

Multifocal diffusion of KPC-3-producing ST512 *Klebsiella pneumoniae* in Italy

Aurora Piazza¹, Viola Repetto¹, Elisabetta Nucleo¹, Roberta Migliavacca¹, Monica Drago², Maria Chiara Sironi², Concetta De Luca³, Erminia Casari³, Francesco Luzzaro⁴, Giampietro Gesu², Laura Pagani¹

¹ Sezione di Microbiologia, Dipartimento S.C.C.D. P. Pavia

² Laboratorio di Microbiologia, Ospedale "Niguarda Ca' Granda", Milano

³ Laboratorio Analisi, sez. di Microbiologia, IRCCS Istituto Clinico "Humanitas", Rozzano (MI)

⁴ Laboratorio di Microbiologia, Ospedale "Alessandro Manzoni", Lecco

Key words: carbapenems resistance, KPC-3, ST512

Diffusione multifocale di *Klebsiella pneumoniae* KPC-3 produttori ST512 in Italia

SUMMARY

Introduction. The dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains is an increasing problem worldwide. KPC β -lactamases are Ambler class A enzymes mostly plasmid-encoded; their global spread represents a threat to clinical patients care and public health. Multi locus sequence type (ST)258 is currently the most spread *K. pneumoniae* clone associated with KPC enzymes.

Here we report the first identification and multifocal spread of KPC-3 producing *K. pneumoniae* clinical strains belonging to ST512 in Italy.

Materials and Methods. Fifty six carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates were collected from 7 Italian hospitals during the period June 2009-May 2011. Isolates were obtained from different wards (spinal unit, medicine, hematology, etc.) and biological samples (mostly rectal swabs, urine and blood).

Species identification and antimicrobial susceptibilities were obtained by NBC46/NM40 Microscan panels (Siemens). MICs values were interpreted according to EUCAST 2011 breakpoints. Modified Hodge test and combined disk test with phenyl-boronic acid (BOR) and EDTA were performed. The presence of *bla*KPC genes were confirmed by PCR and sequencing. A complete characterization of the produced β -lactamases (BLs) was obtained by IEF followed by PCR experiments using primers specific for the detection of *bla*CTX-M-, *bla*TEM- and *bla*SHV type genes. PFGE and multilocus sequence typing (MLST) were both used to investigate clonal isolates relatedness.

Results. All 56 isolates resulted positive for the presence of KPC-type carbapenemases by both phenotypic and molecular analysis. Fifteen isolates, chosen as representative, were further investigated.

Ten out of 15 isolates harboring the *bla*KPC-2 gene clustered with the known ST258, while the remaining 5/10 belonged to the newly described ST512 and harbored the *bla*KPC-3 gene.

ST512 isolates, from 3/7 hospitals, were collected from rectal swabs (40%), blood (20%), endotracheal aspirate (20%) and urinary (20%) samples. Carbapenem MICs ranged from 2 mg/L to more than 16 mg/L; the isolates were characterized by the same multi-drug-resistant (MDR) profile.

Only in 1/5 cases such antimicrobial resistance profile was extended also to colistin (>2 mg/L). Three different PFGE clones were identified (A, B and C); one resulting characteristic of each hospital. Coherently with plis obtained by IEF, the presence of additional BLs were investigated by PCR; clones B and C resulted positive for *bla*CTX-M and *bla*SHV genes, while *bla*SHV and *bla*TEM genes were found in clone A.

Conclusion. Intra- and inter-hospital spread of KPC-positive strains was demonstrated. The heterogeneity of PFGE profiles showed the spread of different *K. pneumoniae* ST258 clones and the emergence of the new ST512 coupled with *bla*KPC-3 genes in Italian clinical settings. Strategies for carbapenemase detection and appropriate hospital hygiene precautions are indicated to limit the spread of the here described ST512 clone appears essential.

INTRODUZIONE

La diffusione di isolati di *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi-produttori rappresenta un problema in aumento in tutto il mondo. La produzione di enzimi di tipo KPC (β -lattamasi (BL) di classe A) è il meccanismo di resistenza che attualmente

desta più preoccupazione (9).

Il determinante di resistenza *bla*KPC è per lo più plasmide e/o trasposone -mediato (Tn4401); ciò rende conto dell'elevata potenzialità di diffusione. I ceppi che attualmente risultano maggiormente coinvolti in eventi epidemici ospedalieri a livello

Corresponding author: Aurora Piazza

Dipartimento Scienze Cliniche Chirurgiche Diagnostiche e Pediatriche, Sezione di Microbiologia - Università degli Studi di Pavia
Via Brambilla, 74 - 27100 Pavia - Tel.: 0382 984131 - Fax: 0382 5484255

E-mail: aurora.piazza01@ateneopv.it

mondiale appartengono al *multi locus sequence type* (ST) 258 (6, 11). Segnalazioni della diffusione in Italia di isolati di *K. pneumoniae* KPC-produttori multi-antibiotico resistenti (MDR) risalgono al 2008 (5). Le varianti enzimatiche diffuse a livello Nazionale risultano essere quelle di tipo KPC-2 e KPC-3, mentre il ST258, già segnalato da ospedali di diverse regioni italiane quali Toscana, Lazio, Sicilia, risulta il prevalente (3, 4, 7). Riportiamo qui la diffusione multi-focale di isolati di *K. pneumoniae* KPC-3 produttori appartenenti a ST512.

MATERIALI E METODI

- Ceppi batterici

Nel periodo Giugno 2009-Maggio 2011 sono stati raccolti, da 7 differenti ospedali Italiani (Ospedale "Niguarda Ca' Granda", Milano; IRCCS Istituto Clinico "Humanitas", Rozzano (MI); Ospedale "Alessandro Manzoni", Lecco; Nuovo Ospedale "S. Agostino Estense", Modena; Istituto Geriatrico "Piero Redaelli", Milano; IRCCS Policlinico San Donato, Milano; Ospedale "Guglielmo da Saliceto", Piacenza), un totale di 56 isolati di *K. pneumoniae* sospetti KPC- produttori.

- Test fenotipici

Identificazione e *test* di sensibilità agli antibiotici sono stati eseguiti utilizzando i pannelli Microscan NBC-46 e NM40 (Siemens) ed interpretati secondo le linee guida EUCAST 2011 (3). Gli isolati con ridotta sensibilità ai carbapenemi (con MIC maggiore rispetto alla più alta MIC della popolazione wild-type - <http://www.eucast.org>) sono stati sottoposti a *test* di Hodge Modificato con ertapenem (ETP) (2).

È stato effettuato il *test* in disco combinazione con ETP aggiunto di EDTA (0.5M) o di acido 3-aminofenilborbonico (BOR) (400 µg); un aumento di ≥ 5 mm dell'alone di inibizione relativo alla combinazione ETP + EDTA o ETP + BOR indica positività per la produzione di carbapenemasi di classe B o A, rispettivamente (8).

- Caratterizzazione delle β -lattamasi.

Isoelettrofocusing analitico (IEF) degli estratti enzimatici grezzi e rilevamento delle bande β -lattamasiche (pIs) mediante Nitrocefina sono stati condotti come descritto precedentemente (10). L'attività nei confronti di cefotaxime, ceftazidime, cefepime (1 mg/L) ed IPM (0.5 mg/L) è stata testata mediante il metodo del substrato ricoprente come descritto (10).

La presenza del gene *blaKPC* è stata confermata mediante PCR utilizzando la coppia di primer *blaKPC* For: TGTCAGTGTATCGCCGTC; e *blaKPC* Rev: CTCAGTGCTCTACAGAAAACC (11). Il protocollo di amplificazione di un frammento genico di 1000 bp consisteva di una fase di

denaturazione a 95°C (5 min) seguita da 35 cicli a 95°C per 1 min, 55°C per 40 sec, 72°C per 1.30 min; è stato inoltre inserito un ciclo di estensione a 72°C per 10 min.

I prodotti genici ottenuti sono stati purificati e sequenziati in entrambe le direzioni; le sequenze ottenute confrontate usando il database del National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Sono stati ricercati mediante amplificazione anche i geni *blaCTX-M* (con primer CTX-MU1: 5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAR GT e CTX-MU2: 5'-TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA), *blaSHV* (con primer SHV-For: 5'-GCC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC e SHV-Rev: 5'-TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA) e *blaTEM* (con primer TEM/F: 5'-ATA AAA TTC TTG AAG ACG AA-3' e TEM/R: 5'-ATA TGA GTA AGC TTG GTC TGA CAG-3').

- Esperimenti di genotipizzazione

La tipizzazione molecolare è stata effettuata mediante multi locus sequence type (MLST) ed elettroforesi in campo pulsato (PFGE).

La prima metodica prevede amplificazione e sequenziamento dei sette geni *housekeeping*: *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* e *tonB*. Ogni allele per ciascun locus viene identificato numericamente, il codice numerico, confrontato con una banca dati contenente tutti gli alleli fino ad oggi sequenziati, (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>) identifica il ST dell'isolato.

La genotipizzazione mediante PFGE è stata eseguita secondo procedura Gene Path (Bio-Rad Laboratories): il DNA genomico estratto è stato incluso in blocchetti di agarosio, quindi digerito con l'enzima XbaI ed i frammenti di restrizione separati in gel d'agarosio all'1.0% in tampone TBE 0.5X utilizzando l'apparecchio CHEF-DR II ed un programma specifico per separare frammenti compresi tra le 50 e 700 Kb. Il DNA del fago λ è stato inserito come marcatore di peso molecolare. I profili di restrizione sono stati analizzati con il software Fingerprinting II version 3.0 (Bio-Rad) usando il coefficiente di correlazione Dice ed impostando un valore di tolleranza pari all'1%. Isolati che mostravano *pattern* di bande differenti fra loro per meno di sei frammenti e con similarità $\geq 85\%$ sono stati considerati clonali.

RISULTATI

Nel biennio Giugno 2009 - Maggio 2011 sono stati raccolti, da 7 differenti ospedali Italiani, 56 isolati di *K. pneumoniae* sospetti KPC- produttori.

Gli isolati derivavano per la maggior parte da reparti di medicina (27%), terapia intensiva (22%) e rianimazione (17%); i campioni comprendevano per lo più urina (47%), sangue (29%), e bronco-

aspirato (11%).

Tutti gli isolati mostravano un fenotipo di multi-resistenza e MIC di ridotta sensibilità ai carbapenemi.

Tutti i 56 isolati sono risultati positivi al *test* di Hodge Modificato ed al *test* in disco-combinazione con ETP + BOR. Tutti gli isolati sono risultati negativi al *test* in disco-combinazione con EDTA. In tali isolati IEF e metodo del substrato ricoprente hanno permesso di individuare bande β -lattamiche a pI 6.7 con attività idrolitica nei confronti di cefalosporine a spettro esteso e carbapenemi.

La presenza del gene *blaKPC* è stata quindi confermata mediante amplificazione per tutti i 56 isolati. 15/56 sono stati scelti come rappresentativi ed ulteriormente caratterizzati.

Mediante PCR e sequenziamento 10/15 isolati si sono confermati albergare il gene *blaKPC-2*; la variante *blaKPC-3* è stata identificata nei rimanenti 5 ceppi (da 3/7 strutture ospedaliere site a Rozzano (MI), Milano, Lecco).

Il MLST ha evidenziato la presenza degli ST258 e ST512. Tutti gli isolati di ST258 producevano la variante enzimatica KPC-2; il gene *blaKPC-3* è stato identificato solo negli isolati di ST512.

Tre quinti (60%) isolati appartenenti a ST512 provenivano dall'unità spinale e 1/5 (20%) rispettivamente dal reparto di medicina, di oncologia medica ed ematologia. Gli isolati derivavano per la maggior parte (40%) da tamponi rettali, e in ugual percentuale da campioni di urina, sangue ed aspirato endotracheale (Grafico 1 A e B).

I valori di MIC dei carbapenemi per gli isolati KPC-3 produttori erano compresi tra >1 mg/L e >8 mg/L; tutti gli isolati mostravano resistenza anche ad amikacina (>16 mg/L), levofloxacina (>2 mg/L), ciprofloxacina (>1 mg/L) e tobramicina (>164 mg/L). In 1/5 casi il profilo MDR interessava anche la colistina, con un valore di MIC >2 mg/L (Tabella 1).

La PFGE eseguita sui 5 isolati di *K. pneumoniae* KPC-3 produttori ha mostrato 3 differenti pattern (A, B, C), "marker" di ciascuna struttura di provenienza (Figura I). Nel caso dei cloni B e C è stato

inoltre possibile ipotizzare mediante IEF la produzione, oltre che di un enzima di tipo KPC-3 con pI 6.7, di altre β -lattamasi aventi pI 8.2 e 7.6.

Nel caso del clone A, l'IEF ha invece evidenziato i pI 7.6, 6.7, 5.5 (dati non mostrati).

Mediante PCR si è confermata la presenza di geni di tipo *blaCTX-M* e *blaSHV* nei cloni B e C coeentemente ai pI evidenziati mediante IEF.

La presenza di β -lattamasi di tipo *blaSHV* e *blaTEM* è stata invece identificata per il clone A.

CONCLUSIONI

La diffusione di ceppi di *K. pneumoniae* MDR KPC-3 produttori rappresenta un problema globale. Gli isolati in studio hanno mostrato sensibilità limitata a gentamicina, tigeciclina ed in 4/5 casi a colistina, confermando il profilo fenotipico maggiormente diffuso sul territorio Nazionale. Casi di resistenza alla colistina, come nell'isolato raccolto presso l'IRCCS Istituto Clinico "Humanitas", appaiono tuttavia in aumento (1, 7). Il determinante genico *blaKPC*, talvolta cromosomico, può più frequentemente essere associato a plasmidi ed integroni, fattore che ne aumenta la potenzialità di diffusione intra- ed inter-specie. Ceppi KPC-3 produttori si sono diffusi rapidamente grazie alla comparsa ed espansione clonale di un ceppo dominante di *K. pneumoniae* di ST258. Tale ST sembra essere il *background* genetico prevalente. Riportiamo la comparsa in Italia del ST512 e la sua diffusione multifocale. Gli isolati appartenenti a questo nuovo ST provenivano da tre ospedali differenti localizzati nel Nord Italia e precisamente a Milano, Lecco e Rozzano (MI). Gli isolati clinici di *K. pneumoniae* di ST512 hanno mostrato, mediante PFGE, differenti profili genomici.

La differenza fra tali *fingerprints* rappresenta una conferma sia del maggiore potere di discriminazione di tale metodica, che dell'effettiva esistenza di una variabilità genetica all'interno di un medesimo ST. È stato inoltre possibile evidenziare un'associazione tra la variante genica *blaKPC-3* ed il ST512, nuovo supporto di diffusione degli enzimi di tipo KPC in Italia.

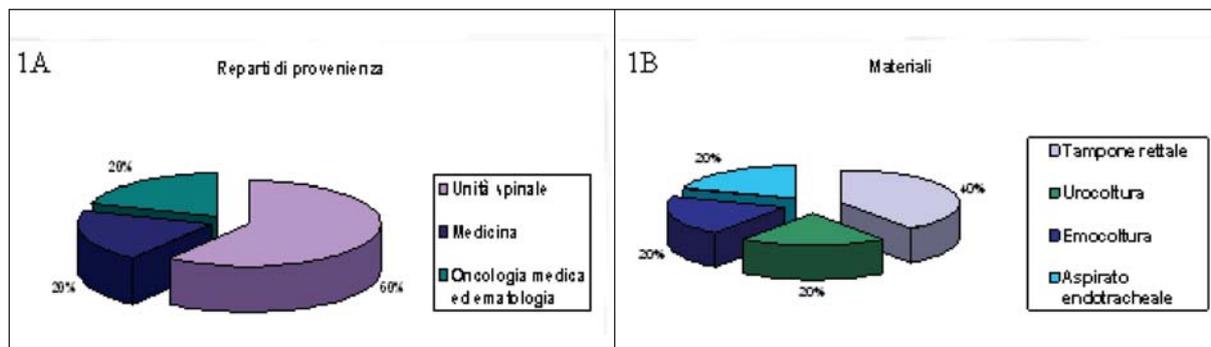


Figura I. Distribuzione percentuale dei 5 isolati ST512 KPC-3 per ospedale di provenienza (A), e per campione biologico (B).

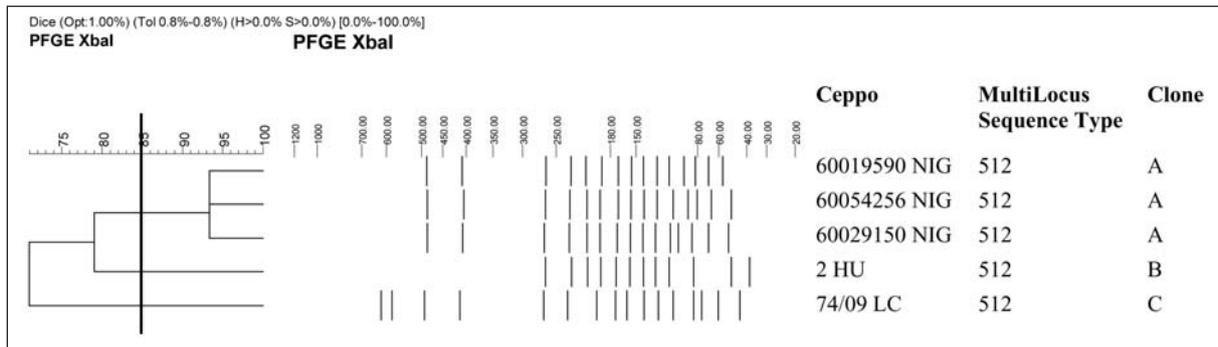


Figura II. Dendrogramma (percentuale di similarità) e bandeggio dei cinque isolati di *K. pneumoniae* ST512 dopo digestione con *XbaI*.

La comparazione fra i profili è stata eseguita mediante software *Fingerprinting II* versione 3.0 (Bio-Rad).

Tabella I. Valori di MIC degli isolati *K. pneumoniae* ST512. L'interpretazione delle MIC (S, I, R) è in accordo ai breakpoint clinici EUCAST (Tabella V. I.3, 2011-01-05).

Isolato	MIC mg/L									
	IMP	MEM	ETP	AK	CN	CO	LEV	CIP	TGC	TO
KI 60019590 NIG	>8 R	>8 R	>1 R	>16 R	≤2 S	≤2 S	>2 R	>1 R	1 S	>4 R
KI 60054256 NIG	>8 R	>8 R	>1 R	>16 R	≤2 S	>2 R	>2 R	>1 R	1 S	>4 R
KI 60029150 NIG	>8 R	>8 R	>1 R	>16 R	≤2 S	≤2 S	>2 R	>1 R	1 S	>4 R
KI 2 HU	>8 R	>8 R	>1 R	>16 R	≤2 S	≤2 S	>2 R	>1 R	≤1 S	>4 R
KI 74/09 LC	>8 R	>8 R	>1 R	>16 R	≤2 S	≤2 S	>2 R	>1 R	0,5 S	>4 R

Legenda: imipenem (IMP), meropenem (MEM), ertapenem (ETP), amikacina (AK), gentamicina (CN), colistina (CO), levofloxacin (LEV), ciprofloxacina (CIP), tigeciclina (TGC) e tobramicina (TO).

NIG: Ospedale Niguarda Cà Granda (MI), HU: IRCCS Istituto Clinico "Humanitas" (MI), LC: Ospedale "A. Manzoni" (LC).

BIBLIOGRAFIA

- Agodi A, Voulgari E, Barchitta M, et al. Containment of an outbreak of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *J Clin Microbiol* 2011; 49 (11): 3986-9.
- Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2007; 45 (8): 2723-5.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Version 1.3, 5 Jan 2011.
- Fontana C, Favaro M, Sarmati L, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *BMC Res Notes* 2010; 3: 40.
- Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 carbapenemase. *GM. J Clin Microbiol* 2009; 47 (11): 3793-4.
- Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53 (8): 3365-70.
- Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, et al. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17 (9): 1444-7.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 112-22.
- Nordmann P, Cuzon G and Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228-36.
- Pagani L, Luzzaro F, Ronza P, et al. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1994; 10: 39-46.
- Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63 (4): 654-8.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-61.