

Isolation of biofilm producing microorganisms isolated from urinary indwelling catheter in geriatric hospitalized patients

Sergio Frugoni¹, Andrea Anicito¹, Maria Aurora Burgio², Letizia Tagliabue³, Paolo Landini³, Agata Lanzafame⁴, Roberto Mattina⁴

¹ Azienda Servizi alla Persona Istituti Milanese Martinetti e Stelline e Pio Albergo Trivulzio, Servizio di Medicina di Laboratorio, Milano

² MultiLab, Multimedita Holding, Milano

³ Dipartimento di Scienze Biomolecolari e Biotecnologie, Università di Milano, Milano

⁴ Dipartimento di Sanità Pubblica, Microbiologia e Virologia Università di Milano, Milano

Key words: Biofilm, indwelling catheter, geriatric patients

Isolamento di microrganismi produttori di biofilm da cateteri vescicali permanenti di pazienti geriatrici istituzionalizzati

SUMMARY

Introduction: In nature, bacterial cells can exist in two different states: individual (planktonic) cells, or biofilm. In biofilms, bacterial cells are adherent to a surface and contained in an extracellular matrix mainly composed of polysaccharides and proteins. The cells in biofilms differ from planktonic counterparts for a different pattern of gene expression and increased resistance to antibiotics. This means that biofilms in hospital can cause persistent infections, due to the immunocompromised state of the patient and from a previous infection or exposure to the antibiotic. The aim of our work was to: 1) to assess the presence of microorganisms in institutionalized geriatric patients carrying indwelling catheter 2) assess the ability of gram-negative microorganisms to produce biofilm.

Methods: 150 samples from urine of patients with indwelling urinary catheter hospitalized at ASP Pio Albergo Trivulzio were studied. Adhesion of bacteria was tested using LB medium diluted 1:4 and staining the biofilm cells with crystal violet.

Results: 120 samples (80%) tested positive for the presence of microorganisms; in 96 samples only one microorganism was detected, while 24 were contaminated with 2 or more bacterial species. 88% of isolates testing positive to a single species consisted of Gram negative microorganisms: *E. coli* (48%), *P. mirabilis* (16%), *P. aeruginosa* (13%), *K. pneumoniae* (5%), *P. stuartii* (2%), *C. freundii* (1%), *E. aerogenes* (1%), *E. cloacae* (1%), *K. oxytoca* (1%), *M. morganii* (1%). Adhesion assays show that all strains of *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* and *C. freundii* isolates produced biofilm. In contrast, strains of *E. aerogenes* and *M. morganii* did not produce any biofilm. 26% of *E. coli* strains were able to produce biofilm, as well as 93% of *P. mirabilis* and 50% of *P. stuartii*. Overall, 55% of Gram negative microorganisms isolated were capable of producing biofilms.

Conclusion: The use of a nutritionally poor medium (LB diluted 1:4) and a synthetic substrate define an experimental model *in vitro* that plays in a relatively faithful to what may occur *in vivo*. The fact that biofilms are known to be more tolerant to antibiotics and the high proportion of biofilm-forming bacteria isolated from patients carrying indwelling underlines the need for novel antimicrobial agents with higher potency on bacterial biofilms than the ones currently used in therapy.

INTRODUZIONE

In natura le cellule batteriche esistono come cellule singole (plancton) o come biofilm (5). Il biofilm rappresenta un sistema biologico con un alto livello di organizzazione, dove i batteri sono adesi a una superficie e strutturati in comunità funzionali (4). Le cellule del biofilm, adese a una superficie e contenute in una matrice extracellulare composta essenzialmente da polisaccaridi e proteine, differiscono dalla controparte planctonica per un diverso pattern di espressione genica e per una maggiore resistenza agli antibiotici (1).

In ambienti ospedalieri i biofilm possono essere causa di infezioni persistenti, favorite dallo stato di immunocompromissione del paziente e da una precedente infezione o da esposizione all'antibiotico (2).

Scopo del nostro lavoro è stato quello di: 1) valutare la presenza di microrganismi in pazienti geriatrici istituzionalizzati portatori di catetere vescicale permanente, 2) valutare la capacità dei microrganismi Gram negativi di produrre biofilm.

METODI

Il metodo utilizzato è stato quello di esaminare 150 campioni di urine da pazienti portatori di catetere vescicale permanente, ricoverati presso l'A.S.P Pio Albergo Trivulzio. Le urine sono state seminate con ansa calibrata da 1 microlitro su piastre di CLED agar e Mac Conkey agar e incubate a 35°C per una notte in termostato ad aria. Per i saggi di adesione sono state utilizzate micropiastre con fondo a "U", terreno LB diluito 1:4 e colorazione con cristalvioletto (3).

La micropiastre inocolata è stata incubata per una notte alla temperatura di 37°C in termostato ad aria. Prima della colorazione con cristalvioletto si sono effettuati lavaggi con

acqua distillata sterile. Per la rilevazione di enzimi di tipo ESBL, MBL e AmpC sono state utilizzate strip E-test (bioMérieux).

La Figura I rappresenta una micropiastre con test di adesione sia di alcuni microrganismi isolati, sia dei controlli positivo e negativo.

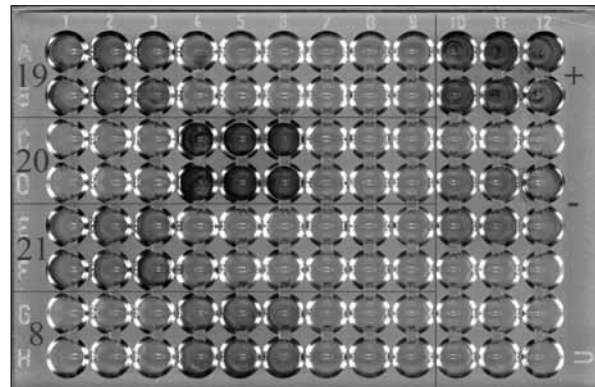


Figura I. Micropiastre con test di adesione.

RISULTATI

Sono risultati positivi 96 (64%) campioni, negativi 30 (20%), contaminati (campioni con più di due microrganismi isolati) 24 (16%). 85 (88%) degli isolati erano costituiti da microrganismi Gram negativi: *E. coli* (48%), *P. mirabilis* (16%), *P. aeruginosa* (13%), *K. pneumoniae* (5%), *P. stuartii* (2%), *C.*

Corresponding author: Sergio Frugoni

Azienda Servizi alla Persona Istituti Milanese Martinetti e Stelline e Pio Albergo Trivulzio,

Servizio di Medicina di Laboratorio - 20146 Milano - Italy - Via Trivulzio 15

Tel.: +39-02-4029544; Fax: +039- 02-4029549; E-mail: sergio.frugoni@pioalbergotrivulzio.it

freundii (1%), *E. aerogenes* (1%), *E. cloacae* (1%), *K. oxytoca* (1%), *M. morgani* (1%). Dai saggi di adesione si evidenzia che tutti i ceppi isolati di *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* e *C. freundii* producevano biofilm. Nei ceppi di *E. aerogenes* e *M. morgani* non si è osservata alcuna produzione di biofilm. Il 26% dei ceppi di *E. coli* è risultato produttore di biofilm, così come il 93% di *P. mirabilis* e il 50% di *P. stuartii*. Complessivamente il 55% dei microrganismi Gram negativi isolati è risultato in grado di produrre biofilm.

Tutti i ceppi isolati sono stati sottoposti ad indagini per la rilevazione di ESBL, MBL ed enzimi di tipo AmpC. Il 43% dei ceppi di *E. coli* è risultato produttore di ESBL, *P. mirabilis* per il 33% e *K. pneumoniae* per il 20%. Complessivamente il 30% dei ceppi batterici esaminati producevano ESBL mentre AmpC è stato riscontrato nel 3.5% (2 ceppi di *P. mirabilis*, 1 di *C. freundii*).

La percentuale dei ceppi di *P. aeruginosa* isolati produttori di MBL è risultata dell'8%. Non è stata riscontrata correlazione tra questi enzimi di resistenza e la produzione di biofilm.

CONCLUSIONI

Il lavoro sperimentale ha portato alle seguenti conclusioni:

1. L'utilizzo di un terreno povero nutrizionalmente (LB diluito 1:4) e di un supporto sintetico definiscono un modello sperimentale *in vitro* che riproduce in maniera relativamente fedele ciò che può accadere *in vivo*.
2. L'alta percentuale di batteri in grado di formare biofilm pone, in questo tipo di pazienti, il problema di una terapia diversa da schemi terapeutici convenzionali e maggiormente rivolta ai biofilm in quanto più tolleranti agli antibiotici.

BIBLIOGRAFIA

1. Istituto Superiore di Sanità. Biofilm microbici 2005. Workshop nazionale 2005.
2. Keays T, et al. A retrospective analysis of biofilm antibiotic susceptibility testing: a bacter predictor of clinical response in cystic fibrosis exacerbations. *J Cystic Fibros.* 2009; 8: 122-7.
3. Mathur T, Singhal S, Khan T, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of *Staphylococci*: an evaluation of three different screening methods. *Indian J Med Microbiol.* 2006; 24 (1): 25-9.
4. Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriology.* 2000; 182 (10): 2675-9.
5. Webb JS, Giuskov M, Kjelleberg S. Bacterial biofilm: prokaryotic adventures in multicellularity. 2003; 6: 578-85.