

Molecular typing of *Acinetobacter baumannii* by automated repetitive-sequence-based PCR

Giuseppe Russello¹, Silvana Perin¹, Fabrizio Marini¹, Serena Barberis², Gabriele M. Perotti², Claudio Farina¹

¹ UOC Microbiologia e Virologia, AO "Ospedale San Carlo Borromeo", Milano

² Direzione Medica di Presidio, AO "Ospedale San Carlo Borromeo", Milano

Key words: *Acinetobacter baumannii*, Outbreak, Ribotyping

Caratterizzazione molecolare di *Acinetobacter baumannii* con metodo di rep-PCR

SUMMARY

Acinetobacter baumannii has been increasingly reported as a significant causative organism of various nosocomial infections. Here we describe three different outbreaks of multidrug resistant *A. baumannii* started in the Intensive Care Unit and then involving other wards of San Carlo Borromeo hospital in Milan, Italy. In order to characterize the clinical strains isolates, molecular typing using semi-automated repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR) was performed. Among the sixty-one strains analyzed, three main cluster (C1, C2, C3) were detected: C1 included six indistinguishable strains, C2 five and C3 thirty. No correlation was observed between chemosensitivity and ribotyping pattern and an high rate of carbapenems resistance was founded.

INTRODUZIONE

I batteri del genere *Acinetobacter* sono microrganismi Gram negativi a bassa virulenza. Tuttavia il loro ruolo quali responsabili di infezioni nosocomiali è assolutamente ingravescente a far corso dagli ultimi 40 anni (1-2, 13), a motivo della sua capacità di sopravvivere a lungo sulle superfici piane e di acquisire caratteri di multi-antibiotico-resistenza (7).

Molti episodi epidemici nosocomiali sostenuti da *Acinetobacter* spp. sono ormai segnalati nella letteratura scientifica, in particolare in reparti di Terapia Intensiva o per Grandi Ustionati, conseguenti soprattutto alla contaminazione delle mani del personale di assistenza e di cura e dei presidi medici. La terapia delle malattie da infezione da *Acinetobacter* spp. è resa complessa dall'emergenza e, poi, dalla rapida diffusione di ceppi *multidrug-resistant* (MDR). In particolare, significativo è l'incremento degli stipiti resistenti ai carbapenemi per l'acquisizione di geni che codificano per *carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase* (CHDL). Tale resistenza acquisita comporta che, in questi casi, la strategia terapeutica consideri la possibilità di utilizzare Ampicillina-Sulbactam e Colistina (3)

È stato condotto uno studio osservazionale retrospettivo sui pazienti colonizzati ed affetti da malattia da infezione da *A. baumannii* ricoverati presso l'AO "Ospedale San Carlo Borromeo" tra novembre 2009 e agosto 2010, utilizzando la tecnica di tipizzazione molecolare rep-PCR e di

caratterizzazione fenotipica del *pattern* di antibiotico-resistenza.

MATERIALI E METODI

Ceppi microbici

Tutti i ceppi di *Acinetobacter* spp. studiati sono stati isolati consecutivamente da 61 pazienti ricoverati presso l'AO "Ospedale San Carlo Borromeo" di Milano in un periodo di otto mesi (novembre 2009 – agosto 2010).

L'identificazione microbica è stata effettuata sulla base delle caratteristiche morfologiche (colorazione di Gram) e biochimiche (API 20 NE e VITEK2 *cards* GN-ID, bioMérieux, La Balme les Grottes, France) in accordo con le istruzioni del produttore. I ceppi microbici sono stati conservati in sangue defibrinato di montone a -80°C. Successivamente gli stessi microrganismi sono stati valutati con il metodo di ribotipizzazione rep-PCR e di caratterizzazione del profilo di suscettibilità agli antibiotici. Il ceppo di riferimento ATCC 19606 è stato utilizzato come controllo per i *test* di suscettibilità. Sono stati utilizzati i ceppi di controllo di *A. baumannii* *European clone* I, II e III, gentilmente forniti da E. Carretto, IRCSS-Policlinico "S. Matteo", Pavia.

Test di chemioantibioticosensibilità

La suscettibilità antibiotica è stata valutata con il metodo di agar diffusione sec. Kirby-Bauer su terreno Mueller Hinton, in accordo con i criteri del *Clinical and Laboratory Standards Institute*

Corresponding author: Claudio Farina

UOC Microbiologia e Virologia, AO "Ospedale San Carlo Borromeo"

Via Pio II, 3 - 20153 Milano - Tel.: +39 2 40222456 - Fax: +39 2 40222829

E-mail: farina.claudio@sancarlo.mi.it

(CLSI, M100-S17).

Gli antibiotici testati sono stati: ampicillina (10 μ g), amoxicillina/acido clavulanico (20+10 μ g), piperacillina (100 μ g), piperacillina/tazobactam (100+10 μ g), ceftazidime (30 μ g), ceftriaxone (30 μ g), gentamicina (10 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), cotrimossazolo (1.25+23.7 μ g), amikacina (30 μ g), cefepime (30 μ g), cefazolina (30 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), colistina (10 μ g), ampicillina-sulbactam (10+10 μ g), aztreonam (30 μ g), e tobramicina (10 μ g).

La Minima Concentrazione Inibente per tigeciclina e colistina è stata determinata con il metodo E-test (bioMérieux s.a) in accordo con le indicazioni del produttore.

Tipizzazione molecolare

È stata utilizzata, in accordo con le indicazioni del produttore, la tecnica di rep-PCR (*repetitive sequence-based polymerase chain reaction*) automatizzata (DiversiLab[®], bioMérieux Inc., St. Louis, USA), che permette di classificare gli agenti microbici, sulla base dei loro *pattern* di *fingerprinting*, a livello di subspecie. È un metodo altamente riproducibile che consente di discriminare ceppi clonali differenti, per tracciare la fonte e la diffusione di focolai epidemici. Essa prevede quattro passaggi successivi per generare *fingerprint* unici per ciascun campione microbico: estrazione del DNA da colture isolate, amplificazione mediante rep-PCR, separazione dei frammenti amplificati ed analisi dei dati.

L'analisi dei dati è stata effettuata con il *software* DiversiLab[™], version 3.4, che utilizza il coefficiente di correlazione di Pearson per definire dendrogrammi, elettroferogrammi, immagini virtuali e *scatter plots*. I ceppi sono considerati "indistinguibili" se la similarità è >97% senza differenze a livello dei *pattern* di *fingerprinting*, "simili" se la similarità è >95% ed una differenza a livello di *pattern* e "differenti" se la similarità è <95% con due o più differenze.

RISULTATI

La Figura I illustra i risultati dell'analisi di rep-PCR e del gel virtuale. Sono stati individuati 19 *pattern* diversi. L'analisi del dendrogramma ha evidenziato l'esistenza di due *cluster* principali (A₁ e A₂), caratterizzati da una similarità media di 62.7%.

Il primo *cluster* include solo uno stipite di *Acinetobacter* spp. Il *cluster* A₂ include 18 *pattern* differenti e, in particolare, può essere suddiviso in tre *subcluster* principali (C1, C2, and C3).

C1 include sei ceppi indistinguibili che presentano un'*average similarity ratio* di 96.1%, senza differenze nelle bande. Questi ceppi sono stati

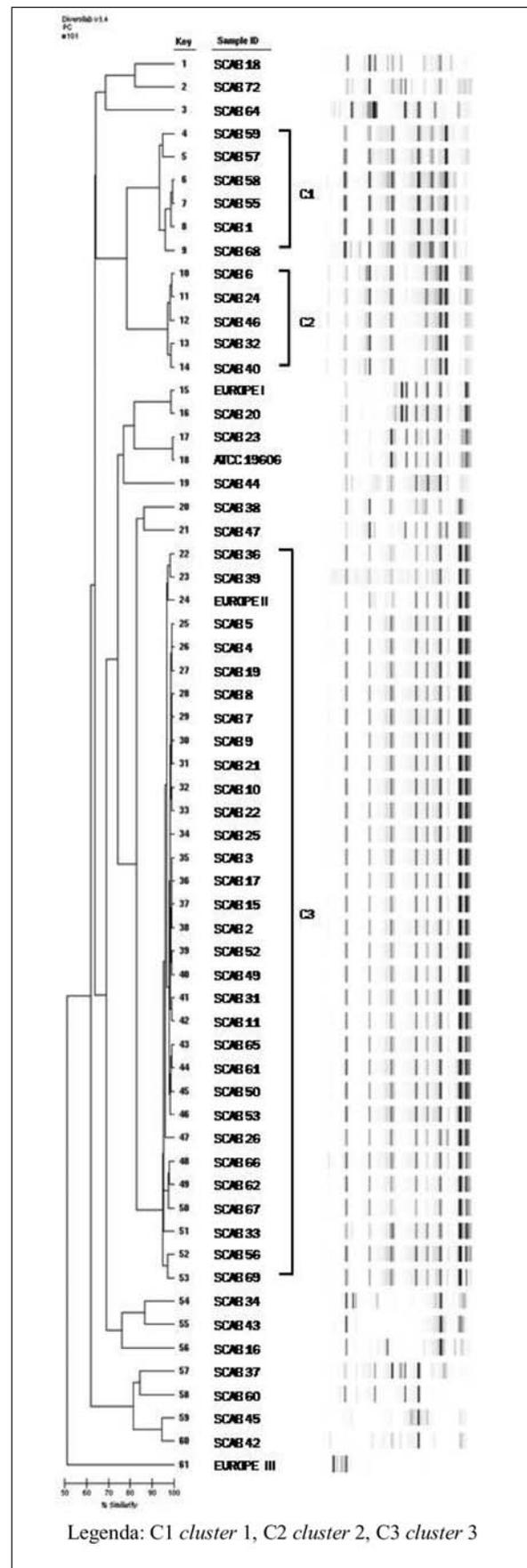


Figura I. Analisi rep-PCR. Da destra a sinistra è possibile osservare: elettroferogramma, campioni testati, cluster riscontrati e gel virtuale.

Tabella I. Test di chemioantibioticosensibilità in vitro sui ceppi di *Acinetobacter baumannii*

Cluster	AMC	TZP	CRO	FEP	CAZ	AZT	SAM	G	AK	CIP	SXT	IP	MEM	TOB	CS	TCG	
C1	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	2	
	R	R	R	R	R	R	S	R	I	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	S	R	R	R	R	S	R	I	R	R	S	S	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	6	
	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	2
	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5
C2	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	I	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.8	
	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	S	S	S	S	4	
	R	S	S	R	R	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	1.5	
	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	4	
	S	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4	
	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	
	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	
	I	S	S	I	R	I	S	R	S	S	R	S	S	S	S	4	
	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	8	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	8		
R	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	R	S	2		
C3	I	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	2	
	I	S	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	2	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	16	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	2	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	1.5	
	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I	
	I	S	S	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	4	
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.75	
	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.5	
	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	I	R	S	0.5
S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0.5		
R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1.5		
R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1.5		
R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I		
R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I		

Legenda: AMC, amoxicillina-aido clavulanico; TZP, piperacillina-tazobactam; CRO, ceftriaxone; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidime; AZT, aztreonam, SAM, ampicillina-sulbactam; G, gentamicina; AK, amikacina; CIP, ciprofloxacina; SXT, cotrimossazolo; IP, imipenem; MEM, meropenem; TOB, tobramicina; CS, colistina; tgc, tigeciclina.

isolati da cinque soggetti ricoverati presso le Unità di Rianimazione (n=2), Chirurgia, Medicina e Pneumologia. C2 include cinque ceppi indistinguibili con un'average similarity ratio di 97.1%, senza differenze nelle bande isolati da cinque pazienti degenti presso le Unità di Rianimazione (n=3), Stroke Unit, Riabilitazione e Neurologia. Infine, C3 include trenta stipti microbici indistinguibili (average similarity ratio di 95%): il 67% di questi ceppi era isolato da pazienti ammessi in Rianimazione.

Tutti i ceppi inclusi nel cluster C3 sono risultati indistinguibili dall'European clone II.

In tutti i tre cluster il caso "sorgente" è stato isolato da pazienti degenti in Rianimazione. Il ceppo costituente il cluster A₁ apparteneva all'European clone I, mentre nessuno dei ceppi era riconducibile all'European clone III.

Gli isolati erano considerati colonizzanti salvo che in due casi in cui si sono resi responsabili di batteriemia.

I risultati dei test di antibioticosensibilità sono compendati nella Tabella 1, da cui è possibile riconoscere quattro differenti profili: il primo raggruppamento ceppi sensibili alla più parte degli antimicrobici testati; il secondo comprende stipti sensibili ai carbapenemi, a colistina e ad ampicillina-sulbactam; il terzo è costituito da ceppi sensibili agli aminoglicosidi, a colistina e ad ampicillina-sulbactam, ed infine il quarto profilo si caratterizza per la sensibilità esclusivamente a colistina e ad ampicillina-sulbactam.

Le MIC per tigeciclina erano comprese tra 0.5 mg/L e 16 mg/L con MIC₅₀ e MIC₉₀ di 1.5 mg/L e 4 mg/L rispettivamente.

DISCUSSIONE

Acinetobacter spp. è un coccobacillo Gram negativo che in anni recenti è stato sempre più frequentemente identificato quale causa di infezioni associate alle organizzazioni sanitarie (5, 11).

Considerato commensale con un basso livello di patogenicità, mostra tuttavia un'eccellente capacità di acquisire resistenze agli antibiotici ed a permanere nell'ambiente (11-12, 16). *Acinetobacter* spp. è responsabile di più del 10% di tutte le infezioni da batteri Gram negativi nelle Unità di Terapia Intensiva in Europa e negli Stati Uniti di America (6, 11, 14, 16).

I sistemi di sorveglianza delle infezioni ospedaliere devono essere efficienti nell'identificazione di tali eventi (8-10). In questa prospettiva la tecnica di rep-PCR appare essere altamente efficiente nel definire precocemente la circolazione clonale di microrganismi epidemici, confermando od escludendo correlazioni genetiche tra i ceppi isolati (4). In questo studio il sistema di rep-PCR Diversilab™

ha identificato diciannove diversi pattern di *Acinetobacter* spp. ed ha confermato l'esistenza di tre focolai epidemici, tutti a partenza dall'Unità di Rianimazione e poi traslocati in altri reparti di diagnosi e cura.

Il cluster principale era costituito da batteri appartenenti all'European clone II (49.2% dei ceppi) e solo in un caso il ceppo era del clone Europa I.

Non è stata rilevata alcuna correlazione tra fingerprints e tipologia di campione biologico di origine, né tra fingerprints e quadro di gravità clinica.

L'emergenza dei ceppi di *Acinetobacter* multiresistenti è un fenomeno sempre più attuale che si caratterizza per la difficoltà nell'impostazione di un'efficace opzione terapeutica soprattutto nel caso di ceppi resistenti ai carbapenemi la cui conferma deve essere effettuata mediante la determinazione della Minima Concentrazione Inibente mediante metodo di diluizione in brodo, diluizione in agar oppure E-test.

Alcuni inibitori delle beta-lattamasi, come Tazobactam e Acido clavulanico, sono stati utilizzati con successo in combinazione con un betalattamico nel trattamento delle infezioni da *Acinetobacter* spp.

Tra queste molecole, Sulbactam presenta una duplice azione agendo come inibitore delle beta-lattamasi e possedendo un'attività antimicrobica intrinseca nei confronti di *Acinetobacter* spp.

Numerosi studi *in vitro* suggeriscono inoltre che l'associazione Ampicillina-Sulbactam risulta costantemente più efficace nei confronti di *Acinetobacter* spp. rispetto alla maggior parte delle cefalosporine, Ciprofloxacina, Gentamicina e delle altre combinazioni beta-lattamico-inibitore delle beta-lattamasi.

Questa maggiore efficacia sembra essere dovuta al solo Sulbactam, come confermano alcuni studi su modello animale in cui Sulbactam in monoterapia ha presentato maggiore efficacia rispetto ad altre betalattamici su *Acinetobacter* spp.

Inoltre, il 66.2% dei ceppi isolati risultava resistente ai carbapenemi. Tuttavia, la Colistina e l'Ampicillina-Sulbactam mostravano la migliore attività *in vitro* confermandosi la migliore opzione terapeutica.

Il metodo di rep-PCR è risultato altamente efficace e specifico ed ha permesso di individuare un focolaio epidemico all'interno del reparto di Rianimazione. Il sistema ha permesso inoltre una suddivisione specifica degli isolati analizzati e di individuare cluster di strains geneticamente più simili tra loro.

Tale metodo è risultato inoltre utile per una rapida classificazione dei ceppi quando comparati con i ceppi di riferimento.

BIBLIOGRAFIA

1. Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML. An underestimated nosocomial pathogen, *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Antimicrob Chemother* 1985; 16: 535-8.
2. Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML, Vieu JF. Epidemiology of nosocomial infections due to *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Hosp Infect* 1987; 10: 105-13.
3. Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1-3.
4. Carretto E, Barbarini D, Farina C, Grosini A, Nicoletti P, Manso E. Use of the DiversiLab[®] semiautomated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction for epidemiologic analysis on *Acinetobacter baumannii* isolates in different Italian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 1-7.
5. Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrugresistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5: 939-51.
6. 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.
7. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis* 2006; 6:130.
8. Kristóf K, Szabó D, Marsh JW, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 563-70.
9. Lipworth AD, Hyle EP, Fishman NO, et al. Limiting the emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: influence of patient population characteristics on the response to antimicrobial formulary interventions. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 279-86.
10. Paterson DL. Resistance in Gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med* 2006; 119: S20-S28 discussion S62-70.
11. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 538-82.
12. Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3471-84.
13. Retailliau HF, Hightower AW, Dixon RE, Allen JR. *Acinetobacter calcoaceticus*: a nosocomial pathogen with an unusual seasonal pattern. *J Infect Dis* 1979; 139: 371-5.
14. Richet H, Fournier PE. Nosocomial infections caused by *Acinetobacter baumannii*: a major threat worldwide. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27: 645-6.
15. Van Looveren M, Goossens. HARPAC Steering Group. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 684-704.