

## FULL PAPERS

## Spread of CTX-M-type ESBLs in isolates of *E. coli* from long-term care and rehabilitation facilities in Northern Italy

Elisabetta Nucleo<sup>1</sup>, Roberta Migliavacca<sup>1</sup>, Michela Balzaretto<sup>2</sup>, Fabiola Martino<sup>1</sup>, Melissa Spalla<sup>3</sup>, Cristina Terulla<sup>3</sup>, Laura Pagani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Università di Pavia,

<sup>2</sup>Laboratorio di Microbiologia ASP Piero Redaelli, Milano,

<sup>3</sup>Laboratorio di Microbiologia IRCCS S. Matteo, Pavia

**Key words:** CTX-M, *E. coli*, LTCRF, epidemic diffusion

**Diffusione di Extended-Spectrum- $\beta$ -Lattamasi di tipo CTX-M in isolati clinici di *E. coli* provenienti da strutture di lungodegenza e riabilitazione geriatriche del Nord Italia**

### SUMMARY

During the period March 2003 – May 2004 at the Laboratory of Clinical Microbiology “Redaelli” LTCRF in Milan, Italy, a total of 529 *E. coli*, obtained from inpatients of 3 different Long Term Care Rehabilitation Facilities (LTCRFs) in Northern Italy, were processed and 77 ESBLs producers (14.5%) were identified by Vitek System. The results were confirmed by double-disk synergy test with tazobactam (TZP). 61/77 isolates were characterized by higher levels of resistance to cefotaxime (CTX) than to ceftazidime (CAZ). ( $\beta$ -lactamase production was investigated by analytical isoelectric focusing (IEF) coupled with a bioassay and showed multiple ( $\beta$ -lactamase bands including one enzyme with pI 8.4 that, in a bioassay, was more active on CTX, ATM than on CAZ. The presence of ( $\beta$ -lactamase genes was investigated by colony blot hybridization and by PCR amplification of *bla*TEM, *bla*SHV and *bla*CTX-M alleles. 43/61 isolates produced both TEM-I and CTX-M-type enzymes, 14/61 expressed only CTX-M-type while in 4 cases were found *bla*CTX-M, *bla*TEM and *bla*SHV genes. The remainders (16/77), characterized by high levels of resistance to both CTX and CAZ, produced TEM-I and SHV-5 enzymes (1/16) and TEM type ESBLs (15/16). Conjugation experiments, performed in liquid medium, confirmed that the ESBLs determinants were transferable. Pulsed-field gel electrophoresis profiles of genomic DNA, digested with *NotI*, were analysed and revealed clonal heterogeneity.

Our work confirms the emergence of CTX-M-type enzymes and their spread in Northern Italy also in long-term care and rehabilitation facilities that may be an important reservoir of ESBL producing *E. coli*.

Received June 8, 2006

Accepted April 16, 2008

### INTRODUZIONE

La produzione di Extended-Spectrum  $\beta$ -lattamasi (ESBLs) negli enterobatteri, rappresenta un problema di rilevante impatto clinico ed epidemiologico che, recentemente, si è esteso anche alle strutture di lungodegenza riabilitativa (LTCRF) ed alle case di cura per anziani (9, 12, 2).

In queste strutture, che accolgono una popolazione caratterizzata da numerosi fattori di rischio predisponenti all'acquisizione di infezioni nosocomiali, è spesso necessario ricorrere a terapie antibiotiche intense e prolungate che favoriscono la selezione dei determinanti di resistenza.

La somministrazione indiscriminata di cefalospo-

rine a spettro allargato è una pratica ricorrente all'interno di queste strutture, in cui vengono isolati frequentemente microrganismi produttori di ESBL spesso caratterizzati da una diffusione di tipo epidemico. Il numero considerevole di pazienti sovente spostati tra diverse unità di cura alimenta, inoltre, la diffusione di tali resistenze e ne rende più difficile il controllo.

Nelle *Enterobacteriaceae* stanno emergendo ESBL di tipo CTX-M, enzimi la cui diffusione, sia tra batteri appartenenti a specie diverse che in differenti parti del mondo, dal 1995 ad oggi, è in drammatico aumento (4).

La prima ESBL di tipo CTX-M (FEC-1) è stata

**Corresponding author:** Laura Pagani

Via Brambilla 74, 27100 Pavia

Tel.: 0382 5484206 - Fax: 0382 5484255 - E-mail: [lpagani@unipv.it](mailto:lpagani@unipv.it)

segnalata agli inizi degli anni '80. Gli enzimi di tipo CTX-M rappresentano un gruppo di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso di classe A plasmidiche. Humeniuk, et al. hanno identificato come progenitore delle ESBL di tipo CTX-M l'enzima cromosomico AmpC di *Kluyvera ascorbata*, un batterio enterico di raro riscontro clinico (1). Gli enzimi di tipo CTX-M sono caratterizzati da una maggiore attività idrolitica verso il cefotaxime (CTX), da cui il nome CTX-M, ed il ceftriaxone, piuttosto che verso il ceftazidime (CAZ); mostrano una maggiore sensibilità al tazobactam (TZP) rispetto al clavulanato (11). Il rapido sviluppo della famiglia CTX-M ha coinvolto diverse specie di *Enterobacteriaceae* diffuse per lo più in tre aree geografiche: Sud America, Europa ed Estremo Oriente. Recentemente sono state segnalate anche in Italia (6, 7). I geni *bla*CTX-M possono essere localizzati a livello cromosomico, ma molto spesso vengono identificati a livello plasmidico (11).

Scopo del lavoro è stato studiare la diffusione di *E. coli* produttori di ESBL di tipo CTX-M in tre strutture di lungodegenza riabilitativa geriatriche (LTCRFs) del Nord Italia.

## MATERIALI E METODI

### Stipiti batterici

Nel periodo marzo 2003 - maggio 2004 sono stati raccolti, da urine di pazienti con catetere vescicale ricoverati in diverse LTCRF del Nord Italia, 77 isolati clinici di *E. coli* consecutivi e non replicati con fenotipo di resistenza suggestivo della produzione di ESBL.

### Test di sensibilità

La sensibilità agli antibiotici e la produzione di ESBL sono state valutate in un primo tempo mediante GNS CARD (Vitek System, bioMérieux). La produzione di ESBL è stata poi confermata tramite test del doppio disco.

Tale test è stato eseguito su Mueller-Hinton (MH) agar ponendo, dopo semina a confluenza di una sospensione batterica avente torbidità pari a 0.5 McFarland, dischetti di FEP, CAZ, CTX, ed ATM ad una distanza di 25 mm centro-centro da uno di TZP. La positività al test è stata attribuita sulla base della presenza di evidenti distorsioni degli aloni di inibizione verso il dischetto centrale (effetto sinergico).

### Caratterizzazione delle $\beta$ -lattamasi

Da ogni ceppo in esame sono stati ottenuti estratti enzimatici grezzi. Le colture in fase logaritmica di crescita sono state centrifugate e le cellule, lavate con tampone sodio-fosfato 10 mM (pH 7.0), sono state sottoposte a sonicazione.

L'estratto enzimatico grezzo ottenuto è stato quindi sottoposto ad isoelettrofocalizzazione (IEF) in

gel di poliacrilamide anfolinizzato. Le bande  $\beta$ -lattamasiche sono state visualizzate utilizzando una cefalosporina cromogena (nitrocefina). Il profilo di attività sui substrati delle bande  $\beta$ -lattamasiche ottenute è stato determinato tramite saggio biologico: dopo IEF il gel è stato ricoperto con un sottile strato di MH agar addizionato di 1  $\mu$ g/ml dello specifico antibiotico da valutare. Dopo due ore di incubazione a 37°C, sull'agar contenente antibiotico è stata seminata a confluenza una brodocoltura cresciuta *overnight* di *E. coli* ATCC 25922 (10<sup>8</sup> UFC/ml). La crescita di *E. coli* ATCC 25922, sensibile alla concentrazione di antibiotico presente nel terreno, può avvenire e risulta visibilmente evidente solo in corrispondenza delle bande enzimatiche al cui livello il substrato in esame viene idrolizzato. In assenza di idrolisi la crescita batterica risulta inibita.

### Esperimenti di coniugazione

Il trasferimento dei determinanti di resistenza è stato ottenuto in terreno liquido usando come recettori *E. coli* K12 J53-2 *met*<sup>-</sup>, *pro*<sup>-</sup>, *rif*<sup>r</sup> e J62 *pro*<sup>-</sup>, *his*<sup>-</sup>, *trp*<sup>-</sup>, *lac*<sup>-</sup>, *sm*<sup>r</sup>. I batteri transconiuganti sono stati selezionati in McConkey agar, addizionato di rifampicina (100 mg/l) o streptomina (1000 mg/l) e cefotaxime (2 mg/l).

### Analisi del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto e purificato mediante lisi alcalina. Gli estratti di DNA plasmidico sono stati successivamente sottoposti a digestione enzimatica con *EcoRI* e quindi valutati per il profilo di restrizione.

### Ricerca dei geni *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M

La ricerca dei determinanti di resistenza *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M, è stata eseguita mediante la tecnica dell'ibridazione su colonia e l'amplificazione genica (PCR). L'ibridazione su colonia è stata eseguita su filtri di nitrocellulosa sterili posti in piastre di MH agar. Le sonde di ibridazione sono state sintetizzate usando il kit "ECL Random-prime direct nucleic acid labelling and detection system" (Amersham Biosciences). La rivelazione del segnale di chemiluminescenza è stata ottenuta a seguito di esposizione ad una lastra autoradiografica. Le sonde utilizzate per l'esperimento di ibridazione sono state costruite sulla base dei geni *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M e con i seguenti primer: TEM/E- ATA AAA TTC TTG AAG AC e TEM/R- TTA CCA ATG CTT AAT C; SHV/E- GCC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC e SHV/R- TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA; CTX-M-3/E- AT GGT TAA AAA ATC ACT GCG CCA G e CTX-M-3/R- TTA CAA ACC GTC GGT GAC GAT TTT. Le stesse sequenze oligonucleotidiche sono state impiegate anche per l'amplificazione, tranne che nel caso dei determi-

nanti di tipo CTX-M, per i quali è stata utilizzata a tale scopo la coppia di primer: CTX-MU1 5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGT-3' e CTX-MU2 3'-AGACCASTGRATRAARTGGGT-5'.

Per entrambi gli esperimenti sono stati inclusi: come controllo negativo *E. coli* ATCC 25922, e come controlli positivi ceppi di riferimento produttori degli enzimi TEM-9, SHV-5 e di tipo CTX-M.

#### Tipizzazione molecolare tramite PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

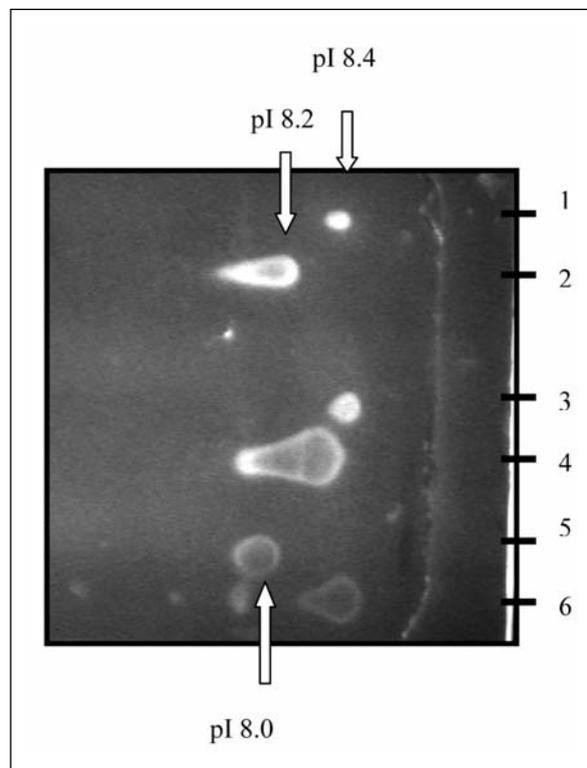
Gli isolati di *E. coli* sono stati tipizzati a livello molecolare utilizzando il kit di reagenti n°2 Gene Path (Bio-Rad). Il taglio di restrizione del DNA genomico ottenuto è stato realizzato mediante l'endonucleasi di restrizione *NotI*. I campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi in campo pulsato utilizzando l'apparato GenePath Bio-Rad. Le relazioni clonali sono state interpretate secondo i criteri proposti da Tenover, et al (10).

#### RISULTATI

Durante il periodo Marzo 2003–Maggio 2004 sono stati raccolti, presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica dell'ASP "Piero Redaelli" di Milano, un totale di 529 campioni clinici di *E. coli*. Tutti i campioni provenivano da urine di pazienti portatori di catetere vescicale. 77/529 (14.5%) isolati sono risultati ESBL produttori sia mediante metodo automatizzato (Vitek System) che con il test del doppio disco. Gli ESBL produttori risultavano sempre multiresistenti, ma sensibili all'associazione piperacilina/tazobactam. 61/77 (79.22%) isolati di *E. coli* ESBL positivi erano caratterizzati da più alti livelli di resistenza al CTX che al CAZ. L'IEF ha rivelato la presenza di bande  $\beta$ -lattamiche multiple tra cui quella corrispondente ad un enzima con pI 8.4 che, con il saggio biologico, mostrava un'attività maggiore verso il CTX e l'ATM che verso il CAZ (figura I). L'ibridazione su colonia effettuata per lo screening dei determinanti di resistenza di tipo CTX-M, ha prodotto risultati positivi per tutti i 61 isolati. Gli esperimenti di PCR, eseguiti su parte dei 61 isolati positivi all'ibridazione, hanno confermato la specificità del metodo di screening, fornendo un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese (~593 bp). L'ibridazione su colonia è stata effettuata, su tutti i ceppi CTX-M produttori, anche per la ricerca dei determinanti *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>. I risultati hanno indicato che 9/61 ceppi esprimevano una sola  $\beta$ -lattamasi di tipo CTX-M mentre 52/61 isolati presentavano bande  $\beta$ -lattamiche multiple. Più precisamente, 29/52 isolati producevano contemporaneamente enzimi di tipo CTX-M e

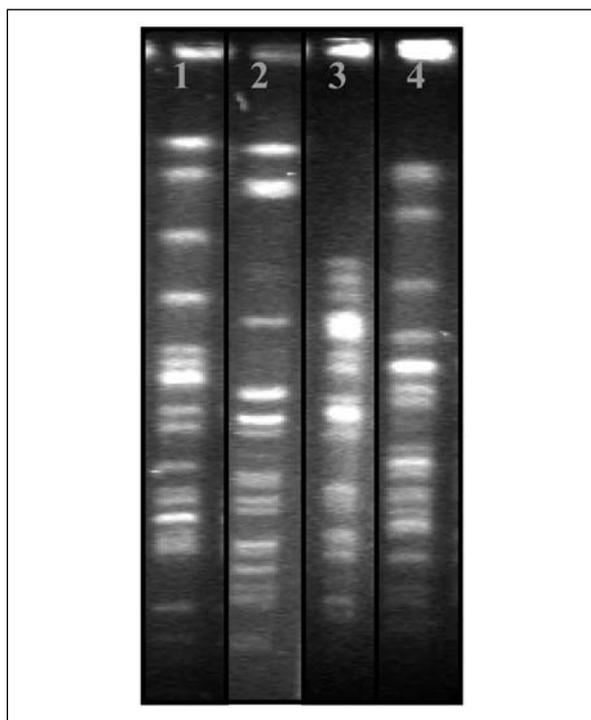
TEM-1, 7/52 esprimevano enzimi di tipo CTX-M ed SHV ed, infine, in 16/52 casi erano rilevabili geni *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>. Nei restanti 16/77 ceppi, caratterizzati fenotipicamente da alti livelli di resistenza sia al CTX che al CAZ, 15 erano produttori di una ESBL di tipo TEM, mentre un solo campione era produttore di una TEM-1 e di una SHV-5. La produzione di  $\beta$ -lattamasi di tipo CTX-M è risultata essere mediata, in 21/61 casi, da plasmidi coniugativi.

L'analisi dei pattern di restrizione ottenuti con PFGE degli isolati CTX-M produttori ha rivelato eterogeneità clonale, con quattro linee maggiori (A-D) ed un cluster epidemico specifico per ogni struttura (figura II). I cloni A e B, responsabili di due distinti eventi epidemici in due strutture differenti, sono stati ritrovati anche coesistere all'interno di una stessa LTCRF (tabella 1). Allo stesso modo il clone (D) è stato rilevato in due differenti LTCRF, in una delle quali era presente, contemporaneamente il clone C. Nei ceppi CTX-M produttori sono stati evidenziati plasmidi coniugativi di dimensioni (comprese tra le 50 e le 55Kb) e profilo di restrizione differenti, anche nell'ambito di un medesimo pulsotipo.



**Figura I.** Utilizzo della tecnica del substrato ricoprente per la rivelazione dell'attività idrolitica di estratti enzimatici grezzi di *E. coli* verso il cefotaxime.

Linee da 1 a 6: Ceppi ST225 con pI 8.4, SHV-5 con pI 8.2, DON 130 con pI 8.4, BE 117 con pI 8.3, TM215 con pI 8.0 e DVA10 con pI 8.4 e 8.0.



**Figura II.** Profili PFGE (Not I) delle quattro maggiori linee clonali, relative agli isolati clinici di *E. coli* CTX-M produttori. Linee da 1 a 4: profili A (ceppo DAG120), B (ceppo LG212), C (ceppo ST225), D (ceppo MR204), rispettivamente.

## CONCLUSIONI

Nell'ambito della vasta famiglia delle *Enterobacteriaceae*, la resistenza mediata dalle  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro di classe A rappresenta ormai un problema di crescente impatto clinico anche in Italia (5, 8). Tra le ESBL di classe A, gli enzimi di tipo CTX-M, in particolare, stanno diffondendosi rapidamente; in Italia tali enzimi erano stati fino ad ora riscontrati solo raramente in ambito nosocomiale e comunitario (3, 7). I risultati ottenuti mostrano, tuttavia, come le strutture geriatriche di riabilitazione e di lungodegenza, rappresentino un *reservoir* di *E. coli* CTX-M produttori. La diffusione dei geni *bla*<sub>CTX-M</sub> negli *E. coli* isolati è risultata essere sia plasmide - che clone- mediata. Pertanto, la diffusione di questi geni di resistenza, sembra destinata, sul territorio nazionale, ad aumentare. Sarebbe auspicabile, perciò, per arginare il problema della diffusione di enterobatteri ESBL-produttori, l'attuazione di un maggior numero di efficaci misure di controllo. Tali accorgimenti potrebbero consistere nel monitoraggio dei pazienti al ricovero nonché del controllo periodico dei portatori di cateteri vescicali potenzialmente colonizzati o infettati da microrganismi antibiotico-resistenti.

**Tabella I.** Diffusione di cloni di *E. coli* CTX-M produttori nelle tre strutture di lungodegenza riabilitativa geriatriche

	Istituto Golgi (Abbiategrosso)	Ospedale geriatrico Redaelli (Vimodrone)	Ospedale geriatrico Redaelli (Milano)
<b>Pulsotipi</b>	D, B, *C	*A, B, *D	*B
	ed altri sporadici	ed altri sporadici	ed altri sporadici

\*clone responsabile di un evento epidemico all'interno della struttura ospedaliera.

## BIBLIOGRAFIA

- Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
- Bradford PA, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago Hospitals: identification of the extended-spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in a single isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 761-6.
- Brigante G, Luzzaro F, Perilli M, et al. Evolution of CTX-M-type beta-lactamases in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 157-62.
- Carattoli A, Lovari S, Franco A, Cordaro G, Di Matteo P, Battisti A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother* 2005; 49: 833-5.
- Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, et al. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: Report of the second Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 1659-64.
- Pagani L, Dell'Amico E, Migliavacca R, et al. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4264-9.
- Perilli M, Dell'Amico E, Segatore B, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 611-4.
- Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, et al. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2193-9.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
- Tzouveleki LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 137-42.
- Wiener J, Quinn JP, Bradford PA. Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA* 1999; 281: 517-23.