

Typization of *Klebsiella pneumoniae* strains collected from a immature pediatric ward by Mass Spectrometry using MALDI-TOF

Roberto Degl'Innocenti, Brunelli Tamara, Ferri Daniele, Pellegrini Lorenzo, Sosa Mayra, Chiaramonti Cristiano, Conti Antonella

A.U.O. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, Usl4, Piazza dell'Ospedale 5, 59100 Prato

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, Mass Spectrometry, pediatric ward

Tipizzazione di stipti di *Klebsiella pneumoniae* isolati in un reparto di pediatria immaturi mediante Spettrometria di mazza MALDI-TOF

SUMMARY

Introduction. *Klebsiella pneumoniae* is often associated with nosocomial infections, especially in immature pediatric wards and intensive care, where the prolonged hospitalization and invasive procedures increase the risk. In this study we investigated the possibility of using MALDI-TOF mass spectrometry for the rapid identification of bacteria and to be able to be used for epidemiological circulation of a particular strain of *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric ward immature at Mercy hospital of Prato and Dolce.

Materials and Methods. Twenty *Klebsiella pneumoniae* strains were isolated and analyzed. The isolates were collected from clinical specimens (7 urine, 12 stool samples, 1 skin swab) from 15 patients (9 females and 6 males) of the Department of Pediatrics, Hospital Misericordia and Dolce during the period from May to November 2010. Samples were collected using eSwab containers for urine and swab the skin FecalSwab, for fecal samples, and processed on suitable culture media with the Wasp system (Copan Italy Spa distributed by ada Ltd.). Of all isolates were performed identification and susceptibility testing with the automatic Vitek2 (bioMérieux) at the time of isolation, then frozen at -20 °C in Trypticase Soy Broth with 20% Glycerol (Becton Dickinson). Subsequently, the bacterial strains were thawed, subcultured on Columbia Blood Agar with 5% sheep (BioMérieux), typed by means of MALDI-TOF (Shimadzu Axima - Biomerieux) and performed an antibiogram by Kirby-Bauer method (Table 3) on Agar Mueller-Hinton (Liofilchem S.r.l.) and diskettes Bio-Rad. The spectra obtained by MALDI-TOF were analyzed and compared with software-AgnosTec SARAMIS, used in our laboratory, both for the identification of the strains for the construction of a dendrogram.

Results. Twenty strains of *Klebsiella pneumoniae* were studied. They were isolated from clinical specimens (7 urine, 12 stool samples, 1 skin swab) from 15 patients (9 females and 6 males) of the Department of Pediatrics. Of all isolates was performed to identify and sensitivity with automatic Vitek2 (bioMérieux) samples from Italian patients and divided stranieri così: 570 endocervical swabs (71.2%), 98 urethral swabs (12.2%), 78 seminal fluids (9.8%), and 54 urine (6.8%). The number of female subjects was higher than those of males [629 (78.5%) vs 172 (21.5%)], the average age of females was 38.4 ± 12.2 years while that of males was 47.7 ± 13.3 years. The prevalence of urogenital pathogens was: 13 *T.vaginalis* positive (1.6%), 52 for *M.hominis* (6.5%), 64 for *M.genitalium* (8.8%), 18 for *C.trachomatis* (2.2%), 2 for *N.gonorrhoeae* (0.2%) and 79 for *U.urealyticum* (9.9%); of all the 18 positive subjects were positive for more than one pathogen, namely: 1 totaled 4 pathogens, pathogens 5 for 3 and 9 for 2 pathogens.

Conclusions. This study provides data on the prevalence of sexually transmitted diseases in the hospital in Prato.

INTRODUZIONE

Klebsiella pneumoniae è spesso associata ad infezioni nosocomiali specialmente in reparti pediatrici immaturi e di terapia intensiva dove la prolungata ospedalizzazione e le procedure invasive ne aumentano il rischio [1].

In questo studio abbiamo valutato la possibilità di usare la spettrometria di massa MALDI-TOF per l'identificazione rapida dei batteri [2] [3] e poter seguire ai fini epidemiologici la circolazione di un

particolare ceppo di *Klebsiella pneumoniae* in un reparto di pediatria immaturi presso l'ospedale Misericordia e Dolce di Prato.

MATERIALI E METODI

Sono stati isolati ed analizzati 20 ceppi di *Klebsiella pneumoniae*.

Gli isolati (Tabella 1) sono stati ottenuti da campioni clinici (7 urine, 12 campioni fecali, 1 tampone cutaneo) provenienti da 15 pazienti (9 femmi-

Corresponding author: Roberto Dell'Innocenti

Laboratorio Analisi USL 4 Prato

Pizza dell'Ospedale, 5 - 59100 Prato - Tel.: 0579 434719

E-mail: microbiologia@usl4.toscana.it

ne e 6 maschi) del reparto di Pediatria Immaturi dell'Ospedale Misericordia e Dolce di Prato durante il periodo maggio – novembre 2010.

I campioni sono stati raccolti mediante contenitori eSwab, per urine e tampone cutaneo, FecalSwab, per i campioni fecali, e processati su idonei terreni di coltura con il sistema Wasp (Copan Italia S.p.a. distribuito da a.d.a. S.r.l). Su tutti gli isolati sono stati eseguiti identificazione ed antibiogramma (Tabella 2) con il sistema automatico Vitek2 (BioMerièux) al momento dell'isolamento, quindi congelati a -20°C in Trypticase Soy Broth con 20% Glycerol (Becton Dickinson).

Successivamente gli stipiti batterici sono stati scongelati, subcolturati su Agar Columbia Sangue di montone al 5% (BioMerièux), tipizzati per mezzo del MALDI-TOF (Axima Shimadzu – Biomerièux) ed eseguito un antibiogramma con metodica Kirby-Bauer (Tabella 3) su Agar Mueller-Hinton (Liofilchem) e dischetti Bio-Rad.

Gli spettri ottenuti dal MALDI-TOF sono stati analizzati e confrontati con il software AgnosTec-SARAMIS [4], in uso presso il nostro laboratorio, sia per l'identificazione dei ceppi sia per la costruzione di un dendrogramma (Figura 1).

RISULTATI

I 20 ceppi di *Klebsiella pneumoniae* presentavano un particolare profilo di antibiotico sensibilità sia col sistema automatico Vitek2 sia con la metodica manuale Kirby-Bauer (Tabelle 2, 3, 4a e 4b):

- tutti resistenti ad Ampicillina, Amoxacilavulanic, Ciprofloxacina, Levofloxacina, Gentamicina, Piperacillina/Tazobactam, Cotrimossazolo e Piperacillina (ad eccezione del N. 1138 risultato Intermedio al Vitek2);
- tutti sensibili ad Amikacina, Imipenem, Meropenem e Cefepime;
- risposta variabile a Ceftazidime e Cefotaxime.

Tutti gli isolati sono stati identificati sia dal sistema Vitek2 sia con spettrometria di massa. In quest'ultimo caso la percentuale di confidenza è risultata superiore o uguale al 90% (Tabella 5).

L'analisi degli spettri dimostra una similarità superiore o uguale all'80% ad eccezione di un caso (N.1087) (Figura 1).

DISCUSSIONE

Un aumento di isolamenti di *Klebsiella pneumoniae* è stato osservato nel periodo maggio-novembre 2010 nel reparto Pediatria Immaturi del nostro nosocomio. Tutti i ceppi isolati presentavano un profilo di antibiotico sensibilità simile.

Nel sospetto che fosse un unico ceppo circolante gli stipiti batterici isolati sono stati conservati e quindi analizzati in spettrometria di massa

Tabella 1. Valori di MIC risultanti da antibiogramma Vitek2

Camp.N°	AM	AMC	CIP	LEV	AN	GM	SXT	IMP	MEM	FEP	PIP	CAZ	CTX
1012	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
1057	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	8
1069	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
1071	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
1074	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	4
1075	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	8
1080	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	<=1	<=1
1084	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	2
1087	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	<=1	<=1
1088	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	>=64
1090	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	8
1091	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
1100	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	8
1138	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	32	32	8
1157	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	8
1238	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
1243	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	4
1257	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	4
1319	>=32	>=32	>=4	>=8	4	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	16
1321	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	8
Resistente	Intermedio	Sensibile											

AM, ampicillina; AMC, ecc.....

Tabella 2. Antibiogramma Kirby-Bauer: diametro degli aloni (mm)

Camp.N°	AM	AMC	CIP	LEV	AN	GM	SXT	IMP	MEM	FEP	PIP	CAZ	CTX
1012	6	9	6	8	20	6	6	24	26	26	6	22	27
1057	6	6	6	6	17	6	6	22	21	22	6	15	20
1069	6	6	6	6	18	6	6	23	21	24	6	20	26
1071	6	6	6	6	19	6	6	23	22	23	6	15	23
1074	6	6	6	6	17	6	6	25	25	25	6	14	20
1075	6	6	6	6	16	6	6	21	26	22	6	13	17
1080	6	9	6	8	17	6	6	22	24	25	6	29	25
1084	6	6	6	6	17	6	6	21	23	22	6	12	25
1087	6	9	6	9	19	6	6	27	28	25	6	26	29
1088	8	8	6	8	17	6	6	23	23	23	6	6	6
1090	6	6	6	6	19	6	6	22	23	25	6	13	19
1091	6	6	6	6	18	6	6	24	23	24	6	17	24
1100	7	6	6	6	19	6	6	24	22	23	6	13	18
1138	6	6	6	6	18	6	6	23	22	25	6	13	18
1157	6	6	6	6	18	6	6	23	22	26	6	11	17
1238	6	6	6	6	17	6	6	24	24	25	6	15	19
1243	6	6	6	6	17	6	6	23	22	23	6	14	17
1257	6	6	6	6	15	6	6	21	20	24	6	14	19
1319	6	6	6	6	16	6	6	21	21	23	6	13	19
1321	6	6	6	6	16	6	6	24	23	23	6	12	17

Vedi anche **Tabella 1**

Tabella 3. Confronto fra Antibiogramma Vitek2 e Kirby Bauer

Camp.N°	ATB	AM	AMC	CIP	LEV	AN	GM	SXT	IMP	MEM	FEP	PIP	CAZ	CTX
1012	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
	KB	6	9	6	8	20	6	6	24	26	26	6	22	27
1057	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	8
	KB	6	6	6	6	17	6	6	22	21	22	6	15	20
1069	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
	KB	6	6	6	6	18	6	6	23	21	24	6	20	26
1071	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
	KB	6	6	6	6	19	6	6	23	22	23	6	15	23
1074	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	4
	KB	6	6	6	6	17	6	6	25	25	25	6	14	20
1075	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	8
	KB	6	6	6	6	16	6	6	21	26	22	6	13	17
1080	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	<=1	<=1
	KB	6	9	6	8	17	6	6	22	24	25	6	29	25
1084	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	2
	KB	6	6	6	6	17	6	6	21	23	22	6	12	25
1087	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	<=1	<=1
	KB	6	9	6	9	19	6	6	27	28	25	6	26	29
1088	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	>=64
	KB	8	8	6	8	17	6	6	23	23	23	6	6	6

Camp.N°	ATB	AM	AMC	CIP	LEV	AN	GM	SXT	IMP	MEM	FEP	PIP	CAZ	CTX
1090	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	8
	KB	6	6	6	6	19	6	6	22	23	25	6	13	19
1091	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
	KB	6	6	6	6	18	6	6	24	23	24	6	17	24
1100	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	8
	KB	7	6	6	6	19	6	6	24	22	23	6	13	18
1138	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	32	32	8
	KB	6	6	6	6	18	6	6	23	22	25	6	13	18
1157	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	8
	KB	6	6	6	6	18	6	6	23	22	26	6	11	17
1238	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	16	2
	KB	6	6	6	6	17	6	6	24	24	25	6	15	19
1243	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	4
	KB	6	6	6	6	17	6	6	23	22	23	6	14	17
1257	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	32	4
	KB	6	6	6	6	15	6	6	21	20	24	6	14	19
1319	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	4	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	16
	KB	6	6	6	6	16	6	6	21	21	23	6	13	19
1321	VTK	>=32	>=32	>=4	>=8	<=2	>=16	>=320	<=1	<=0,25	<=1	>=128	>=64	8
	KB	6	6	6	6	16	6	6	24	23	23	6	12	17

Vedi anche Tabella I

Tabella 4. % confidenza MALDI-TOF

Campione N°	% di confidenza
1012	94,7
1057	99,6
1069	93,7
1071	99,9
1074	91
1075	93
1080	96,6
1084	93,8
1087	99,9
1088	98,1
1090	99,9
1091	99,9
1100	97
1138	99,9
1157	94,6
1238	94,7
1243	96,8
1257	90,8
1319	93,8
1321	90

MALDI-TOF per valutare sia l'impiego di questa tecnica nella pratica di un laboratorio di microbiologia per l'identificazione batterica che il suo utilizzo in ambito epidemiologico.

Ad eccezione del campione N 1087, tutti i ceppi analizzati presentavano una alta similarità tale da far sospettare la presenza di un unico stipite circolante all'interno del reparto. È stato quindi attivato il Comitato per le Infezioni Ospedaliere (CIO). Nonostante i controlli effettuati successivamente al periodo di isolamento sia sul personale che sull'ambiente non abbiano avuto successo, l'ipotesi più plausibile sembra comunque essere quella di una trasmissione dovuta ad opera di manovre assistenziali. La circolazione del microrganismo oggetto della ricerca sembra terminata con la fine del 2010, dopo che il personale sanitario del reparto è stato allertato dalle infermiere epidemiologiche del CIO ed attivata l'applicazione di protocolli per la prevenzione delle infezioni dovute a pratiche assistenziali.

CONCLUSIONI

Sebbene la durata sia stata breve ed il numero dei campioni analizzati non elevato, possiamo certamente affermare che l'introduzione nella dia-

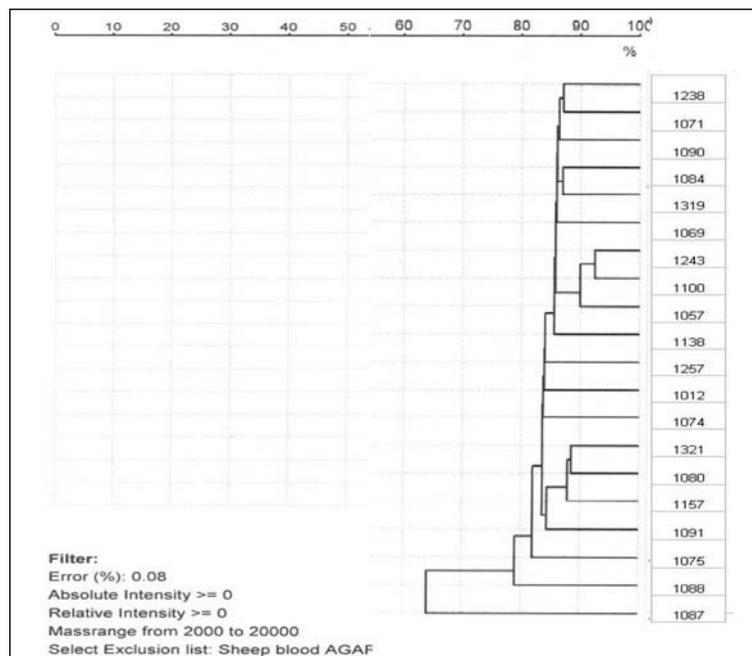


Figura I. Dendrogramma risultante dall'analisi MALDI-TOF.

agnostica microbiologica di un sistema di analisi in spettrometria di massa MALDI-TOF come quello da noi utilizzato, permette di identificare in modo rapido, preciso e sicuro stipiti batterici isolati da materiali clinici. La presente esperienza ci porta anche a concludere che questa tecnologia possa essere facilmente impiegata in ambito epidemiologico con risultati soddisfacenti, soprattutto per la sua rapidità ed economicità.

BIBLIOGRAFIA

1. G. Martinez-Aguilar e altri: "Outbreak of nosocomial sepsis and pneumonia in a Newborn Intensive Care Unit by multiresistant Extended-Spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: high impact on mortality" *Infection Control and Hospital Epidemiology* 2001; 22: 725-728
2. T.Brunelli, R.Degli Innocenti, A.Conti, P.Casprini, "Use of Maldi-Tof Mass spectrometry in direct microorganism identification in clinical laboratories", *Microbiologia Medica* 2010; 1-5; 9-10
3. A.Bizzini, G.Greub, "Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification", *Clinical Microbiology and Infection* 2010; 16: 1616-1617
4. *AnagnosTec*, "AXIMA SARAMIS". "MALDI-TOF MS based analysis of microbiological samples for identification with AnagnosTec SARAMIS".