

Incidence of *Acinetobacter baumannii* and other pathogens isolated from Intensive Care Unit of the Hospital San Carlo, Genoa - Voltri

Silvana Delfino¹, Alessandro Smeraldi¹, Orietta Illiberi¹, Matteo Piazzai¹, Elisabetta Schellino¹, Alida Galleano¹, Susanna Oddera¹, Antonio Lapolla², Luigi Carlo Bottaro¹

¹ Dipartimento Patologia Clinica, ASL 03 genovese, Ospedale San Carlo Voltri

² Unità di Rianimazione, ASL 03 genovese, Ospedale San Carlo Voltri

Key words: *Acinetobacter baumannii*, Intensive care unit, Epidemiology, Susceptibility to antibiotics

Incidenza di *Acinetobacter baumannii* e altri patogeni isolati da un reparto di terapia intensiva del Presidio Ospedaliero San Carlo di Voltri ASL3 Genovese

SUMMARY

Acinetobacter baumannii is an emerging pathogen of great impact especially in nosocomial settings due to its complex epidemiology that makes its control very difficult.

In this study the strains isolated from the Intensive Care Unit were analysed.

Materials and methods. All the patients admitted into intensive care of San Carlo Hospital, Voltri, Genoa, Italy (ASL 3) in the period from May to December 2009 were considered. A total of 63 patients were studied including 31 women and 32 men, with an average of 73 years old. The study considered the following biological samples (N): bronchial aspirate and sputum (84), urine (55), blood (28), and other materials (36). The positive samples were processed for strain identification and evaluations of its antibiotic susceptibility pattern by standard VITEK2 system, following the Clinical and Laboratory Standard Institute Guidelines.

Results and Conclusions. From samples taken into account, the prevalent percentage of bacterial species collected was registered by Gram negative (46.3%), followed by Gram positive (36.4%), and fungi (17.3%). Considering Gram negative isolates *A. baumannii* and *Escherichia coli* resulted among the prevalent pathogens (23.4 and 24.5% respectively). This microorganism was collected especially from bronchial aspirate (13) followed by urines (4), blood cultures (2) and other materials (3). On the basis of the analysis of the antibiotic susceptibility tests, colistin was active on the totality (100%) of *A. baumannii*, followed by tigecycline (96.77%). Amikacin resulted also active against a large proportion of these isolates (93.3%).

Present findings confirm the great multidrug resistance phenotype of *A. baumannii* against the main classes of antimicrobial agents and its dangerous diffusion in the Intensive Care Units. For these reasons a continuous surveillance of this pathogen toward antibiotic resistance is requested. In this contest it will be important an evaluation of antibiotic susceptibility following the guidelines suggested by EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

INTRODUZIONE

Acinetobacter baumannii è un patogeno emergente di grande impatto nel contesto della salute pubblica in quanto ha un'epidemiologia complessa che rende difficile il suo controllo.

È la causa di infezioni e di numerose epidemie in ospedali di vari continenti, ed è il responsabile dal 2% al 10% di tutte le infezioni causate da germi Gram negativi nelle unità di terapia intensiva in Europa e Stati Uniti (1, 2, 5, 9). In particolare, le infezioni causate da questo organismo riguardano soprattutto pazienti ricoverati in stato critico, in particolare, quelli in età avanzata, portatori di malattie gravi, immunodepressi, traumatizzati gravi o ustionati. In soggetti sani, si può avere una colonizzazione della pelle con una densità ridotta e di breve periodo, la colonizzazione della faringe e del tratto digestivo è considerata invece eccezionale. Altri fattori di rischio sono le procedure invasive, cateteri permanenti, supporti di ventilazione meccanica, periodi prolungati di ricovero e di terapia antibiotica.

Le principali sindromi provocate da questo patogeno includono polmonite; batteriemie; infezioni delle ferite chirurgiche; infezioni della pelle e dei tessuti molli; infezioni del tratto urinario; meningiti secondarie; e peritonite nei pazienti con dialisi peritoneale (9, 10).

Dal punto di vista epidemiologico esistono tre cloni che si differenziano fra di loro per la presenza di diversi integroni veicolanti geni che codificano per caratteri di resistenza agli antibiotici. In Italia prevale l'integrone OXA58, responsabile dell'attività di carbapenemasi (4, 8). Per tali motivi e, considerando che spesso *A. baumannii*, presenta resistenza, oltre

che ai carbapenemici, a una o più classi di antibiotici, rendendo la scelta dei principi attivi utilizzabili a volte del tutto impossibile, appare necessario individuare nuovi farmaci attivi su questo patogeno e condurre indagini epidemiologiche tese a verificare l'incidenza di *A. baumannii* nei vari Presidi Ospedalieri e valutare la sensibilità agli antibiotici dei vari microorganismi di questa ed altre specie isolati da diversi materiali patologici.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'incidenza di *A. baumannii* isolato dal reparto di terapia intensiva di un grosso comprensorio ospedaliero ligure e determinare la sua sensibilità agli antibiotici in uso corrente e ad un nuovo antibiotico, la tigeciclina, un derivato della tetraciclina, che mostra attività su questo e diversi altri patogeni (3, 6).

MATERIALI E METODI

Sono stati considerati tutti i pazienti ricoverati nell'Unità di Terapia Intensiva (UTI) del Presidio Ospedaliero San Carlo di Genova Voltri (ASL 3) nel periodo da maggio a dicembre 2009. Globalmente sono stati esaminati 63 pazienti, 31 donne e 32 uomini, con un'età media di 73 anni. Lo studio è stato basato sull'analisi dei seguenti campioni biologici: broncoaspirati, espettorati, emocolture, urine e altri materiali. I campioni sono stati seminati sugli appositi terreni standard per la crescita dei germi Gram positivi, Gram negativi, incluso le specie esigenti dal punto di vista colturale, e miceti. I germi dei campioni risultati positivi all'esame colturale sono stati isolati per poi essere identificati attraverso la metodologia standard del sistema VITEK2, utilizzato anche per determinare le MIC (questo sistema di analisi si basa sulle linee

Corresponding author: Silvana Delfino

ASL3 Ospedale San Carlo

P.le Giannasso 2, 16158 Genova-Voltri

E-mail: silvanadelfino@gmail.com

guida del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2005). I ceppi isolati in doppio da uno stesso paziente non sono stati inclusi nello studio.

E. coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ed *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, sono stati aggiunti nei saggi di sensibilità agli antibiotici come controlli di qualità.

RISULTATI

L'indagine preliminare mirata ad individuare le infezioni che più frequentemente si verificano nelle unità di terapia intensiva ha messo in evidenza che le polmoniti (53% di tutte le malattie infettive), seguite dalle infezioni delle vie urinarie (19.2%) e dalle sepsi (13%), rappresentano le patologie che coinvolgono il maggior numero di pazienti. La mortalità per infezioni in reparti di terapia intensiva supera il 40%.

Il numero totale dei campioni positivi riscontrati nel periodo dello studio sono stati 466. Di questi 466 sono stati considerati i 156 campioni che per primi hanno permesso l'isolamento del microorganismo in quel dato paziente. Da questi campioni sono stati isolati 203 microrganismi, non ripetuti dallo stesso paziente, rappresentati più in dettaglio e tenendo conto della loro origine nella Tabella 1. Dalla percentuale di pazienti risultati positivi è emersa una maggior incidenza di germi Gram negativi (46.3%) rispetto ai Gram positivi (36.4%) e alle Candida (17.3%).

E. coli (11.3%), *A. baumannii* e *S. aureus* (10.8%), *E. faecalis* (9.3%) e *P. aeruginosa* (7.9%) sono stati tra i patogeni più frequentemente isolati, seguiti da *Staphylococcus epidermidis* (6.4%), *Klebsiella pneumoniae* (5.0%) e *Enterococcus faecium* (3.9%) (Tabella 1). La maggior parte dei ceppi è stata isolata da materiale delle vie respiratorie ove *S. aureus* e *A. baumannii* con 22 unità ciascuno sono risultati i germi più isolati da questo distretto anatomico (Tabella 1).

I miceti, in particolare le Candida (47) rappresentano un'altra buona parte dei microrganismi isolati da campioni di materiale respiratorio.

Considerando i saggi per la valutazione della sensibilità agli antibiotici e prendendo in esame i ceppi Gram positivi (Tabella 2), i dati ottenuti evidenziano una scarsa attività dei beta-lattamici su tutte le specie saggiate. La quota dei ceppi resistenti non è mai inferiore al 50% degli isolati da ambiente nosocomiale, mentre sui ceppi comunitari la quota dei microrganismi insensibili è risultata leggermente inferiore (40%). Come atteso i glicopeptidi dimostrano un'attività notevole nei confronti dei cocci Gram positivi saggiati, in particolare, con *E. faecalis* è stata registrata una resistenza del 5% alla vancomicina e completa sensibilità alla teicoplanina. Al contrario *E. faecium* ha manifestato una percentuale di resistenza ad entrambi i glicopeptidi con il 12.5 e 25% rispettivamente alla teicoplanina e alla vancomicina. Tra gli inibitori della sintesi proteica la gentamicina ha evidenziato una notevole attività inibente su *S. aureus* con il 9.1% di ceppi resistenti, mentre nei confronti degli altri isolati la percentuale di insensibilità non è mai stata inferiore all'80%. Per quanto riguarda i macrolidi, sia l'eritromicina sia la claritromicina e l'azitromicina hanno mostrato una scarsa attività su questi Gram positivi con percentuali di resistenza non inferiori al 50% di tutti gli isolati indipendentemente dalla loro origine comunitaria o nosocomiale. I fluorochinoloni, non hanno evidenziato una buona attività sui cocci Gram positivi con quote di resistenza superiori al 59% con l'eccezione di moxifloxacina che ha mostrato di inibire oltre il 70% degli stafilococchi.

La tetraciclina ha messo in evidenza una valida attività antimicrobica nei confronti degli stafilococchi con percentuali di resistenza non superiori al 15.4% mentre sugli enterococchi questa molecola ha incontrato una quota di resistenti pari al 37.5% di *E. faecalis* e del 95% su *E. faecium*. L'associazione trimetoprim-sulfametossazolo ha inibito la totalità degli *S. aureus*, poco meno del 70% di *S. epidermidis*. Similmente la rifampicina che conferma la sua eccellente potenza su tutti gli *S. aureus* ma non riesce ad inibire oltre il 70% degli *S. epi-*

dermidis. E, come atteso, è risultato in parte attivo su *E. faecium* ma non su *E. faecalis*.

Linezolid ha espresso una notevole attività su tutti gli stafilococchi (nessun resistente) e solo il 12.5 e 5% degli enterococchi rispettivamente *E. faecium* ed *E. faecalis* sono risultati refrattari all'attività di questo composto. Per quanto riguarda tigeciclina, il farmaco non ha incontrato alcun ceppo Gram positivo resistente tra tutti quelli esaminati.

Considerando i ceppi Gram negativi (Tabella 3), *A. baumannii* dimostra una notevole resistenza a molte classi di farmaci incluso le più potenti a nostra disposizione con frequenze che oscillano tra circa il 96 e 100% di tutti gli antibiotici saggiati fanno eccezione l'amikacina e la tigeciclina che hanno fatto registrare rispettivamente il 6.67 e il 3.33% di percentuale di microrganismi resistenti, e la colistina pienamente attiva su questi patogeni (Tabella 3). Tra gli altri Gram negativi appaiono poco attivi molti antimicrobici dove l'incidenza di ceppi resistenti è, in generale, superiore al 20%, così come per molti altri composti che evidenziano sui ceppi saggiati alte percentuali di insensibilità in funzione della specie batterica studiata. In particolare tra le penicilline solo quelle protette e in particolare la piperacillina-tazobactam dimostra di avere una buona attività su questi ceppi con una quota di resistenti massima del 31.25% su *P. aeruginosa*. Le cefalosporine e l'imipenem sono state in grado di inibire una buona quota di ceppi della famiglia delle *Enterobacteriaceae* con resistenza massima del 37.50% all'imipenem nei confronti di *K. pneumoniae*, mentre su *P. aeruginosa* è stata osservata una frazione di resistenza intorno al 30% o poco più a questi composti (Tabella 3). Per quanto riguarda gli aminoglicosidi, l'amikacina è stata efficace sulla maggior parte dei ceppi studiati, con una resistenza non superiore al 16.67% fatta registrare da *Proteus mirabilis*, mentre la gentamicina ha dimostrato un'utile attività inibente su *E. coli* e *K. pneumoniae* mentre *P. mirabilis* e *P. aeruginosa* sono risultati piuttosto refrattari nei confronti di questo antibiotico. I fluorochinoloni hanno evidenziato una pressoché simile potenza antibatterica su tutti i ceppi saggiati, con l'eccezione di *P. mirabilis* ove levofloxacina ha inibito la totalità dei ceppi mentre ciprofloxacina non è stata efficace sul 33.33% degli isolati.

Il cotrimoxazolo ha mostrato scarsa attività su questi microrganismi con percentuali di resistenza non inferiori al 30% dei germi saggiati. Per quanto riguarda la tigeciclina è stata osservata una notevole attività inibente su tutti i patogeni analizzati con l'eccezione di *P. aeruginosa* ove è risultata praticamente inefficace. La colistina infine è stata in grado di inibire molti dei microrganismi studiati con l'eccezione di *P. mirabilis*. Il numero di isolati saggiati di *Stenotrophomonas maltophilia* di numero non superiore a 5, ha tollerato la presenza di tutti i farmaci con l'eccezione di cotrimoxazolo e tigeciclina che sono risultati totalmente attivi su questa specie.

DISCUSSIONE

I risultati di questa indagine indicano che *A. baumannii*, isolato prevalentemente da broncoaspirati ed espettorati è uno dei principali responsabili di infezioni e/o colonizzazioni nel reparto di rianimazione, confermando l'importanza epidemiologica di questo patogeno. Un aspetto particolarmente importante è che questo germe è di origine unicamente nosocomiale così come il meno incidente *S. maltophilia*.

A differenza degli altri patogeni opportunisti studiati, *A. baumannii* presenta un'incidenza di resistenza molto elevata a tutte le classi di farmaci, con l'eccezione di colistina, amikacina e di tigeciclina.

Una delle caratteristiche principali di questo microorganismo consiste nella rapida colonizzazione dei pazienti ricoverati che potrebbe sfociare in tempi brevi in una infezione a carico dei siti più importanti del corpo (4). La gestione della malattia spesso, come in questo caso, associata al germe responsabile dell'infezione o colonizzazione multiresistente, causa problematiche terapeutiche di difficile soluzione.

Un'indicazione suggerita da più parti è il monitoraggio dei

pazienti dal momento del ricovero e la prevenzione, operata in alcuni casi, con trattamento mediante farmaci anche in fase di sviluppo (8).

L'esiguo numero di molecole attive disponibile potrebbe inoltre esercitare una pressione selettiva da porre fuori gioco in poco tempo questi principi attivi. Attraverso un'intensa e proficua collaborazione tra laboratorio e reparto può esservi la soluzione che consente di intervenire non appena il paziente risulta colonizzato ma non ancora gravato da infezione, prendendo quelle misure che prevenziono l'instaurarsi della malattia.

Alla luce di questi primi risultati, il lavoro sarà in futuro rivalutato quando il nostro sistema analitico sarà aggiornato con le nuove regole EUCAST.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano il Professor Eugenio A. Debbia, della Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Chirurgiche e Diagnostiche Integrate (DISC) Università di Genova, per il determinante ed esperto contributo apportato in ogni fase del lavoro, dalla prima stesura alla revisione.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbo A, Navon Venezia S, Hammer Muntz O, Kritchell T, Slegman Igra Y, Carmell Y. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect*

Dis, 2005; 1: 22-9.

2. Bergogne-Berezin E. The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Curr Infect Dis Rep*, 2001; 3: 440-4.
3. Bouchillon SK, Iredell JR, Barkham T, Lee K, Dowzicky MJ. Comparative *in vitro* activity of tigecycline and other antimicrobials against Gram negative and Gram positive organism collected from the Asia-Pacific Rim as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST). *Int J Antimicrob Agents*, 2010; 36: 401-7.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Fifteenth supplement Institute, January 2005 25 (1), Replaces M100-S14, Vol. 24, No *Clinical and Laboratory Standards*, Wayne, PA.
5. Hanberger H, Garcia-Rodriguez JA, Gobernado M, Goossens H, Nilsson LE, Struelens MJ. Antibiotic susceptibility among aerobic Gram negative bacilli in intensive care units in 5 European countries. French and Portuguese ICU Study Groups. *JAMA*, 1999; 281: 67-71.
6. Jamal W, Salama M, Dehrab N, Al Haschem G, Shahin M, Rotimi VO. Role of tigecycline in the control of a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak. *J Hosp Infect*, 2009; 3: 234-42.
7. Jung JY, Moo Suk Park, Song Ee Kim, et al. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. *BMC Infectious Diseases*, 2010; 10: 228.
8. Ostorhazi E, Rozgonyi F, Sztodola A. Preclinical advantages of intramuscularly administered peptide A3-APO over existing therapies in *Acinetobacter baumannii* wound infections. *J. Antimicrob Chemother*, 2010; doi: 10.1093/jac/dkq337.
9. Villegas MV, Hartstein AI. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *ICHE*, 2003; 24: 284-95.
10. Won Suk Choi, Su Hyun Kim, Eun Gyong Jean, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in intensive care units and successful outbreak control program. *JKMS* 2010; 25: 999-1004.

Tabella 1. Distribuzione dei ceppi isolati in funzione del materiale.

Microrganismo	Materiale					%	
	BA	UR	SA	MV	N	intraspecie	interspecie
<i>Staphylococcus aureus</i>	17		1	4	22	29.7	10.8
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	13	2	4	20	27.0	9.8
<i>S.epidermidis</i>		1	9	3	13	17.6	6.40
<i>Enterococcus faecium</i>		5	2	1	8	10.8	3.9
<i>S. haemolyticus</i>			2	2	4		
<i>Staphylococcus hominis</i>			2		2		
<i>E. casseliflavus</i>		1			1		
<i>E. gallinarum</i>			1		1		
<i>S. intermedium</i>				1	1		
<i>S. warneri</i>			1		1		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		1			1		
Totale Gram positivi	18	21	20	15	74		36.4
<i>Acinetobacter baumannii</i>	13	4	2	3	22	23.4	10.8
<i>Escherichia coli</i>	8	11		4	23	24.5	11.3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	4	1	3	16	17.0	7.9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	3		1	10	10.6	5.0
<i>Proteus mirabilis</i>	2	3		1	6	6.4	3.0
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5				5	5.3	2.4
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	1			3		
<i>Serratia marcescens</i>	2			1	3		
<i>Citrobacter freundii</i>	1				1		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1				1		
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1				1		
<i>Morganella morganii</i>	1				1		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1			1		
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>			1		1		
<i>Chryseobacterium luteola</i>		1			1		
Totale Gram negativi	50	27	4	13	94		46.3
<i>Candida albicans</i>	9	4	1	4	18		
<i>Candida glabrata</i>	1	2	1	1	5		
<i>Candida tropicalis</i>	3			2	5		
<i>Candida famata</i>	2				2		
<i>Candida lusitanae</i>			1		1		
<i>Candida parapsilosis</i>		1			1		
<i>Candida ciferrii</i>	1				1		
<i>Candida famata</i>				1	1		
<i>Candida guilliermondii</i>			1		1		
Totale funghi	16	7	4	8	35		17.3
Numero	84	55	28	36	203		
Percentuale	41.4	27.00.00	13.8	17.8	100		

A,

Tabella 2. Incidenza (%) di resistenza agli antibiotici nei ceppi Gram positivi studiati.

Antibiotico	Ceppo (N. totale)							
	<i>S. aureus</i> (22)		<i>S. epidermidis</i> (13)		<i>E. faecalis</i> (20)		<i>E. faecium</i> (8)	
	Com(10)	Nos(12)	Com(2)	Nos(11)	Com(4)	Nos(16)	Com(2)	Nos(6)
Penicillina	80	100	50	100	ns	ns	ns	ns
Oxacillina	40	75	50	100	ns	ns	ns	ns
ampicillina	ns	ns	ns	ns	75	62.5	50	50
Amo/cla	40	75	50	90.9	0	0	50	50
Amp/sul	40	75	50	90.9	0	0	50	50
Ceftriaxone	40	75	50	90.9	ns	ns	ns	ns
Cefotaxime	40	75	50	90.9	ns	ns	ns	ns
Cefaclor	40	75	50	81.8	ns	ns	ns	ns
Imipenem	40	66.7	50	90.9	ns	ns	50	50
Vancomicina	10	0	0	9.1	25	0	100	0
Teicoplanina	10	0	0	9.1	0	0	0	0
Gentamicina	10	8.3	100	81.8	25	93.8	100	83.3
Eritromicina	50	67	100	90.9	75	100	100	100
Claritromicina	50	75	100	90.9	ns	ns	ns	ns
Azitromicina	50	75	100	90.9	ns	ns	ns	ns
Clindamicina	40	66.7	50	90.9	100	100	100	100
Streptomomicina HL	ns	ns	ns	ns	25	68.8	100	66.7
Ciprofloxacina	40	75	50	90.9	0	87.5	100	83.3
Moxifloxacina	20	33.3	0	27.3	24	87.5	100	83.3
Tetraciclina	10	17	0	18.2	100	93.8	50	33.3
Tri/Sul	0	0	50	27	100	100	100	100
Rifampicina	0	0	50	27	ns	ns	ns	ns
Fosfomicina	10	50	0	18	ns	ns	ns	ns
Qui/Dal	3	0	ns	0	ns	100	50	100
Linezolid	0	0	0	0	25	0	50	0
Tigeciclina	0	0	0	0	0	0	ns	0

Tabella 3. Incidenza (%) di resistenza agli antibiotici nei ceppi Gram negativi studiati.

Antibiotico	<i>A. baumannii</i> (22)		<i>E. coli</i> (23)		<i>P. mirabilis</i> (6)		<i>K. pneumoniae</i> (10)		<i>P. aeruginosa</i> (16)		<i>S. maltophilia</i> (5)	
	Com	Nos	Com	Nos	Com	Nos	Com	Nos	Com	Nos	Com	Nos
	(22)	(17)	(6)	(4)	(2)	(4)	(6)	(3)	(13)	(5)		
Ampicillina	100	70.6	60	50	50	100	100	ns	ns	100		
Amo/cla	100	29.4	40	50	50	25	33.3	ns	ns	100		
Pip/taz	ns	0	0	25	0	0	33.3	0	38.5	100		
Ceftazidime	96.7	6.25	33.3	25	50	0	33.3	0	38.5	60		
Cefepime	96.7	6.25	33.3	0	50	0	33.3	100	46	100		
Imipenem	96.7	0	0	0	50	0	50	0	41.7	100		
Gentamicina	96.7	11.8	0	25	50	0	16.6	33.3	30.8	100		
amikacina	96.7	0	0	0	50	0	16.6	33.3	8.3	100		
Ciprofloxacina	96.7	17.6	0	25	50	25	33.3	0	38.5	100		
Levofloxacina	96.7	25	0	0	0	0	40	0	33.3	60		
Tri/Sul	96.7	35	50	75	50	25	40	ns	100	0		
Colistina	0	0	0	100	100	0	0	0	9.1	50		
Tigeciclina	3.3	0	0	0	0	0	0	100	90.9			