPC-1.

Palabras clave: β -lactamasas, *Klebsiella pneumoniae*, enterobacterias, β -lactamasa KPC-1.

Introducción

El surgimiento de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, como consecuencia de la adquisición de carbapenemasas, es un alarmante problema mundial^{1,2}, ya que se asocia a altas tasas de mortalidad, altos niveles de resistencia a otros antimicrobianos y alto potencial de diseminación³. El gen más frecuentemente encontrado es *bla*_{KPC}, el que se disemina a través de amplias áreas geográficas debido a la expansión clonal dominante de la cepa ST258, mediada por plásmidos, en el transposón Tn4401⁴.

Para mejorar la detección de enterobacterias productoras de carbapen-

emasas, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recomendó en el año 2008 que enterobacterias con concentración inhibitoria mínima (CIM) elevada a carbapenémicos se estudiaran con test de Hodge modificado⁵ y en el año 2010 recomendó la disminución de los puntos de corte a carbapenémicos para predecir una mejor respuesta al tratamiento⁶. Además, CLSI sugiere que se realicen cultivos de vigilancia para pacientes con nexos epidemiológicos con el caso índice (pacientes portadores de enterobacterias productoras de carbapenemasas previamente no reconocidos), ya que se sabe que los cultivos clínicos detectan sólo un tercio de los pacientes colonizados⁷.

En Chile no se habían reportado casos de infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas hasta diciembre del año 2011⁸; en marzo del presente año (2012) se identificó el primer caso de infección causada por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC en un paciente procedente de Italia, incrementando la preocupación por este tema⁹.

Nuestro objetivo fue realizar vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes hospitalizados en un centro de alta complejidad, donde no hay descritos casos clínicos de infecciones por estos microorganismos.

Material y Método

Estudio de diseño descriptivo y prospectivo en el que se utilizaron muestras rectales de cultivos para vigilancia de *Enterococcus* spp, según normas del Ministerio de Salud de Chile (Circular MINSAL 4C/28 de mayo 2000). Éstas fueron obtenidas mediante muestras de hisopado rectal en pacientes hospitalizados por cinco o más días en las unidades de Paciente Crítico y de Cuidados Especiales del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile, en forma mensual, desde julio a diciembre del año 2011.

El estudio se llevó a cabo en dos etapas: la primera se realizó entre los meses de julio y agosto del 2011. Se procesaron 85 muestras de hisopado rectal, las que se introdujeron en 5 ml de caldo tripticasa-soya (caldo peptona de caseína-peptona de harina de soya, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) el que se suplementó con la mitad de un disco de ertapenem 10 µg (Benex Limited, Clare, Irlanda); éstas se incubaron durante toda la noche a 35°C en atmósfera aeróbica, realizándose un sub-cultivo de 100 µl de este caldo en placa de agar MacConkey, que posteriormente se incubó durante toda la noche a 35°C en atmósfera aeróbica. Al día siguiente, se examinaron las placas para búsqueda de colonias lactosa positiva, a las que se les realizó estudio de susceptibilidad por dilución en agar para carbapenémicos (ertapenem, imipenem y meropenem). Las cepas con susceptibilidad intermedia y resistentes según CLSI 2010 (Tabla 1) se estudiaron con los tests de Hodge

Tabla 1. Criterios de interpretación de la actividad de carbapenémicos en enterobacterias según Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010

Agente	Puntos de corte revisados CLSI 2010 (µg/ml)		
	Susceptible	Intermedio	Resistente
Doripenem	≤ 1	2	≥ 4
Ertapenem*	≤ 0,25	0,5	≥ 1
Imipenem	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	≤ 1	2	≥ 4

*Los puntos de corte para ertapenem fueron modificados en enero 2012, considerando susceptible CIM ≤ 0,5 µg/ml, intermedio CIM 1 µg/ml y resistente CIM ≥ 2 µg/ml.

Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago.

Escuela de Medicina. Departamento de Enfermedades Infecciosas (CG, JL).

Departamento de Laboratorios Clínicos (AW, PG).

Facultad de Medicina. Servicio de Laboratorios Clínicos. Laboratorio de Microbiología (JCR, FS, MM).

Conflictos de interés: ninguno.

Fuente de financiamiento: Fondos del Laboratorio de Microbiología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Recibido: 28 de septiembre de 2012 / Aceptado: 31 de diciembre de 2012

Correspondencia a:

Patricia García Cañete

pgarcia@med.puc.cl

modificado y de ácido fenilborónico. Aquellas positivas para cualquiera de los dos tests, se estudiaron con técnica de biología molecular mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC) para los genes *bla*_{IMI}, *bla*_{GES}, *bla*_{SME}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} y *bla*_{IMP}⁸.

La segunda etapa o definitiva se realizó desde septiembre a diciembre 2011, con 156 muestras de hisopado rectal. Éstas fueron procesadas con igual metodología que en la etapa preliminar, excepto que el caldo tripticasa-soya fue suplementado con un disco de 10 µg de ertapenem, según lo recomendado por los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia¹⁰. Además de estudiar las colonias lactosa positivas desarrolladas en el sub-cultivo del agar MacConkey, se incluyeron las colonias lactosa negativas y se realizó la identificación bacteriana de todas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Bruker Daltonik MALDI Biotyper, Bremen, Germany). Si bien la recomendación del CDC es la búsqueda dirigida de *Klebsiella* spp y *Escherichia coli* productoras de KPC (lactosa positivas), esta etapa fue diseñada para la búsqueda de todas las enterobacterias.

El proyecto fue aprobado por Comité de Ética de la Investigación de la Escuela de Medicina de la Universidad Católica de Chile, con dispensa de consentimiento informado, por utilizar muestras de hisopado rectal para cultivos de vigilancia anteriormente obtenidos.

Resultados

En la primera etapa, de 85 muestras de hisopado rectal incubadas, provenientes de 85 pacientes, hubo 62 cepas lactosa positiva sospechosas de tener resistencia a ertapenem. De estas 62 cepas, 14 presentaron resistencia o susceptibilidad intermedia a carbapenémicos por dilución en agar: 5 cepas con susceptibilidad intermedia a ertapenem; 4 cepas resistentes a ertapenem; 4 cepas con susceptibilidad intermedia o resistente a 2 carbapenémicos y 1 cepa resistente a todos carbapenémicos.

De estas 14 cepas, dos tuvieron test de ácido fenilborónico positivo (con test de Hodge modificado negativo). Los resultados del estudio por RPC para las seis carbapenemasas descritas fueron negativos (Figura 1).

En la segunda etapa, de 156 muestras de hisopado rectal incubadas, provenientes de 156 pacientes, se desarrollaron 181 cepas sospechosas de tener resistencia a ertapenem, de éstas 114 (63%) eran lactosa positivas y 67 (37%) lactosa negativas; de estas últimas, 89,5% eran bacilos no fermentadores y 10,5% (7 cepas) enterobacterias. Los bacilos no fermentadores no continuaron con el estudio de susceptibilidad por dilución en agar.

De las 121 enterobacterias con sospecha de resistencia a ertapenem, 24 fueron resistentes o con susceptibilidad intermedia a carbapenémicos por dilución en agar (Tabla 2).

De estas 24, la más frecuente fue *K. pneumoniae*, cuyo estudio de susceptibilidad se encuentra en la Tabla 3. En esta tabla se muestra además el estudio de susceptibilidad de las otras enterobacterias aisladas.

De las 24 enterobacterias resistentes y con susceptibilidad intermedia a carbapenémicos, tres tuvieron test de Hodge positivo (con test de ácido fenilborónico negativo): una cepa de *K. pneumoniae* resistente a ertapenem, meropenem e imipenem, una cepa de *K. pneumoniae* resistente a ertapenem y meropenem y una cepa de *E. coli* con susceptibilidad intermedia a ertapenem. El estudio por RPC para las seis carbapenemasas descritas fue negativo en todas las cepas estudiadas.

De las 241 vigilancias rectales totales realizadas, 38 enterobacterias resultaron con susceptibilidad intermedia o resistente a carbapenémicos; estas enterobacterias corresponden a 30 pacientes estudiados.

Los porcentajes de pacientes con enterobacterias resistentes a carbapenémicos según mes variaron entre 10% (septiembre) y 17% (diciembre).

Discusión

Las infecciones por enterobacterias resistentes a carbapenémicos se asocian a altas tasas de mortalidad, altos niveles de resistencia a otros antimicrobianos y alto potencial de diseminación, especialmente si son mediadas por carbapenemasas³. En América de Sur se ha descrito el aislamiento de enterobacterias resistentes por producción de KPC en Argentina, Brasil y Colombia^{1,11,12}.

Figura 1. Reacción de polimerasa en cadena (RPC) en electroforesis en gel de agarosa para búsqueda de *bla*_{KPC} en la primera etapa del estudio (resultado negativo).

Tabla 2. Confirmación de susceptibilidad disminuida a carbapenémicos por método de referencia, en enterobacterias con tamizaje positivo para carbapenémicos en la segunda etapa del estudio

Enterobacterias	Número de cepas con tamizaje positivo*	Número de cepas resistentes por método referencia**
Enterobacterias lactosa positiva		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	15
<i>Escherichia coli</i>	36	5
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	20	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12	2
<i>Citrobacter freundii</i>	4	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	3	0
Enterobacterias lactosa negativa		
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	5	1
<i>Escherichia coli</i>	2	0
Enterobacterias totales	121	24

*Crecimiento con disco de 10 µg de ertapenem. **Dilución en agar.

Tabla 3. Cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* y *Enterobacter cloacae* complex resistentes y con susceptibilidad intermedia a carbapenémicos, según mes en la segunda etapa del estudio. Puntos de corte CLSI 2010

	CIM (µg/ml) Ertapenem	CIM (µg/ml) Meropenem	CIM (µg/ml) Imipenem
<i>K. pneumoniae</i>			
Nº 1 (septiembre)	R 8	R 4	R 4
Nº 2 (octubre)	I 0,5	S 1	S 1
Nº 3 (octubre)	S 0,25	S 1	I 2
Nº 4 (octubre)	S 0,25	S 1	I 2
Nº 5 (octubre)	R 8	R 4	S 1
Nº 6 (octubre)	R 4	S 1	R 4
Nº 7 (octubre)	R 8	R 4	R 4
Nº 8 (octubre)	R 8	R 4	R 4
Nº 9 (noviembre)	R 8	R 8	R 16
Nº 10 (noviembre)*	R 8	R 4	R 8
Nº 11 (noviembre)	R 8	R 8	R 8
Nº 12 (diciembre)	R 8	R 16	R 4
Nº 13 (diciembre)*	R 8	R 4	S 1
Nº 14 (diciembre)	R 8	I 2	S 1
Nº 15 (diciembre)	R 8	I 2	I 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>			
Nº 1 (noviembre)	R 2	S 1	S 1
Nº 2 (diciembre)	R 2	S 1	S 1
<i>Escherichia coli</i>			
Nº 1 (septiembre)	R 1	S 1	S 1
Nº 2 (septiembre)	R 1	S 1	S 1
Nº 3 (septiembre)	R 1	S 1	S 1
Nº 4 (octubre)	R 2	S 1	S 1
Nº 5 (diciembre)*	I 0,5	S 1	S 1
<i>Enterobacter cloacae</i> complex			
Nº 1 (noviembre)	R 2	S 1	S 1
Nº 2 (diciembre)	R 8	S 1	S 1

*Cepas con test de Hodge modificado positivo y test de ácido fenilborónico negativo.
S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

En Chile no se habían reportado casos de infecciones por enterobacterias productoras de carbapenemasas hasta diciembre del año 2011⁸. En marzo del año 2012, se identificó el primer caso de *K. pneumoniae* productora de carbapenemasa KPC en un paciente procedente de Italia, atendido en un hospital de la ciudad de Santiago⁹. En nuestro hospital no hay casos clínicos descritos, pese a su búsqueda en muestras clínicas de enterobacterias resistentes a carbapenémicos, encontrándose otros mecanismos de resistencia⁸.

Entre las medidas recomendadas por el CDC en la guía para el control de enterobacterias resistentes a carbapenémicos¹⁰ se encuentra realizar vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas a los contactos de un caso índice conocido e implementar precauciones de contacto precoces ante la sospecha. Además, en hospitales sin casos descritos, que reciben pacientes transferidos desde centros con casos de pacientes colonizados o infectados con enterobacterias productoras de carbapenemasas, se recomienda efectuar un tamizaje en el momento de la admisión e implementar precauciones de contacto en espera del resultado de los cultivos de vigilancia.

Esta vigilancia sugerida por CDC¹⁰ incluye cultivos de deposiciones, rectales, peri rectales, de heridas u orina. Para esto se han diseñado varias técnicas de cultivos, incluyendo medios de agar cromogénico, los que serían menos complejos de realizar, con buena sensibilidad y especificidad reportada hasta la fecha¹³.

Este estudio va más allá de las recomendaciones del CDC al realizar búsqueda de enterobacterias productoras no sólo de KPC sino también de otras carbapenemasas en pacientes de alto riesgo y donde aún no hay casos clínicos descritos.

De los 241 pacientes estudiados desde julio a diciembre del año 2011, se encontraron 30 pacientes colonizados con enterobacterias resistentes o con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos (12,4%); sin embargo, si se utilizaran los nuevos puntos de corte para ertapenem (susceptible CIM ≤ 0.5 µg/ml, intermedio CIM 1 µg/ml y resistente CIM ≥ 2 µg/ml), el número de pacientes colonizados con enterobacterias con resistencia o susceptibilidad intermedia a carbapenémicos sería de 23 pacientes (9,5%).

A pesar de que uno de cada 10 pacientes está colonizado por enterobacterias resistentes o con susceptibilidad disminuida a carbapenémicos en la vigilancia realizada, estas bacterias no eran productoras de carbapenemasas. En las cepas estudiadas, la susceptibilidad intermedia o resistencia a uno o más carbapenémicos pudiera estar dada por otros mecanismos involucrados, lo cual ha sido descrito por nuestro grupo, como la producción de b-lactamasas de espectro extendido, producción de Amp C y la pérdida o alteración de porinas⁸.

El presente estudio tiene varias limitaciones a considerar: la población es restringida y se realizó en un solo centro hospitalario de Santiago, aunque la presencia de pacientes trasladados desde otros hospitales en la Unidad de Pacientes Críticos de nuestra institución es de aproximadamente 4 a 8% por mes. Por último, es conocido que la identificación bacteriana de *E. coli* por espectrometría de masas MALDI-TOF no permite diferenciar este género de *Shigella* spp; no obstante, es altamente improbable que pacientes con más de cinco días de hospitalización pudieran cursar una infección por este último agente.

Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no hay trabajos previamente publicados en Chile que se refieran a la vigilancia de enterobacterias productoras de carbapenemasas, en un ambiente hospitalario en el que no se han detectado casos clínicos.

Agradecimientos. Al personal del Laboratorio de Microbiología de P. Universidad Católica de Chile; Gonzalo Rivera, Residente Enfermedades Infecciosas del adulto; Isolda Budnik, Residente Enfermedades Infecciosas del Niño, Paulina Donato, Residente Enfermedades Infecciosas del adulto, Mario Maturana A. Residente Salud Pública, Departamento de Salud Pública, Paula Fernández, Enfermera de Vigilancia del Comité de Prevención y Control de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud y Alejandra Zambrano Enfermera Coordinadora de Unidad de Paciente Crítico

Resumen

Introducción: Los cultivos clínicos detectan sólo un tercio de los pacientes colonizados con enterobacterias resistentes a carbapenémicos, su identificación temprana permitiría implementar precauciones de contacto y así interrumpir su transmisión. En nuestro hospital no hay descritas infecciones causadas por enterobacterias productoras de carbapenemasas. **Objetivo:** Realizar vigilancia de colonización intestinal por enterobacterias productoras de carbapenemasas en pacientes ingresados a nuestro hospital. **Material y Métodos:** Se realizaron cultivos de vigilancia rectal en pacientes con cinco o más días de hospitalización en una unidad de paciente crítico

y cuidados especiales de nuestro hospital, en forma mensual, desde julio a diciembre del año 2011. Posteriormente se realizaron tests fenotípicos (test de Hodge modificado y test de ácido fenilborónico) para detectar enterobacterias productoras de carbapenemasas y búsqueda confirmatoria de seis carbapenemasas del grupo A y B de la clasificación de Ambler mediante reacción de polimerasa en cadena (RPC). **Resultados:** Durante este periodo, se llevaron a cabo 241 vigilancias rectales; de éstas, 38 enterobacterias resultaron resistentes o con susceptibilidad intermedia a carbapenémicos por método de dilución en agar, las que correspondieron a 30 pacientes estudiados. Todas las RPC fueron negativas. **Conclusión:** A pesar del significativo número de cepas resistentes a carbapenémicos, en los pacientes analizados no se encontraron enterobacterias productoras de carbapenemasas. Destacamos la importancia de la realización de cultivos de vigilancia antes de tener casos clínicos sintomáticos detectados.

Referencias Bibliográficas

- 1.- Gupta N, Limbago B, Patel J, Kallen A. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and prevention. Clin Infect Dis 2011; 53: 60-7.
- 2.- Jacoby G A, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. N Engl J Med 2005; 352: 380-91.
- 3.- Guidance for control of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (2012). www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/CRE-guidance-508.pdf.
- 4.- Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the b-lactamase *bla*_{KPC} gene. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52: 1257-63.
- 5.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, PA: CLSI, 2008.
- 6.- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S20. Vol 30 Nº 1 (2010).
- 7.- Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon A M, et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients during a national outbreak. J Hosp Infect 2010; 74: 344-9.
- 8.- Wozniak A, Villagra N, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, et al. Porin alterations present in non-carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. J Med Microbiol 2012; 61: 1270-9.
- 9.- Cifuentes M, García P, San Martín P, Silva F, Zúñiga J, Reyes S, et al. Primer caso de detección de *bla*_{KPC} en Chile: desde Italia a un hospital público de Santiago. Rev Chilena Infectol 2012; 29: 224-8.
- 10.- Centers for Disease Control and Human Services. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase producing *Klebsiella* spp and *E. coli* from rectal swabs. http://www.cdc.gov/HAI/pdfs/labSettings/Klebsiella_or_Ecoli.pdf.
- 11.- Monteiro J, Santos A F, Asensi M D, Peirano G, Gales A C. First report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53: 333-4.
- 12.- Villegas M V, Lolans K, Correa A, Suárez C J, López J A, Vallejo M, Quinn J P, and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group 2006. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2880-2.
- 13.- Vrioni G, Daniil L, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative Evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. J Clin Microbiol 2012; 50: 1841-6.