

Usefulness of Microscan System panels with EUCAST clinical breakpoints to evaluate the antimicrobial susceptibility of β -lactamase producing- Gram negative isolates

Elisabetta Nucleo¹, Melissa Spalla¹, Aurora Piazza¹, Roberta Migliavacca¹, Piero Micheletti², Laura Pagani¹

¹ Sezione di Microbiologia, Dip. S.M.E.C., Università degli Studi di Pavia

² Sezione di Anatomia Umana, Dip. Medicina Sperimentale, Università degli Studi di Pavia

Key words: Microscan System panels; Gram negative EUCAST clinical breakpoints; β -Lactamases

Utilizzo dei pannelli Microscan secondo i breakpoint EUCAST per la valutazione della sensibilità antimicrobica di isolati Gram-negativi beta-lattamasi-produttori

SUMMARY

The study aimed to evaluate the ability of NBC45, NBC46 and NB40 Microscan (MS) panels, updated to 2010 EUCAST breakpoints, to identify at species level and to correctly define the susceptibility to β -lactams of 61 β -lactamases (BLs) producing Gram-negative isolates.

A collection of 73 fully identified strains was analyzed: 21 *Klebsiella spp.*, 17 *E. coli*, 15 *P. mirabilis*, 9 *A. baumannii* (Ab), 7 *P. aeruginosa* and 4 *Enterobacter spp.*

61/73 were BLs and/or carbapenemases producers: 15 were CTX-M-1/-2/-14/-15 positive, and among them two were also VIM-1 positive. Four were TEM-52/-92, 3 PER-1, 2 SHV-12/-18 and 6 CMY-16 producers, while 11 were KPC-2/-3, 9 OXA-51/-58/-23, 8 VIM-1 and 2 IMP-13 positive. One *K. oxytoca* K-1 hyper-producer, 11 non-BL producers/ATCC control strains and a OprD2 porin lacking *P. aeruginosa* were also included. All isolates were identified by Api-20E and VITEK-2 System and antibiotic susceptibilities were obtained by broth microdilution method. Resistance genes were identified by PCR and sequencing. All 73 isolates were correctly identified and a complete agreement for susceptibility patterns was observed for both ATCC control strains and non-BL clinical isolates. MS failed to detect a BL/Extended-Spectrum- β -Lactamase (ES β L) production in 5/61 cases: any ESBL alert was detected using NBC46 panel for 3/15 CTX-M positive strains and 2 VIM-1/CTX-M-15 producing *K. pneumoniae* isolates. Intermediate resistance to cefoxitin (MIC 16 mg/L), susceptibility to cefepime (MIC \leq 1 mg/L) and to piperacillin/tazobactam (MIC \leq 8 mg/L) were correctly observed for CMY-16 producers.

The KPC producers were always correctly detected, with MIC values of 1- \geq 8 mg/L for ertapenem (ETP), according to previously results. All VIM-1 producers resulted intermediate/resistant to imipenem (IP) and meropenem (MP); decreased MIC values were observed in 2/8 cases. Carbapenem MICs $>$ 8 mg/L were detected for IP-13 *P. aeruginosa* producers; 6/9 OXA carbapenemases- producing Ab showed IP MIC \geq 8 mg/L and 3/6 MP MIC \geq 8 mg/L.

3/9 Ab OXA-58/-51 producers, tested using NB40 panel, were intermediate or resistant to doripenem and meropenem. Regarding the detection of BLs overall agreement between MS and reference methods was 91.9%. Carbapenems MIC values resulted a fold lower than previously determined.

Nevertheless using 2010 EUCAST breakpoints for ETP, MP and IP was possible to detect all carbapenemases- producers. MS System represents a useful tool to perform identification of BL- producing Gram negative bacteria.

INTRODUZIONE

La produzione di β -lattamasi a spettro esteso (ES β L) da parte dei batteri Gram-negativi rappresenta attualmente un problema di rilevante impatto clinico-terapeutico ed epidemiologico sia per le strutture ospedaliere per acuti, che per lungodegenze riabilitative e residenze sanitarie assistenziali (RSA).

La produzione di ES β L determina resistenza verso cefalosporine a spettro allargato ed aztreonam, ma i microorganismi ES β L- produttori mostrano frequentemente una resistenza estesa ad altre classi di antibiotici, quali gli aminoglicosidi ed i chinoloni.

Per la corretta refertazione della sensibilità agli antibiotici, il primo elemento critico consiste nel-

Corresponding author: Elisabetta Nucleo

Sez. Microbiologia, Dip. Scienze Morfologiche, Eidologiche e Cliniche - Università di Pavia

Viale Brambilla, 74 - 27100 Pavia - Tel.: 0382 984145 - Fax: 0382 5484255

E-mail: elisabetta.nucleo@unipv.it

l'esatta identificazione dei batteri a livello di specie. I Laboratori di Microbiologia Clinica avvertono la necessità di utilizzare metodi di rilevamento che riflettano con accuratezza sempre maggiore i livelli di antibiotico-resistenza, permettendo di individuare quei meccanismi che possono influenzare l'*outcome* clinico.

Soprattutto nel caso del trattamento di infezioni gravi, qualsiasi ritardo nel riconoscere isolati multi-resistenti (MDR) può portare ad una scelta terapeutica non idonea sia in termini qualitativi che di dosaggio antibiotico.

Il rilevamento dei batteri ES β L e carbapenemasi-produttori risulta inoltre di fondamentale importanza ai fini di controllo delle infezioni e sorveglianza epidemiologica locale.

Lo scopo dello studio è stato valutare le *performance* dei pannelli NBC45, NBC46 ed NB40 Microscan (Siemens). E' stata determinata la capacità di identificare e segnalare correttamente isolati clinici Gram-negativi caratterizzati da meccanismi di resistenza noti e già investigati con tecniche fenotipiche e molecolari.

MATERIALI E METODI

Nel periodo Agosto 2010 - Novembre 2010 sono stati selezionati e processati presso il Laboratorio di Microbiologia del Dipartimento S. M. E. C. dell'Università di Pavia un totale di 73 isolati clinici. Tali isolati comprendevano: 21 ceppi di *Klebsiella* spp., 17 di *Escherichia coli*, 15 di *Proteus mirabilis*, 9 di *Acinetobacter baumannii*, 7 di *Pseudomonas aeruginosa* e 4 di *Enterobacter* spp.. 61/73 (83,5 %) stipiti erano β L-, ES β L- e/o carbapenemasi-produttori: 15/61 isolati erano CTX-M-1/-2/-14/-15 produttori (2/15 di questi erano anche VIM-1 positivi), 4/61 producevano gli enzimi TEM-52/-92, 3/61 l'enzima PER-1, 2/61 gli enzimi SHV-12/-18, 6/61 la cefalosporinasi acquisita CMY-16, 11/61 le carbapenemasi KPC-2/-3, 9/61 gli enzimi OXA-51/-58/-23, 8/61 la Metallo- β -Lattamasi (MBL) VIM-1 e 2/61 la IMP-13 (Tabella 1).

Sono stati inclusi nello studio anche uno stipite di *K. oxytoca* K-1 iper-produttore, 11 stipiti non- β L produttori ed uno stipite di *P. aeruginosa* mancante della porina OprD2.

Gli isolati clinici, raccolti presso Strutture Ospedaliere Italiane per acuti e lungodegenti site sull'intero territorio Nazionale, provenivano principalmente da materiali quali urine e sangue, ma anche da campioni respiratori, tamponi vari e feci. Tutti gli isolati sono stati identificati mediante il sistema Api-20E e VITEK-2, mentre il profilo di sensibilità è stato ottenuto mediante micro-diluzione in brodo (E-test limitatamente ad alcuni antibiotici).

L'identificazione delle β L è stata ottenuta median-

te amplificazione utilizzando *primer* adatti al rilevamento dei geni *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M, *bla*PER, *bla*CMY, *bla*KPC, *bla*VIM, *bla*IMP e *bla*OXA e successivo sequenziamento.

Identificazione batterica, valutazione delle MIC e segnalazione del meccanismo di resistenza sono stati ottenuti mediante i pannelli Microscan NBC45, NBC46 e NB40; i risultati sono stati interpretati secondo le linee guida EUCAST 2010.

RISULTATI

Tutti i 73 isolati sono stati correttamente identificati con pannelli NBC 45/46 dal sistema Microscan (MS).

E' stato inoltre osservato un completo accordo, sia nel caso dei ceppi ATCC che per gli isolati clinici non BL- produttori, fra i valori di MIC ottenuti con MS e quelli determinati mediante micro-diluzione in brodo.

Per uno stipite di *K. oxytoca* K1- iper-produttore MS non ha segnalato la produzione di ES β L ed ha correttamente evidenziato sensibilità nei confronti di amikacina, cefoxitina, ceftazidime, ETP, fosfomicina, gentamicina, IP, MP, tetraciclina, tigeiclina e tobramicina.

Resistenza verso i carbapenemi e sensibilità solo nei confronti di fosfomicina e colistina sono state correttamente evidenziate per uno stipite di *P. aeruginosa* carbapenemico-resistente a causa di un difetto di permeabilità.

MS ha fallito nel rilevare la produzione di ES β L in 5/61 casi: nessun Alert ES β L è stato segnalato utilizzando il pannello NBC46 per 3/15 ceppi CTX-M positivi e nel caso di due isolati di *K. pneumoniae* VIM-1/CTX-M-15 co-produttori.

Risulta comunque fondamentale sottolineare che i pannelli MS hanno in tutti e cinque i casi definito elevati valori di MIC (8 mg/L - >32 mg/L) per le cefalosporine di terza e quarta generazione (Tabella 2).

Per i due isolati di *K. pneumoniae* VIM-1/CTX-M-15 produttori, i valori di MIC forniti da Microscan per IP (pari a 4 mg/L) sono risultati sovrapponibili a quelli ottenuti mediante micro-diluzione in brodo; le MIC per MP risultavano invece sottostimate per una diluizione.

I *range* di MIC ottenuti (per specie batterica) nel caso dei rimanenti isolati ES β L-produttori sono riportati in tabella 2.

Per i sei ceppi di *P. mirabilis* CMY-16- produttori, il fenotipo di resistenza ottenuto con Microscan (pannello NBC 45) è risultato in linea con quello atteso: un valore di MIC per la cefoxitina (CFX) pari a 16 mg/L, sensibilità alla piperacillina/tazobactam (MIC <8 mg/L) e valori di MIC del cefepime (CPE) compresi tra 0,5-8 mg/L sono stati correttamente osservati per tutti i ceppi studiati.

Undici dei 61 ceppi in studio erano produttori di una carbapenemasi di tipo KPC-2/3. MS ha consentito il corretto rilevamento di tutti gli isolati KPC produttori, con valori di MIC per l'ertapenem (ETP) superiori ad 1 mg/L, in accordo con i risultati ottenuti precedentemente sia in brodo-macrodiluizione che con E-test. Nel caso di isolati carbapenemasi produttori, la MIC di almeno uno fra i carbapenemi risultava più elevata rispetto al *breakpoint* clinico di sensibilità; i valori di MIC di ET sono risultati sempre i più elevati, confermando il valore predittivo di tale molecola. Dieci dei 61 isolati producevano una MBL (8/10 erano VIM-1, 2/10 erano IMP-13).

Tutti gli stipiti produttori di VIM-1 sono risultati intermedi o resistenti ad IP e/o MP (2 mg/L \leq IP/MP >8 mg/L) con pannelli Microscan; in 2/8 casi sono stati osservati, per il solo IP, valori di MIC inferiori a quelli precedentemente stimati. Nel caso dei due stipiti di *P. aeruginosa* IMP-13 produttori isolati nel reparto di Terapia Intensiva dell'Ospedale S. Giovanni Rotondo di Foggia, sono stati ottenuti (con pannello NBC45) valori di MIC dei carbapenemi sempre superiori ad 8 mg/L. Per entrambi gli isolati i valori di MIC per IP e MP risultavano pari a 32 mg/L mediante microdiluizione in brodo. Nove isolati di *A. baumannii* producevano oxacilinas con spiccata attività carbapenemasi: 4/10

Tabella 1. Isolati clinici e relative β L, ES β L e carbapenemasi (CB) prodotte; risultati di identificazione/ performance di rilevamento degli enzimi prodotti mediante il Sistema Microscan (MS).

Isolati clinici	N. Isolati	N° ceppi β L positivi	N° ceppi ES β L positivi	N° ceppi CB positivi	N° ceppi ES β L + CB positivi	Identificazione	Rilevamento ES β L	Rilevamento CB	Rilevamento ES β L+ CB
<i>Klebsiella</i> spp.	21	1 (K-1)* 1 (-)	4 (CTX-M-15) 1 (SHV-18)	3 (VIM-1) 9 (KPC 2/3)	2 (CTX-M-15 + VIM-1)	21/21 (100%)	5/5 (100%)	12/12 (100%)	- / 2 (0%)
<i>E. coli</i>	17	6 (-)	7 (CTX-M-1/-14) 2 (TEM-101/-52)	2 (VIM-1)	-	17/17 (100%)	8/9 (88.8%)	2/2 (100%)	-
<i>P. mirabilis</i>	15	6 (CMY-16 + TEM-1) 3 (-)	2 (CTX-M-2) 1 (PER-1) 3 (TEM-92)	-	-	15/15 (100%)	4/6 (66.6%)	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	4	-	1 (SHV-12)	3 (VIM)	-	4/4 (100%)	1/1 (100%)	3/3 (100%)	-
<i>A. baumannii</i>	9	-	-	4 (OXA-23) 4 (OXA-58) 1 (IsAbOXA-51)	-	9/9 (100%)	-	9/9 (100%)	-
<i>P. aeruginosa</i>	7	1 (mancante di porina OprD2)	2 (PER-1)	2 (IMP-13) 2 (VIM-1/-2)	-	7/7 (100%)	2/2 (100%)	4/4 (100%)	-
Totale	73	6	23	30	2	73	20/23 (87%)	30/30 (100%)	- / 2 (0%)

Tabella 2. Range di MIC degli antibiotici β -lattamici ottenuti con i pannelli Microscan.

		* MIC (mg/L)							
		CFX	CAZ	CFT	CPE	IP	MP	ETP	
I S O L A T C L I N I C I	<i>Klebsiella</i> spp.	β L positivi	≤ 8 (*NA)	≤ 1 (S)	≤ 1 (S) - 8 (R)	≤ 1 (S) - >8 (R)	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)	≤ 0.5 (S)
		ES β L positivi	$\leq 8 - 16$ (NA)	≥ 16 (R)	> 32 (R)	4 (I) - > 8(R)	$\leq 1 - 2$ (S)	$\leq 0.5 - 2$ (S)	≤ 0.5 (S)
		CB positivi	≥ 16 (NA)	≥ 16 (R)	≥ 32 (R)	≥ 8 (R)	≤ 2 (S) - 8 (R)	≤ 2 (S) - >8 (R)	> 1 (R)
		ES β L + CB positivi	> 8 (NA)	> 8 (R)	> 16 (R)	> 8 (R)	4 (I)	> 1 (S-I) - 8 (I)	≤ 0.5 (S) - 1 (I)
	<i>E. coli</i>	β L negativi	$\leq 8 - >16$ (NA)	≤ 1 (S) - >8(R)	≤ 1 (S) - 16 (R)	≤ 0.5 (S) - 4 (I)	≤ 2 (S) - 8 (I)	$\leq 0.5 - 2$ (S)	≤ 0.5 (S) - 2(R)
		ES β L positivi	$\leq 8 - 16$ (NA)	≤ 8 (R) - ≥ 16	≤ 1 (S) - >32(R)	≤ 0.5 (S) - >8 (R)	≤ 1 (S) - 8 (I)	≤ 0.5 (S) - 8 (I)	≤ 0.5 (S)
		CB positive	8 - 32 (NA)	8 (R) - ≥ 16	> 16 (R)	4 (I) - >8 (R)	$\leq 1 - 2$ (S)	$\leq 0.5 - 2$ (S)	≤ 0.5 (S) - 1 (I)
	<i>P. mirabilis</i>	β L negativi	≤ 8 (NA)	$\leq 0.5 - 1$ (S)	$\leq 0.5 - 1$ (S)	≤ 0.5 (S) - 1	≤ 2 (S)	$\leq 0.5 - 2$ (S)	≤ 0.5 (S)
		β L positivi	16 (NA)	8 (R) - ≥ 16	≥ 32 (R)	≤ 1 (S) - 8(R)	≤ 2 (S) - 4 (I)	≤ 2 (S)	≤ 0.5 (S)
		ES β L positivi	≥ 8 (NA)	≤ 0.5 (S) - 8 (R)	8 (R) - > 32	≥ 8 (R)	≤ 2 (S)	$\leq 0.5 - 2$ (S)	≤ 0.5 (S) - 1 (I)
	<i>A. baumannii</i>	CB positivi	-	-	-	> 8 (R)	4 (I) - >8 (R)	≥ 8 (I - R)	-
	<i>P. aeruginosa</i>	β L negativi	> 16 (NA)	> 8 (R)	-	> 8 (R)	> 8 (R)	8 (I)	-
ES β L positivi		> 16 (NA)	> 16 (R)	-	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	-	
CB positivi		> 16 (NA)	≥ 16 (R)	-	> 8 (R)	> 8 (R)	> 8 (R)	-	
<i>Enterobacter</i> spp.	ES β L positivi	≤ 8 (NA)	> 8 (R)	16 (R)	8 (R)	≤ 2 (S)	≤ 2 (S)	≤ 0.5 (S)	
	CB positivi	> 32 (NA)	> 16 (R)	> 32 (R)	≥ 8 (R)	≤ 2 (S) - ≥ 8 (I-R)	4 (I) - ≥ 8 (I - R)	> 1 (R)	

*CFX: cefoxitina; CAZ: ceftazidime; CFT: cefotaxime; CPE: cefepime; IP: imipenem; MP: meropenem; ETP: ertapenem
*NA: Non Applicabile

erano OXA-58-, 4/10 OXA-23- ed 1/10 *ISAbal* e *bla_{OXA-51}*- positivi. Per tutti questi isolati i valori di MIC per i carbapenemi risultavano sempre intermedi e/o resistenti. Sei dei nove *A. baumannii* produttori di carbapenemasi di tipo OXA hanno mostrato MIC per l'IP superiore ad 8 mg/L; in 3/6 casi anche la MIC del MP era superiore ad 8 mg/L. Tre dei nove *A. baumannii* OXA-58/-51 produttori, testati utilizzando il pannello NB40, sono risultati intermedi o resistenti al doripenem ed al mero-penem.

DISCUSSIONE

L'utilizzo di MS ha permesso di rilevare il 91.8% degli stipiti β L-produttori.

I valori di MIC di alcuni carbapenemi (es. IP) sono risultati in qualche caso inferiori di una diluizione rispetto quelli precedentemente determinati (E-test, microdiluizione in brodo); tuttavia, utilizzando i *breakpoint* EUCAST 2010 per ET, MP and IP, è stato possibile rilevare tutti gli stipiti carbapenemasi produttori.

Il sistema Microscan si è pertanto dimostrato un utile strumento per l'identificazione dei batteri BL, ES β L e/o carbapenemasi-produttori.

Il sistema si è inoltre dimostrato particolarmente versatile: l'operatore ha la possibilità non solo di inserire direttamente ulteriori regole esperte, ma anche di variare, in base agli aggiornamenti EUCAST, i criteri di refertazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnene T et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 428-435.
2. Kollef MH. Broad-spectrum antimicrobials and the treatment of serious bacterial infections: getting it right up front. *Clin Infect Dis* 2008; 47: S3-S13.
3. Kumar A, Roberts D, Wood KE et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589-1596.
4. Harbarth S, Nobre V, Pittet D. Does antibiotic selection impact patient outcome?. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 87-93.
5. Tenover FC, Raney PM., Williams PP et al. Evaluation of the NCCLS Extended-Spectrum B-Lactamase Confirmation Methods for *Escherichia coli* with isolates collected during Project ICARE. *J Clin Microb* 2003; 3142-3146.