

Klebsiella pneumoniae: resistance to carbapenems carbapenemase-mediated in the area of Piacenza

Massimo Confalonieri¹, Enrica Cavatorta¹, Camilla Reboli¹, Maria Milanda Bertelli¹, Rossana Chiarabini¹, Daniela Padrini¹, Francesca Riggio¹, Corrado Confalonieri², Enrica Poggi¹

¹ Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Presidio Ospedaliero di Piacenza

² Università degli Studi di Parma, Facoltà di Farmacia

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenemase, Phenotypic test.

***Klebsiella pneumoniae*: sorveglianza della resistenza ai carbapenemi mediata dalla produzione di carbapenemasi nella provincia di Piacenza**

SUMMARY

The detection of *Klebsiella pneumoniae* isolates showing a reduced susceptibility or resistance to carbapenems represents an increasing problem.

The aim of this study is to survey the presence of carbapenemases producing strains in our country.

22 isolates of *K. pneumoniae* isolates showing carbapenems MIC \Rightarrow 2 by Vitek 2 System, were collected in the period May-August 2010 and studied for carbapenemases production using phenotypic confirmatory tests.

The modified Hodge test and the DD-sinergy test with boronic acid yielded positive results for 17/22 strains; all the isolates resulted negative to the E-test MBL (imipenem and imipenem/EDTA).

The results of this study confirm the recent emergence of KPC-producing *K. pneumoniae* strains in the area of Piacenza. The phenotypic tests employed appear reliable and simple for the confirmation of carbapenemases-production in *K. pneumoniae*.

INTRODUZIONE

La resistenza degli enterobatteri agli antibiotici beta-lattamici è in costante aumento; ceppi produttori di beta-lattamasi a spettro esteso risultano ampiamente diffusi e le segnalazioni di enterobatteri resistenti ai carbapenemi, in particolare in *Klebsiella pneumoniae* sono in crescita.

La resistenza a questa classe di antibiotici può essere determinata dalla produzione di carbapenemasi di classe A (KPC) o di classe B (MBL). Una ridotta sensibilità ai carbapenemi può anche essere determinata dalla produzione di ESBL in associazione con meccanismi di impermeabilità della membrana batterica (deficit di porine).

Lo studio si prefigge, a seguito della segnalazione della presenza di ceppi produttori di carbapenemasi anche in Italia, di valutare la diffusione di isolati di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi nel nostro territorio. Tale resistenza potrebbe essere messa in relazione al crescente impiego di carbapenemi per la terapia delle infezioni da Gram negativi multiresistenti.

MATERIALI E METODI

Nel periodo Maggio-Agosto 2010 sono stati raccolti 22 ceppi di *K. pneumoniae* che all'analisi della sensibilità agli antibiotici effettuata mediante il sistema automatizzato in uso, mostravano resistenza o ridotta sensibilità ai carbapenemi (MIC \Rightarrow 2 μ g/ml). Identificazioni ed antibiogrammi sono stati eseguiti utilizzando il sistema Vitek 2 (software AES 4.01), Card GN, AST-N089. Tutti gli isolati sono stati successivamente sottoposti al test di Hodge modificato per la valutazione presuntiva della produzione di carbapenemasi (2).

I ceppi risultati positivi al precedente test sono stati caratterizzati ulteriormente a livello fenotipico mediante i test di sinergia con acido boronico e con EDTA al fine di valutare, rispettivamente, se vi fosse produzione di enzimi di tipo KPC o di tipo MBL (1).

Il test di Hodge modificato (MHT) è stato eseguito sempre inoculando in MH agar una sospensione di *E. coli* ATCC25922 pari a 0.5 McF diluita 1:10 con fisiologica 0.85% e ponendo al centro della piastra un dischetto di meropenem (10 μ g). L'isolato da caratterizzare è stato quindi inoculato in linea retta utilizzando un'ansa da 10 μ l a partire dal dischetto di meropenem e fino al margine della piastra. Dopo 18-24 ore di incubazione a 35°C la presenza di una modifica-

zione dell'alone di inibizione (smussatura di crescita) nel punto di intersezione fra alone di inibizione ed isolato saggionato è stato ritenuto indicativo di positività al test (Figura I).

Il test per valutare la produzione di MBL è stato eseguito inoculando in MH agar una sospensione pari a 0.5 McF del ceppo in esame ed applicando una striscia di E-test MBL (bioMérieux). Dopo 18-24 ore di incubazione a 35°C, un rapporto \Rightarrow 8 delle MIC dei due reagenti presenti nella striscia, la formazione di una zona "fantasma" o la deformazione di una delle due ellissi di inibizione sono stati considerati indicativi della presenza di un ceppo produttore di metallo beta-lattamasi (Figura II).

Per valutare la produzione di carbapenemasi di tipo KPC è stato adottato il test di sinergia con acido boronico (PBA 250 μ g - Rosco Diagnostica). Dopo l'inoculo in MH agar di un sospensione di 0.5 McF del ceppo in esame, un dischetto di imipenem (10 μ g-Oxoid) ed uno di meropenem (10 μ g-Oxoid) sono stati collocati ai due lati (6 mm da margine a margine) di un dischetto di PBA posizionato al centro della piastra. La presenza, dopo 18-24 ore di incubazione a 35°C, di un effetto sinergico a livello di uno o entrambi i dischetti dei carbapenemi è stato considerato indicativo della presenza di KPC (Figura III). Un ceppo di *K. pneumoniae* KPC produttore caratterizzato a livello molecolare presso l'Istituto di Microbiologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università di Pavia è stato utilizzato come controllo positivo.

RISULTATI

Nel periodo considerato sono stati isolati, da pazienti diversi, 22 ceppi di *K. pneumoniae* che mostravano resistenza o con ridotta sensibilità ai carbapenemi; di questi 7 provenivano da urine, 5 da sangue, 4 da materiali respiratori, 3 da tamponi cutanei, 2 da drenaggi, 1 da coltura di CVC.

Il test di Hodge modificato (MHT) è risultato positivo per 17/22 ceppi saggianti. Tutti i 17 ceppi sono risultati positivi al DDST per la rivelazione della produzione di KPC, mentre nessuno degli stessi isolati è risultato positivo al test per la rilevazione delle MBL (MBLT).

I valori di MIC per l'imipenem sembrano correlare bene con la positività al test MHT: nessuno dei tre isolati con MIC = 2 è risultato positivo a tale test, mentre 17/18 isolati con MIC \Rightarrow 8 si sono confermati positivi al test MHT (Tabella 1).

Corresponding author: Confalonieri Massimo

Indirizzo: Laboratorio Analisi Chimico-Cliniche e Microbiologia, Presidio Ospedaliero,

Via Taverna, 49 - 29121 Piacenza - Tel.: 0523 302415 - Fax 0523 302439

E-mail: m.confalonieri@ausl.pc.it

CONCLUSIONI

Questo studio mette in evidenza la comparsa di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi di tipo KPC anche nella nostra area geografica. Dall'analisi dei fenotipi di resistenza degli isolati si può ipotizzare la circolazione intraspedaliera di un ceppo clonale di *K. pneumoniae*.

Tale ipotesi potrà essere confermata da caratterizzazioni

genotipiche tuttora in corso.

Le modalità suggerite per la rilevazione presuntiva di ceppi produttori di carbapenemasi risultano di facile impiego e in grado di fornire preziose informazioni utili sia al fine di indirizzare correttamente il clinico nella scelta terapeutica, sia nell'ottica del contenimento della diffusione ospedaliera di batteri in grado di trasferire questo meccanismo di resistenza.

Tabella I.

N°	Materiale	Reparto	MIC Imipenem	MIC Ertapenem	MIC Meropenem	AES Vitek2	MHT	MBLT	DDST
1	Broncoasp	Rianimazione	8 (I-R)	>=8R	2 (S-R)	imp/esbl+c	+	-	+
2	Urine	Chirurgia	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
3	Urine	Rianimazione	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
4	Escreato	Rianimazione	8 (I-R)	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	+	-	+
5	Drenaggio	Chirurgia	>=16R	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	+	-	+
6	Sangue	Rianimazione	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
7	Urine	Medicina CSG	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
8	Sangue	Rianimazione	8 (I-R)	>=8R	2 (S-R)	imp/esbl+c	+	-	+
9	Sangue	Chirurgia	>=16R	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	+	-	+
10	CVC	Rianimazione	>=16R	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	+	-	+
11	Urine	Ginecologia	2 (S-R)	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	-	-	-
12	Urine	Rianimazione	2 (S-R)	>=8R	4 (S-R)	imp/esbl+c	-	-	-
13	Urine	Esterno CSG	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
14	Urine	Gastroenterol	>=16R	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	-	-	-
15	Sangue	Geriatrics	>=16R	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	+	-	+
16	Drenaggio	Chirurgia	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
17	Sangue	Rianimazione	>=16R	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	-	-	-
18	Escreato	Rianimazione	2S (>16R)	>=8R	>=16R	Carbapenem	-	-	-
19	Tamp cute	Rianimazione	>=16R	>=8R	>=16R	imp/esbl+c	+	-	+
20	Escreato	Rianimazione	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
21	Ferita chir	Chirurgia	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+
22	Tamp cute	Chirurgia	>=16R	>=8R	8 (I-R)	imp/esbl+c	+	-	+

MHT: Test di Hodge modificato; MBLT: test per la determinazione di metallo-beta-lattamasi; DDST: double-DD synergy test per il rilievo di KPC; Imp:

Resistente ai carbapenemi (Impermeabilità); esbl+c: ESBL+Carbapenemasi;

Tra parentesi sono riportate le modifiche suggerite dal sistema esperto (AES-Vitek2)

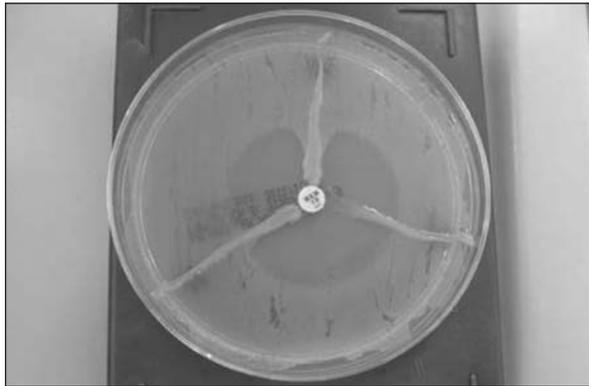


Figura I. Test di Hodge modificato.

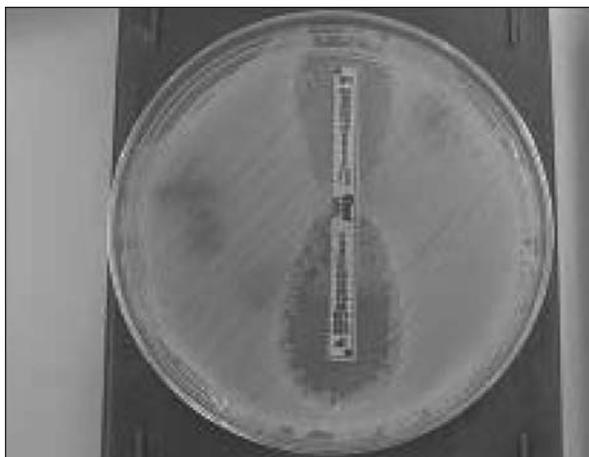


Figura II. Test fenotipico per la valutazione della produzione di MBL.

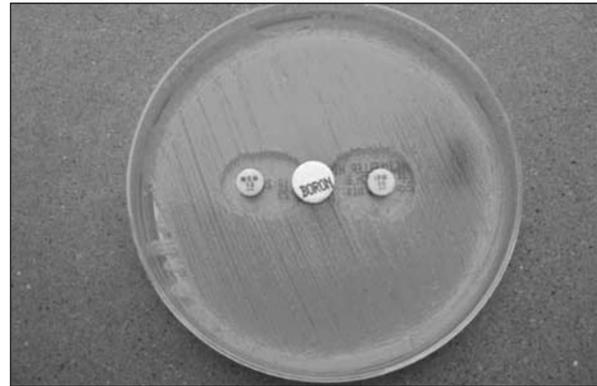


Figura III. Test fenotipico adatto allo screening della produzione di carbapenemasi di tipo KPC in *K. pneumoniae*.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Direttore della sezione di Microbiologia della Facoltà di Medicina e Chirurgia dell'Università degli Studi di Pavia Prof.ssa L. Pagani e la Dott.ssa R. Migliavacca per la collaborazione prestata alla realizzazione di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson K, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2723.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI documents M100-S19. *Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa.* 2009 CLSI 2009 Document M100-S19.
- Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected Class A Carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 1631-9.