

EPIDEMIOLOGICAL OBSERVATORY: spreading of ESBL and carbapenemase positive strains in the period between January 2007 - June 2012, at the Hospital - University Campus - Hospital "Luigi Sacco" in Milan

Loredana Tocalli, Andrea Boselli, Sara Giordana Rimoldi, Maria Rita Gismondo

U.O. Di Microbiologia e Virologia, A.O. Polo Universitario Ospedale "Luigi Sacco", Milano

Key words: Monitoring, Epidemiologic, Carbapenemase, Extended Spectrum Beta Lactamase, *Enterobacteriaceae*

OSSERVATORIO EPIDEMIOLOGICO: circolazione di ceppi ESBL e carbapenemasi positivi, nel periodo Gennaio 2007 – Giugno 2012, presso l'Azienda Ospedaliera - Polo Universitario - Ospedale "Luigi Sacco" di Milano

SUMMARY

Infections caused by ESBL-producing *Enterobacteriaceae* and carbapenemases producing bacteria are a growing phenomenon which is one of the leading causes of death among elderly or immunosuppressed patients and is also associated with a higher cost of hospitalization.

As worldwide, also in Italy a steady and alarming increase of these microorganisms is reported.

With the present paper we present a brief review of the prevalence of ESBL-producing and carbapenemase strains isolated at the Hospital - University Campus - Hospital "Luigi Sacco" in Milan between January 2007 and June 2012.

Samples ESBLs positive (Vitek2: bioMérieux, France) were subjected to phenotype confirmation by E-test method (bioMérieux, France). In addition 34 *K. pneumoniae* carbapenemases producing strains collected between 2011 and 2012, were firstly confirmed with an Hodge test and then tested with a NASBA EasyQ KPCv1.0 test (bioMérieux, France) able to detect the bla_{KPC} gene.

The data collected showed a high prevalence of ESBLs and carbapenemases producing strains. 1828 out of 15585 were positive for ESBL with the following distribution: 15.6% *E. coli*, 13.0% *K. pneumoniae*, 3.6% *Enterobacter* spp, 7.7% *P. mirabilis* and 6% *P. aeruginosa*. Out of 1828, 193 samples (10.5%) were confirmed as positive and respectively 89.4% were *E. Coli*, 80% were *K. pneumoniae* and 89.5% were *P. mirabilis*. The 3.6% of strains were positive for carbapenemase: 45.3% were *A. baumannii* and 41.8% were *P. aeruginosa*. *K. pneumoniae* strains carbapenemase positive were confirmed in 100% of cases by the Hodge test and in 97% of cases by molecular investigation.

INTRODUZIONE

La grande maggioranza delle infezioni da batteri Gram negativi di origine nosocomiale è sostenuta oggi, da *Enterobacteriaceae* e da batteri non fermentanti prevalentemente appartenenti al genere *Pseudomonas* ed *Acinetobacter* in cui la modificazione delle porine ma soprattutto la produzione di β-lattamasi rappresentano i principali meccanismi di resistenza agli antibiotici.

Le β-lattamasi note, il cui numero è in costante crescita (<http://lahey.org/studies>), sono distinte in quattro gruppi principali (A, B, C, D) secondo la classificazione di Ambler (1) ed in base alla specificità di substrato in: penicillinasi, β-lattamasi ad ampio spettro (ESBL), carbapenemasi e cefalosporinasi di tipo AmpC (4).

L'ampio utilizzo in terapia delle β-lattamine ed in particolar modo quelle ad ampio spettro, ha portato alla diffusione su vasta scala di ceppi produttori di ESBL i quali, pur mantenendo la sensibilità nei confronti dei carbapenemi, cefamicine e di inibitori come l'acido clavulanico, sulbactam e tazobactam, sono in grado di idrolizzare efficacemente sia le penicilline di prima, seconda e terza generazione come anche le cefalosporine e l'aztreonam (3).

Tra i tipi di ESBL noti (TEM, SHV, CTX-M, VEB, PER, GES) quelli più diffusi, sia in ambito ospedaliero che comunitario, a livello europeo, sono il tipo CTX-M, riscontrato in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter* spp e *Proteus* spp, ed il tipo TEM identificato prevalen-

Corresponding author: Loredana Tocalli

U.O. Di Microbiologia e Virologia; A.O. Polo Universitario; Ospedale "Luigi Sacco"

Via G.B. Grassi, 74 - 20157 Milano - Tel.: 02 39042469

E-mail: tocalli.loredana@hsacco.it

temente nei batteri non fermentanti quali *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (5,12).

Sebbene i ceppi batterici or ora citati rappresentino i principali produttori di β -lattamasi a spettro esteso in Europa, studi recenti hanno evidenziato la presenza di ESBL anche in alcuni ceppi emergenti di *Salmonella enterica* isolati in Italia in cui è stata identificata la presenza del gene *bla*_{CTX-M-1} (17).

La diffusione dei ceppi produttori di ESBL ha portato, nel tempo, ad un aumento dell'utilizzo dei carbapenemi per il trattamento delle infezioni da *Enterobacteriaceae* contro la maggior parte delle quali essi mantengono ancora, una buona efficacia (21).

Tuttavia l'incremento nell'uso dei carbapenemi ha, a sua volta, creato una pressione selettiva, con il risultato di indurre la diffusione di ceppi resistenti in grado di produrre diverse classi di enzimi carbapenemici come MBL, OXA, KPC e GES sia tra le *Enterobacteriaceae* stessi, che in numerosi ceppi di *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (19).

La diffusione di ceppi produttori di ESBL all'interno del gruppo delle *Enterobacteriaceae* è quanto mai trasversale a causa dell'intrinseca facilità di trasferimento genico di tipo orizzontale, sia all'interno di ciascuna specie, sia tra specie diverse di Enterobatteri (14); inoltre la concomitante selezione di produttori di carbapenemasi pone il serio problema della comparsa ormai non più sporadica di ceppi potenzialmente resistenti a tutti gli antibiotici noti (MDR) (4).

In un'ottica di prevenzione e controllo delle infezioni da ceppi positivi per ESBL e per carbapenemasi, in particolar modo nei reparti di Lungo Degenza e di Terapia Intensiva, è più che mai importante un'identificazione accurata dei casi positivi (13). Inoltre una rapida identificazione di ESBL e carbapenemasi permette l'immediata applicazione di tutte le misure di prevenzione atte al contenimento e alla diffusione dell'infezione (20) (isolamento dei pazienti, controlli programmati sui Reparti a rischio etc...), nonché la possibilità di instaurare una corretta terapia farmacologica per evitare l'insorgere di nuove e più temibili resistenze (7, 23).

Nell'ultimo decennio anche in Italia la prevalenza delle ESBL ed enzimi correlati ha raggiunto livelli preoccupanti, secondo numerosi studi, infatti siamo passati dalla percentuale di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL che nel 2003 si attestava intorno al 7% con una prevalenza del tipo CTX-M di circa il 60% (dato nazionale) (15, 18), a dati più recenti del 16.9% di ceppi ESBL produttori che hanno confermato la tendenza all'aumento e ad un drastico incremento del tipo CTX-M, che ha raggiunto una prevalenza del 73% (9, 22).

Parallelamente si è assistito ad un incremento della frequenza di isolamento di ceppi produttori di carbapenemasi: il rapporto annuale EARSS 2008 (<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms>) indicava una prevalenza in Italia per *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* entro il 5%, ma studi più recenti (2010) hanno descritto un incremento della prevalenza in *K. pneumoniae* carbapenemasi fino al 13%, in alcune realtà ospedaliere del Nord Italia (8). Inoltre lo stesso rapporto EARSS riferito al 2011 ha evidenziato un aumento della prevalenza di *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* carbapenemasi positive sino al 16% a livello nazionale.

Lo scopo, quindi di questo lavoro è stato quello di fare una valutazione puntuale della prevalenza dei ceppi ESBL produttori e carbapenemasi positivi circolanti nella realtà dell'A.Ospedaliera, Polo Universitario, Ospedale "L. Sacco" di Milano.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra il 1 Gennaio 2007 e il 1 Giugno 2012 sono stati analizzati, presso l'U.O. di Microbiologia e Virologia dell'A.O., Polo Universitario "L.Sacco", 200009 campioni di vario tipo: materiali dalle vie respiratorie, essudati, tamponi da ferita, emocolture, urinocolture, cateteri venosi, liquidi pleurici e peritoneali, provenienti da pazienti ricoverati prevalentemente presso le U.O. di Malattie Infettive, Medicine Specialistiche, Reparti Chirurgici, Ginecologia, Anestesia e Rianimazione.

I campioni risultati positivi nel periodo per *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* sono stati identificati mediante analizzatore automatico Vitek2 (bioMérieux, Francia).

I ceppi con fenotipo ESBL positivo, conservati mediante slant in infissione (Bio-Rad, USA), sono stati sottoposti a *test* di conferma del fenotipo mediante E-*test* Cefrazidime/Ceftazidime+Acido clavulanico (bioMérieux, Francia) allestendo una piastra di Mueller Hinton Agar (bioMérieux, Francia), secondo le specifiche del produttore (Figure III e IV). Per il controllo di qualità sono stati utilizzati i ceppi di riferimento *E. coli* ATCC 35218 e *K. pneumoniae* ATCC 700603.

I campioni risultati positivi per *K. pneumoniae* che mostravano il fenotipo di "carbapenemasi" (Metallo od OXA – resistente ai carbapenemi secondo i parametri VT2 EUCAST 2012) sono stati confermati in via preliminare attraverso il test di Hodge modificato utilizzando per l'inoculo su terreno Mueller Hinton il ceppo di riferimento *E. coli* ATCC 25922 come da metodica (Figure V e VI). Inoltre per verificare la presenza del gene *bla* KPC codificante per la carbapenemasi di tipo

KPC si è utilizzato il test NASBA commerciale EasyQ KPC v1.0 (bioMérieux, Francia).

RISULTATI

Nel quinquennio 2007-2012 presso l'U.O.C. di Microbiologia e Virologia dell'A.O., Polo Universitario, Ospedale "L. Sacco" su un totale di 200009 campioni pervenuti è stata riscontrata una positività per batteri Gram negativi, Enterobatteri e non fermentanti, nei diversi campioni sottoposti ad esame colturale pari al 7.8%. I campioni positivi sono stati identificati fenotipicamente come: *E. coli* 54.4%, *P. aeruginosa* 19.1%, *K. pneumoniae* 9.7%, *A. baumannii* 3.2%, *Proteus mirabilis* 8.9% ed *Enterobacter* spp 4.7% (Figura I).

Nell'ambito di questo gruppo di microorganismi 1828 ceppi sono risultati positivi per ESBL con la seguente distribuzione:

1321 *E. coli* pari al 15.6%, 197 *K. pneumoniae* pari al 13.0%, 26 *Enterobacter* spp pari al 3.6%, 107 *P. mirabilis* pari al 7.7% e 177 *P. aeruginosa* pari al 6% del totale. Abbiamo successivamente confermato i ceppi ESBL positivi utilizzando E-test eftazidime/Ceftazidime+Acido clavulanico, su 193 campioni, pari al 10.5% degli isolati, di cui 141 ceppi di *E. coli*, 15 di *K. pneumoniae*, 19 di *P. mirabilis*, 9 di *P. aeruginosa* e 9 di *Enterobacter* spp, evidenziando una percentuale di positivi confermati come segue: 89.4% per *E. coli*, 80% per *K. pneumoniae*, 89.5% per *P. mirabilis* e 77.7% per *P. aeruginosa* mentre la percentuale di conferme sugli *Enterobacter* spp testati risulta essere significativamente più bassa 44.4% (Figura II).

Nello stesso periodo di osservazione sono stati identificati, tra i colturali positivi (Figura I), 560 campioni positivi per carbapenemasi pari al 3.6% degli isolati, di cui 229 *A. baumannii* pari al

45.3%, 97 *K. pneumoniae* pari al 6.4% e 234 *P. aeruginosa* pari all'8%.

Inoltre, su un campione di 34 ceppi di *K. pneumoniae* isolati nel periodo 2011-2012 con fenotipo positivo per carbapenemasi e resistenza per meropenem e imipenem è stato possibile eseguire oltre al test di conferma di Hodge con esito positivo nel 100% dei casi, anche l'analisi biomolecolare che ha evidenziato la presenza del gene *bla* KPC in 33 campioni su 34 pari al 97% dei ceppi analizzati.

DISCUSSIONE

I dati da noi ottenuti risultano in linea con i rilevamenti a livello nazionale e da quanto sopra esposto si evince come la problematica delle resistenze batteriche sia anche nella nostra realtà un problema emergente. Le infezioni sostenute da ceppi

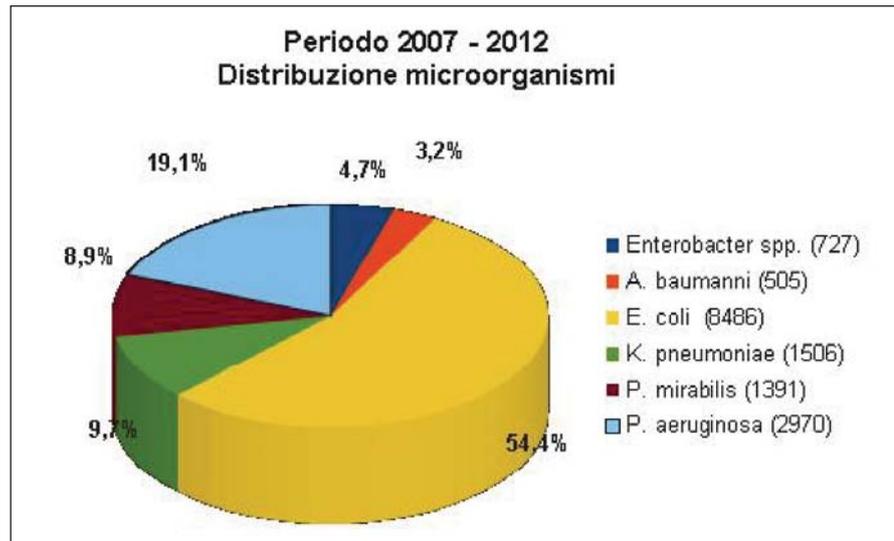


Figura I. Distribuzione microorganismi isolati nel periodo 2007 - 2012.

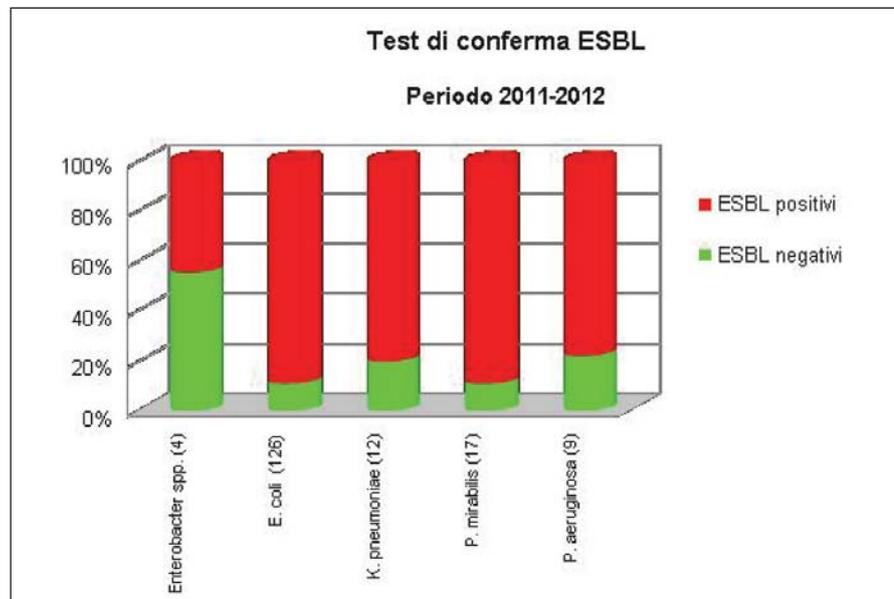


Figura II. Percentuale di campioni confermati positivi per ESBL.



Figure III e IV. Test del Doppio disco: E.coli "zona fantasma".



Figure V e VI. Hodge Test: K. pneumoniae.

di *Enterobacteriaceae* multiresistenti come anche quelle in cui entrano in gioco specie di batteri non fermentanti carbapenemasi positive, sono in aumento e risultano essere la principale causa di un'aumentata mortalità tra pazienti immunodepressi, in età avanzata o con gravi patologie di base (6, 10).

Questo tipo di infezioni, inoltre, per la loro gravità e severità sono causa di prolungati periodi di degenza con cospicui aumenti dei costi di ospedalizzazione per i singoli pazienti (11).

La sempre più diffusa presenza di microrganismi produttori di EBSL e carbapenemasi e l'insorgenza di ceppi MDR sta quindi cambiando il panorama microbiologico e con esso l'approccio alla terapia per i pazienti ricoverati.

Questa maggiore diffusione di ceppi batterici multiresistenti crea, infatti, la necessità di una maggior interazione tra il Clinico ed il Microbiologo al fine di poter, da una parte, identificare tempestivamente i pazienti affetti o portatori di ceppi MDR, il cui approccio terapeutico dovrà necessariamente tener conto dei dati epidemiologici locali e quindi essere basato su una più

efficace terapia antibiotica di tipo mirata (2), e dall'altra per poter mettere in atto tutte le misure di prevenzione come la messa in atto di protocolli di sorveglianza sui pazienti e sul personale sanitario (considerato potenziale vettore di diffusione) (16), per il contenimento delle infezioni emergenti da ceppi MDR a livello nosocomiale.

BIBLIOGRAFIA

1. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Phil Trans R. Soc Lond B* 1980; 289: 321-31.
2. Bassetti M, Repetto E. Diagnostic and therapeutic management of Gram negative infections. *Infez Med* 2008; 16 Suppl(2): 22-9.
3. Bradford PA. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-51.
4. Bush K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Current Opinion in Microbiology* 2010; 13: 558-64.
5. Canton R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012; 3: 110.
6. Chastre J. Infections due to *Acinetobacter baumannii* in ICU. *Semin Respir Crit Care Med* 2003; 24: 69-78.
7. De Rosa FG, Pagani N, Fossati L, et al. The effect of

- inappropriate therapy on bacteremia by ESBL-producing bacteria. *Infection* 2011; 39: 555-61.
8. Galbani P, Ambretti S, Berlingeri A, et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March – 30 September 2010. *Euro surveill* 2011; 16(8): pii=19800.
 9. Gattuso G, Tomasoni D, Palvarini L, et al. La problematica della circolazione di Enterobacteriaceae ESBL positive: situazione epidemiologica nell'Azienda Ospedaliera di Mantova. *Infez Med* 2009; 17(3): 164-8.
 10. Gona F, Mezzatesta ML, Corona D, et al. *Klebsiella pneumoniae* ESBL producers responsible for severe UTIs in a renal transplant unit. *Infection* 2011; 39(1): 83-5.
 11. Lautenbach E, Patel JB, Bilker WB, Edelstein PH, Fishman NO. Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clin Infect Dis* 2001; 32(8): 1162-71.
 12. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(2): 165-74.
 13. Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67(7): 1569-77.
 14. Luzzaro F, Gesu G, Pagani L, Rossolini GM. Diagnostica delle β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) nelle *Enterobacteriaceae*: problemi e raccomandazioni nella realtà epidemiologica italiana. *Microbiologia Medica*. 2007; 22(4): 281-90.
 15. 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(5): 1659-64.
 16. March A, Aschbacher R, Dhanji H, et al. Colonization of residents and staff of a long-term-care facility and adjacent acute-care hospital geriatric unit by multi-resistant bacteria. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 934-44.
 17. Monno R, Rizzo C, De Vito D, et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and Extended-Spectrum β -Lactamases characterization of *Salmonella* isolates in apulia, southern Italy (2001-2005). *Microb Drug Resist*. 2007; 13(2): 124-9.
 18. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(8): 2700-6.
 19. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010; 300(6): 371-9.
 20. Pop-Vicas AE, Mitchell SL, Kandel R, Schreiber R, D'Agata EM. Multi-drug-resistant Gram negative bacteria in a long-term-care facility: prevalence and risk factors. *J Am Geriatr Soc*. 2008; 56: 1276-80.
 21. Thomson KS. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J Clin Microbiol*. 2010; 48(4): 1019-25.
 22. Tinelli M, Cataldo MA, Mantengoli E, et al. Epidemiology and genetic characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing Gram-negative bacteria causing urinary tract infections in long-term care facilities. *J Antimicrob Chemother* 2012: dks300v1-dks300.
 23. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate Initial Antimicrobial Treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(6): 1987-94.