

Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario

Silvana Manganello^a, Amelia Tayara^a, Beatriz Perazzi^a, Liliana Neira^a, Angela Famiglietti^a, Laura Pugliese^a, Pilar Santini^b y Carlos Vay^a

^aCátedra de Análisis Clínicos I. Laboratorio de Bacteriología. Departamento de Bioquímica Clínica. ^bCátedra de Higiene y Sanidad. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Hospital de Clínicas. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

OBJETIVOS. a) Identificar a nivel de especie las cepas pertenecientes al género *Citrobacter*, siguiendo el esquema de pruebas bioquímicas convencionales propuesto por Brenner et al; b) determinar la utilidad de la llave dicotómica de O'Hara comparándola con el esquema propuesto por Brenner et al, evaluando su sensibilidad y especificidad, y c) establecer la distribución y frecuencia de las diferentes especies en los especímenes clínicos.

MATERIALES Y MÉTODOS. Se estudiaron 122 cepas aisladas en forma consecutiva, única e ininterrumpida en el período comprendido entre mayo de 1994 y agosto de 1997, que fueron identificadas como *Citrobacter* spp. Las mismas provenían de distintos materiales clínicos correspondientes a pacientes hospitalizados y ambulatorios atendidos en el Hospital de Clínicas.

Los organismos fueron identificados según el esquema propuesto por Brenner y la llave dicotómica de O'Hara. **RESULTADO.** El esquema de Brenner identificó a nivel de especie 111 cepas de las 122 estudiadas. *C. freundii* fue la especie más frecuente (59/111), seguida por *C. koseri* (18/111), *C. werkmanii* (15/111), *C. braakii* (9/111), *C. youngae* (6/111) y *C. amalonaticus* (4/111). La llave dicotómica de O'Hara identificó el 94% de las cepas estudiadas (104/111).

Para *C. freundii* los sitios de infección o colonización más frecuentes fueron el tracto urinario y el intestino, (p Fischer <0,026 y 0,039 respectivamente). Para *C. koseri* al igual que para *C. freundii*, el sitio de infección más frecuente fue la orina (p Fischer <0,0372).

CONCLUSIONES. El esquema de O'Hara podría ser una alternativa válida para la identificación de las citrobacterias en los laboratorios de microbiología, teniendo en cuenta que éstas son importantes patógenos oportunistas.

Palabras clave: citrobacterias, identificación, distribución. **Characterization and distribution of *Citrobacter* strains in a University Hospital**

OBJECTIVE. a) To identify *Citrobacter* strains following the conventional biochemical reaction of Brenner and col; b) to evaluate the sensitivity and specificity of the O'Hara's method compared with Brenner's method, and c) to determine the rate and distribution of the strains in the clinical isolates.

MATERIAL AND METHODS. One hundred and twenty two clinical isolates, characterized as *Citrobacter* spp. were collected between May of 1994 and August of 1997. Clinical isolates included inpatients and outpatients from Hospital de Clínicas. Strains were identified following the methods of Brenner and O'Hara.

RESULTS. Methods of Brenner identified 111 of 122 strains: *C. freundii* 59 of 111; *C. koseri* 18 of 111; *C. werkmanii* 15 of 111; *C. braakii* 9 of 111; *C. youngae* 6 of 111 and *C. amalonaticus* 4 of 111.

O'Hara's methods identified 104 of 111 strains (94%). *C. freundii* was recovered most frequently from urine and feces (p Fisher <0.026 and 0.039 respectively), while *C. koseri* was isolated from urine principally (p Fisher <0.0372).

CONCLUSIONS. The genus *Citrobacter* is an important opportunistic pathogen that can be identified in clinical microbiology's laboratories using O'Hara's method.

Key words: *Citrobacter*, identification, distributions.

Introducción

El género *Citrobacter* descrito en el año 1932 por Werkman y Gillen, pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*; estas bacterias se hallan frecuentemente en el agua, suelo, alimentos y tracto intestinal de los animales incluyendo el hombre¹. Ha sido reconocido como agente etiológico de distintos procesos infecciosos tales como infección urinaria, infección quirúrgica, infección de piel y tejido celular subcutáneo, bacteriemia y septicemia, meningitis y abscesos cerebrales²⁻⁴.

En el año 1993, Brenner et al⁵ describieron por hibridación del ADN once genomoespecies, y propusieron utilizar una serie de pruebas bioquímicas y de crecimiento en diferentes sustratos como única fuente de carbono, para identificar las diferentes genomoespecies en el labo-

Correspondencia: Dr. C. Vay.
Avenida Juramento 2890. Piso 8. Depto. C.
C.P. 1428. Buenos Aires. Argentina.
Correo electrónico: cavay@dbc.ffyb.uba.ar

Manuscrito recibido el 12-1-2000; aceptado el 25-10-2000.

Enferm Infecc Microbiol Clin 2001; 19: 11-14

ratorio de microbiología clínica.

Dado que el esquema de Brenner utiliza un elevado número de pruebas bioquímicas, en el año 1995 O'Hara et al⁶ diseñaron con el mismo esquema una llave dicotómica sencilla para la identificación de las once genomo-especies descritas.

En la actualidad el género *Citrobacter* está compuesto por las siguientes genomo-especies: complejo *C. freundii* (*C. freundii*, *C. braakii*, *C. sedlakii*, *C. werkmanii*, *C. youngae*, *C. gillenii*, *C. murliniae* y *C. rodentium*), *C. koseri*, *C. amalonaticus* y *C. farmeri*^{1, 7, 8}.

En lo que respecta a estas nuevas especies, en particular a las que integran el denominado "complejo *C. freundii*", existen pocos estudios acerca de su significado clínico y de su distribución y frecuencia en especímenes clínicos.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) identificar la especie de las cepas pertenecientes al género *Citrobacter* siguiendo el esquema de pruebas bioquímicas convencionales de Brenner et al; b) determinar la utilidad de la llave dicotómica de O'Hara, comparándola con el esquema de Brenner et al evaluando su sensibilidad y especificidad, y c) establecer la distribución y frecuencia de las diferentes especies en los especímenes clínicos.

Materiales y métodos

Microorganismos

Se estudiaron 122 cepas obtenidas en forma consecutiva, única e ininterrumpida en el período comprendido entre mayo de 1994 y agosto de 1997 que fueron identificadas como *Citrobacter* spp. Las mismas provenían de distintos especímenes clínicos correspondientes a pacientes internados y ambulatorios atendidos en el Hospital de Clínicas "José de San Martín" de la Ciudad de Buenos Aires. Los microorganismos fueron conservados en agar tripticosa soya (ATS) a 4°C y subcultivados en placas de ATS y EMB de Levine para su posterior estudio.

Identificación

El género *Citrobacter* fue identificado mediante las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de glucosa, lactosa y sacarosa (agar TSI), producción de sulfuro de hidrógeno (agar TSI), gas de glucosa (agar TSI), lisina decarboxilasa (agar LIA y LDC Moeller), arginina dehidrolasa (ADH Möeller), movilidad, prueba de Voges Proskauer, utilización de citrato (Simmons), hidrólisis de esculina, producción de indol, fermentación de D- manosa e hidrólisis del ONPG.

Las especies fueron identificadas por las pruebas bioquímicas propuestas por Brenner et al⁵: hidrólisis de urea, ornitina decarboxilasa (ODC Möeller), crecimiento en presencia de cianuro de potasio, acetato y malonato, reducción de nitrato, producción de ácido a partir de: lactosa, sacarosa, dulcitol, salicina, adonitol, rafinosa, cellobiosa, a-metil glucósido, melibiosa, D-arabitol y glicerol.

Sobre las mismas cepas se realizó la identificación de especie utilizando el esquema dicotómico de O'Hara et al⁶ que incluye las siguientes pruebas bioquímicas: ornitina decarboxilasa, utilización de malonato y citrato, producción de indol, hidrólisis de urea y producción de ácido a partir de dulcitol y melibiosa.

Las pruebas se incubaron a 37 °C, durante siete días según criterios estandarizados¹ y los resultados fueron leídos a las 24, 48 horas y a los 7 días.

Comparación de diferentes esquemas de identificación y análisis estadístico

Se comparó el esquema de pruebas bioquímicas de Brenner (*gold standard*) con el esquema dicotómico de O'Hara et al. Se calculó la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y los

correspondientes intervalos de confianza del 95%.

Para evaluar la distribución de las diferentes especies de *Citrobacter* en la muestras clínicas, se aplicó la prueba de Fisher a dos colas.

Resultados

Sobre un total de 122 cepas estudiadas, 111 fueron identificadas a nivel de especie utilizando el esquema de Brenner et al. Los resultados de las pruebas bioquímicas se muestran en la tabla 1.

Las especies identificadas fueron: *C. freundii* 59, *C. kosei* 18, *C. werkmanii* 15, *C. braakii* 9, *C. youngae* 6 y *C. amalonaticus* 4. No se encontró ninguna cepa correspondiente a *C. farmeri*, *C. sedlakii*, *C. rodentium*, *C. gillenii* ni *C. murliniae*.

El esquema de O'Hara et al identificó 104 de las 111 cepas identificadas por el esquema de Brenner et al. Cinco cepas de *C. freundii* que fermentaron el dulcitol fueron identificadas como *C. youngae*. Dos cepas de *C. koseri* fueron identificadas como *C. rodentium* y *C. werkmanii* dado que resultaron indol negativo y melibiosa positivo respectivamente. Todas las cepas de *C. braakii* y *C. amalonaticus* fueron correctamente identificadas por el esquema de O'Hara et al.

Los porcentajes de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos se muestran en la tabla 2.

Los resultados de la distribución de las especies de *Citrobacter* por especímenes clínicos se muestran en la tabla 3. *C. freundii* se aisló con más frecuencia en orina e intestino respecto de las otras muestras clínicas ($p < 0,026$ y $p < 0,039$ respectivamente). El tracto urinario fue el sitio de infección más frecuente para *C. koseri* ($p < 0,0372$). El resto de las especies no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto a los especímenes clínicos, debido al bajo número de aislamientos obtenidos.

Discusión

Sobre un total de 122 cepas, 111 (91%) pudieron ser identificadas a nivel de especie mediante la utilización del esquema de pruebas bioquímicas de Brenner et al, es decir, sólo un 9% (11/122) no pudo asignarse a ninguna de las once genomo-especies descritas. Estos resultados fueron similares a los encontrados por Janda et al⁹.

El esquema de O'Hara et al mostró un valor aceptable de especificidad, sensibilidad y valor predictivo positivo y negativo. Estos resultados muestran su utilidad para identificar las especies de *Citrobacter* en los laboratorios de microbiología clínica.

En lo que respecta al "complejo *C. freundii*", la especie *C. freundii* fue la más frecuente, seguida por *C. werkmanii*, *C. braakii* y *C. youngae*. Janda et al documentaron como segunda especie más frecuente a *C. youngae*, seguida de *C. braakii* y *C. werkmanii*. En cambio Arens et al¹⁰ informaron que *C. braakii* fue la segunda especie más frecuentemente aislada.

C. koseri ocupó el segundo lugar entre los aislamientos del género, resultados que coinciden con los presentados por Janda et al. No obstante, Arens et al hallaron que *C. braakii* y *C. koseri* se ubicaron en el segundo y tercer

TABLA 1. Características bioquímicas de las especies de *Citrobacter* estudiadas

Pruebas	Porcentaje de cepas positivas					
	<i>C. freundii</i> (n=59)	<i>C. koseri</i> (n=18)	<i>C. amalonaticus</i> (n=4)	<i>C. youngae</i> (n=6)	<i>C. braakii</i> (n=9)	<i>C. werkmanii</i> (n=15)
Indol	2	94	100	0	0	0
Citrato (Simmons)	100	100	100	100	100	100
H ₂ S (TSI)	71 (85)	0	0	71	100	93 (100)
Urea	79 (85)	94	100	83 (100)	56 (67)	100
Arginina dehidrolasa	64 (76)	100	100	86 (100)	100	100
Ornitina decarboxilasa	0	100	100	0	100	0
Motilidad	98	100	100	100	100	100
Malonato	2	100	0	0	0	100
Gas (de glucosa)	98	100	75	86	100	100
Acetato	100	100	100	100	100	100
Esculina	2	0	25	0	0	0
ONPG	100	94	100	50	100	100
Producción de ácido a partir de:						
Lactosa	100	58 (89)	25 (50)	17 (33)	100	100
Sacarosa	95 (97)	22	0	17	0	7
Dulcitol	0	22	25	100	22	0
Salicina	5 (8)	11 (17)	0 (25)	0	0 (11)	0
Adonitol	0	100	0	0	0	0
Raffinosa	97	11	0	0	44	0
Cellobiosa	53 (68)	100	100	17 (50)	89 (100)	27 (100)
α -CH ₂ -glucósido	8 (9)	33 (44)	0	0	11	0
Melibiosa	98	6	0	17	100	0
D- arabitol	0	100	0	0	0	0
Glicerol	98	100	75	100	100	100
Reducción de nitrato	100	100	100	100	100	100
CNK	81 (100)	0	100	100	100	100

ONPG: o-nitrofenil- β - D-galactopiranosido; CNK: cianuro de potasio (Möeller).

Los resultados corresponden a porcentaje de cepas positivas después de 48 horas de incubación. Los valores entre paréntesis corresponden al porcentaje de cepas que da reacción positiva tardía, a los 7 días de incubación.

TABLA 2. Valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos del esquema de O'Hara et al para las especies de *Citrobacter* estudiadas

Especies identificadas	Sensibilidad (%) (IC 95%)	Especificidad (%) (IC 95%)	VPP (%) (IC 95%)	VPN (%) (IC95%)
<i>C. freundii</i> (n = 64)	91,5 (80,6 - 96,8)	100 (91,4 - 100)	100 (91,7 - 100)	91,2 (80,0 - 96,7)
<i>C. koseri</i> (n = 18)	88,9 (63,9 - 98,1)	100 (95,1 - 100)	100 (75,9 - 100)	97,9 (91,9 - 99,6)
<i>C. amalonaticus</i> (n = 4)	100 (39,6 - 100)	100 (95,7 - 100)	100 (39,6 - 100)	100 (95,7 - 100)
<i>C. youngae</i> (n = 7)	100 (51,7 - 100)	95,2 (88,7 - 98,2)	54,5 (24,6 - 81,9)	100 (95,4 - 100)
<i>C. braakii</i> (n = 9)	100 (62,9 - 100)	100 (95,5 - 100)	100 (62,9 - 100)	100 (95,5 - 100)
<i>C. werkmanii</i> (n = 15)	100 (74,7 - 100)	99,0 (93,5 - 99,9)	93,8 (67,7 - 99,7)	100 (95,2 - 100)

IC 95%: intervalo de confianza del 95%; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo.

TABLA 3. Distribución de especies de *Citrobacter* según material clínico

Especies (nº de aislamientos)	Nº de aislamientos							
	Orinas	Herida quirúrgica	Heces	Sangre	Catéter	Secreción conjuntival	Material respiratorio	Piel y partes blandas
<i>C. freundii</i> (59)	37	11	3	2	0	1	1	4
<i>C. koseri</i> (18)	9	3	3	0	0	1	1	1
<i>C. werkmanii</i> (15)	5	4	3	2	0	0	1	0
<i>C. braakii</i> (9)	3	1	5	0	0	0	0	0
<i>C. youngae</i> (6)	3	0	1	1	1	0	0	0
<i>C. amalonaticus</i> (4)	4	0	0	0	0	0	0	0
Total (111)	61 (54,9%)	19 (17,1%)	15 (13,5%)	5 (4,5%)	1 (0,9%)	2 (1,8%)	3 (2,7%)	5 (4,5%)

lugar respectivamente. Numerosas publicaciones describen aislamientos de *C. koseri* en pacientes con meningitis y abscesos cerebrales, sin embargo en este período no se halló *C. koseri* en líquido cefalorraquídeo y/o tejido cerebral^{2, 3, 11, 12}.

Arens et al¹⁰ comunicaron la distribución de *Citrobacter* spp. en especímenes clínicos sin discriminar la especie. Para estos autores el tracto urinario fue el sitio de aislamiento más frecuente. De 60 cepas de *C. freundii* estudiadas por Janda et al provenían 23 de muestras de orina y 16 de heces⁹. En este estudio también *C. freundii* se aisló con mayor frecuencia de orina y materia fecal.

La mayor frecuencia de aislamientos urinarios de *C. koseri* obtenidos en este estudio también fue comunicada por Janda⁹.

C. amalonaticus fue aislado de orina, en tanto que, en el estudio de Janda et al⁹ las heces fueron prácticamente el único espécimen clínico de donde se aisló esta especie (16 de 17 cepas).

Janda et al⁹ hallaron que las especies *C. werkmanii*, *C. braakii* y *C. youngae* provenían casi exclusivamente del tracto intestinal. A diferencia de dichos autores, la distribución de tales especies en este estudio fue más heterogénea, pues fueron aislados, además, de orinas, heridas quirúrgicas y sangre.

El esquema de O'Hara et al podría ser una alternativa válida para la identificación de las citrobacterias en los laboratorios de microbiología dado que éstas son importantes patógenos oportunistas.

Agradecimiento

Este trabajo fue realizado con el aporte del proyecto UBACyT: TB74.

Bibliografía

1. Farmer JJ III, Davis BR, Hickman-Brenner FW, Mc Whorter A, Huntley-Carter GP, Asbury MA, et al. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21: 46-76.
2. Ewing WH, Davis BR. Biochemical characterization of *Citrobacter diversus* (Burkey) Werkman and Gillen and designation of the neotype strain. *Int J Syst Bacteriol* 1972; 22: 12-18.
3. Dyer J, Hayani KC, Janda WM, Schreckenberger PC. *Citrobacter sedlakii*: meningitis and brain abscess in a premature infant. *J Clin Microbiol* 1997; 33: 242-245.
4. Lopardo H, Pellegrino P, Grinberg J, Pinheiro JL, Rubeglio E. Diferenciación de las nuevas especies de *Citrobacter* provenientes de urocultivos de un Hospital Pediátrico. Libro de resúmenes del I Congreso Internacional de Infectología y Microbiología Clínica. 1997: 161.
5. Brenner DJ, Grimont PAD, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF. Classification of citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanii* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov. and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol* 1993; 43: 645-658.
6. O'Hara CM, Roman SB, Miller JM. Ability of commercial identification systems to identify newly recognized species of *Citrobacter*. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 242-245.
7. Schauer DB, Zabel BA, Pedraza IF, O'Hara CM, Steigerwalt AG, Brenner DJ. Genetic and biochemical characterization of *Citrobacter rodentium* sp. nov. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2.064-2.068.
8. Brenner DJ, O'Hara CM, Grimont PAD, Janda JM, Falsen E, Aldova E, et al. Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 10) and *Citrobacter murlinae* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genomospecies 11). *J Clin Microbiol* 1999; 37: 2.619-2.624.
9. Janda JM, Abbott SL, Cheung WKW, Hanson DF. Biochemical identification of *Citrobacter* in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1.850-1.854.
10. Arens S, Vahaagen J, Verbist L. Differentiation and susceptibility of *Citrobacter* isolates from patients in a university hospital. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 53-58.
11. Williams WW, Mariano J, Spurrier M, Donell HD, Beckenridge RL, Anderson RL, et al. Nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates: new aspects of the epidemiology. *J Infect Dis* 1984; 150: 229-235.
12. Graham DR, Anderson RL, Ariel FE, Ehrenkranz NJ, Rowe B, Boer HR et al. Epidemic nosocomial meningitis due to *Citrobacter diversus* in neonates. *J Infect Dis* 1981; 144: 203-209.