

Emergence of carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* strains in Padua (Italy) from January 2008 to July 2012: phenotypic and genotypic assays

Andrea Bartolini¹, Ilaria Frasson², Maria Angela Biasolo^{1,2}, Ettore De Canale¹, Tiziana Tommasini¹, Caterina Boldrin¹, Lucia Rossi¹, Sara N. Richter^{1,2}, Antonietta Cavallaro¹

¹ Servizio di Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera di Padova

² Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova, Padova

Key words: Carbapenem-resistance, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemase, Metallo- β -Lactamase

Resistenze emergenti ai carbapenemi in ceppi di *Enterobacteriaceae* nel periodo 2008-2012: test fenotipici e genotipici

SUMMARY

Introduction: In the management of nosocomial infections, the emergence of carbapenem-resistance in *Enterobacteriaceae* strains is a matter of increasing concern. The aim of this study was to detect and actively survey the presence of these strains by using phenotypic and genotypic assays.

Methods: The screening of the strains with reduced carbapenem susceptibility was carried out using the automated Vitek®2 System (bioMérieux). Subsequently, we performed both different confirmation phenotypic assays (Modified Hodge Test, Kirby-Bauer test, Etest® MBL MP/MPI, Etest® AmpC, Mueller-Hinton/cloxacillin test) and molecular identification tests (PCR assays).

Results: All the screened carbapenemase-producing strains (on the bases of the phenotypic tests results) were confirmed to harbour β -lactamase genes (by PCR analysis): 460 strains were positive for the presence of the *bla*KPC and 6 for the presence of the *bla*VIM gene.

Conclusions: KPC-positive *Klebsiella pneumoniae* strains caused in our hospital, in the period 2008-2012, an outbreak of infection that was subsequently restricted with effective containment measures.

It is mandatory that all carbapenemase-producing species will be closely monitored in hospital setting, to contain the possible rapid spread of strains showing more expansion properties and virulence.

INTRODUZIONE

Poiché i carbapenemi rappresentano la scelta terapeutica di riferimento nel caso di infezioni invasive da enterobatteri multi-antibiotico-resistenti, l'emergere di ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi costituisce un problema clinico rilevante nella gestione delle infezioni nosocomiali (1, 2, 4). Inizialmente appannaggio delle Unità di Terapia Intensiva, la diffusione di ceppi resistenti ai carbapenemi si è successivamente estesa a tutti gli ambiti ospedalieri, fino a coinvolgere pazienti non ospedalizzati, con infezioni "acquisite in comunità" (2). Il principale meccanismo di carbapenemico-resistenza è rappresentato dall'acquisizione/espressione di nuove β -lattamasi, dotate di attività idrolitica nei confronti dei carbapenemi. Gli enzimi attualmente più diffusi sono costituiti dalle carbapenemasi di Classe A (quali la KPC "*Klebsiella-pneumoniae*-carbapenemase"),

le carbapenemasi di Classe B o Metallo- β -Lattamasi (di tipo VIM e NDM) e le oxacillinasi di Classe D (OXA-48-like) (1, 3).

La specie batterica che più frequentemente esprime questi meccanismi è *K. pneumoniae*, seguita da *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* e da altre specie (3).

Lo scopo di questo studio è stato identificare e monitorare la presenza, nel nostro ospedale, di ceppi produttori di carbapenemasi ciò tramite l'utilizzo di test fenotipici e genotipici (3, 4, 5, 6).

METODI

Lo studio è stato condotto presso l'U.O.C. di Microbiologia e Virologia di Padova nel periodo Gennaio 2008 - Luglio 2012.

Il monitoraggio è stato eseguito sia sui campioni provenienti dai reparti ospedalieri che da quelli ambulatoriali di nostra afferenza.

Corresponding author: Andrea Bartolini

Servizio di Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera di Padova,
Via Giustiniani 2, 35128 Padova - Tel 049 821305 - Fax 049 8213054
E-mail: andbarto@libero.it

Lo *screening* degli enterobatteri potenziali produttori di carbapenemasi è stato eseguito mediante l'utilizzo del sistema automatizzato Vitek®2 (bioMérieux). Sono stati selezionati gli isolati che presentavano diminuita sensibilità ad ertapenem, imipenem e meropenem ($MIC \geq 1$ mg/L).

Su tali ceppi sono stati eseguiti i seguenti test fenotipici di conferma:

- 1) Test di Hodge modificato, basato sulla riduzione dell'attività del carbapenemico saggiato nei confronti di un ceppo indicatore sensibile (ceppo di riferimento *E. coli* ATCC25922, controllo positivo *K. pneumoniae* ATCCBAA-1705, controllo negativo *K. pneumoniae* ATCCBAA-1706),
- 2) Antibiogramma secondo il metodo in disco-diffusione (Test di Kirby-Bauer),
- 3) Etest® MBL (MP/MPI) per la rivelazione di Metallo- β -Lattamasi,
- 4) Etest® AmpC e test su terreno Mueller-Hinton addizionato con cloxacillina per l'individuazione degli isolati produttori di β -lattamasi di tipo AmpC.

Inoltre sono stati eseguiti test genotipici di conferma con PCR per l'identificazione di carbapenemasi di tipo KPC, Metallo- β -Lattamasi (VIM e NDM), OXA-48-like e di β -lattamasi di tipo AmpC

RISULTATI

I ceppi positivi allo *screening* mediante Vitek®2 risultavano essere (Tabella 1):

K. pneumoniae: 7 ceppi nell'anno 2008, 33 ceppi nel 2009, 114 ceppi nel 2010, 174 ceppi nel 2011 e 130 ceppi nel 2012 (fino a Luglio compreso);

Enterobacter cloacae: 2 ceppi nell'anno 2011 ed 1 ceppo nel 2012 (fino a Luglio compreso);

Escherichia coli: 1 ceppo nell'anno 2010 ed 1 ceppo nel 2012 (fino a Luglio compreso);

Enterobacter aerogenes: 2 ceppi nell'anno 2012 (fino a Luglio compreso).

Gli isolati risultati positivi ai test fenotipici di conferma e successivamente identificati albergare

geni di resistenza per i carbapenemi mediante PCR risultavano essere:

KPC-produttori: 460 ceppi (di cui 458 ceppi di *K. pneumoniae* e 2 ceppi di *E. coli*);

VIM-produttori: 6 ceppi (di cui 3 ceppi di *K. pneumoniae* e 3 ceppi di *E. cloacae*).

È da segnalare inoltre che 3 ceppi di *K. pneumoniae* albergavano sia geni per la produzione di carbapenemasi di tipo KPC che di tipo VIM. Non sono risultati presenti isolati positivi per determinanti di tipo NDM né di tipo OXA-48-like.

I ceppi di *E. aerogenes* non sono risultati carbapenemasi-produttori; la diminuita sensibilità ai carbapenemi è stata attribuita alla produzione di β -lattamasi di tipo AmpC ed alla concomitante alterazione delle porine.

CONCLUSIONI

Isolati clinici di *K. pneumoniae* KPC-positivi sono risultati responsabili di un *outbreak* ospedaliero che è stato successivamente limitato con misure di contenimento efficaci. Le altre specie di *Enterobacteriaceae* risultate positive per la presenza di determinanti di tipo KPC e VIM hanno prodotto un numero di infezioni contenute. Risulta tuttavia importante attuare una attenta sorveglianza che comprenda tutte le specie carbapenemico-resistenti, al fine di contenere l'eventuale rapida diffusione di ceppi con spiccate caratteristiche di diffusione e virulenza.

Esperienze in varie Aziende Ospedaliere hanno dimostrato come eradicare o contenere fortemente la diffusione delle infezioni sia possibile solo attraverso interventi di controllo aggressivi e mirati ad individuare tempestivamente le infezioni clinicamente manifeste ed i pazienti colonizzati.

Ciò permette di applicare in modo tempestivo le idonee misure di contenimento della diffusione (isolamento dei pazienti, igiene delle mani da parte degli operatori sanitari, dei pazienti e dei visitatori, pulizia e decontaminazione ambientale ecc...).

Con l'obiettivo di poter efficientemente contenere l'emergenza di focolai ospedalieri, sono state

Tabella 1. Numero delle differenti specie di enterobatteri con $MIC \geq 1$ mg/L per ertapenem, imipenem e meropenem mediante sistema automatizzato Vitek®2 (bioMérieux) nel periodo 2008-2012.

ANNO	SPECIE			
	KLPN	ENCL	ESCO	ENAE
2008	7	0	0	0
2009	33	0	0	0
2010	114	0	1	0
2011	174	2	0	0
2012*	130	1	1	2
TOTALE	458	3	2	2

Legenda. KLPN: *Klebsiella pneumoniae*; ENCL: *Enterobacter cloacae*; ESCO: *Escherichia coli*, ENAE: *Enterobacter aerogenes*.

*fino a Luglio 2012 compreso.

recentemente messe a punto numerose linee guida Nazionali ed Internazionali.

Il Laboratorio di Microbiologia deve perciò acquisire dimestichezza nel riconoscimento di tali ceppi mediante l'uso appropriato e combinato di multipli *test* fenotipici e, ove possibile e necessario, completare la caratterizzazione con ricerche genotipiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17 (10): 1791-8.
2. Gaibani P, Ambretti S, Berlinger A, et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March-30 September 2010. *Euro Surveill* 2011; 16 (8).
3. Luzzaro F, Pagani L, Rossolini GM, Sarti M, Stefani S, Varaldo PE. Indicazioni per la conferma fenotipica della produzione di carbapenemasi nelle *Enterobacteriaceae*. Comitato di Studio AMCLI per gli Antimicrobici (CoSA). AMCLI 2012.
4. Gagliotti G, Cappelli V, Carretto E, et al. Indicazioni pratiche e protocolli operativi per la diagnosi, la sorveglianza e il controllo degli enterobatteri produttori di carbapenemasi nelle strutture sanitarie e socio-sanitarie. Azienda sanitaria e sociale regionale Emilia-Romagna 2011.
5. Richter SN, Frasson I, Biasolo MA, Bartolini A, Cavallaro C, Palu G. Ultrarapid detection of blaKPC_{1/2-12} from perirectal and nasal swabs by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (5): 1718-20.
6. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (12): 3877-80.