

Colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from a high specialization rehabilitation facility

Roberta Migliavacca¹, Viola Repetto¹, Aurora Piazza¹, Elisabetta Nucleo¹, Elisabetta Abbaneo², Silvana Telecco², Antonella Navarra², Laura Pagani¹

¹ Sezione di Microbiologia, Dipartimento S. M. E. C., Università di Pavia, Pavia

² Laboratorio di Microbiologia, I.R.C.C.S. Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

Key words: Colistin resistance, Carbapenemases, Rehabilitation Facility

Resistenza alla colistina in *Klebsiella pneumoniae* KPC-produttore in una struttura di riabilitazione di alta specializzazione

SUMMARY

The worldwide rapid spread of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC-Kp) represents an increasing problem in clinical settings. Reports on KPC-Kp epidemic spread in Italian hospitals began to appear since 2010; colistin (COL) represents one of the few remaining therapeutic options available for the treatment of such multi drug-resistant (MDR) pathogens.

Here we report the presence and diffusion of COL resistant KPC-Kp isolates from a High Specialization Rehabilitation Facility located in Northern Italy.

Species identification and antimicrobial susceptibilities were obtained by NBC46/NM40 Microscan panels (Siemens); imipenem, meropenem and ertapenem MICs were also evaluated by Etest and broth microdilution method; *bla*KPC-like genes PCR were performed.

PFGE (XbaI) was used to investigate clonal relatedness; epidemiological data were collected from the hospital database. Seventy-five carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates were collected from the Fondazione S. Maugeri hospital during the period January-June 2011. Seven out of 75 MDR KPC-Kp isolates by Microscan System showed COL resistance (MIC >2 mg/L). Among them, 5/7 were collected from coma and 2/7 from cardiology and rehabilitation cardiology wards. Most of these strains were from urine (5/7); the remaining 2/7 were from blood and bronco-alveolar lavage. The 85.7% of the strains showed susceptibility to tigecycline and fosfomicin; 71.4% only to gentamicina, 28.5% to trimethoprim/sulfamethoxazole and 14.2% to amikacin.

The PFGE profiles obtained analyzing 5/7 isolates from patients hospitalized from almost 10 days, showed clonal relatedness between 4/5 isolates, thus confirming the high epidemic potential of almost one KPC-Kp clinical strain collected from 4 different wards. The emergence of COL resistance in KPC-Kp, dramatically reduces the available therapeutic options. These results underline the ability of a COL resistant KPC-producing clone to rapidly spread within this Rehabilitation Facility.

INTRODUZIONE

Klebsiella pneumoniae produttore di carbapenemasi di tipo KPC (KPC-Kp) è un patogeno in rapida diffusione a livello mondiale di grande impatto clinico-terapeutico.

Le strutture di riabilitazione e lungodegenza possono giocare un ruolo chiave nella diffusione di tali ceppi (6). I centri di alta specializzazione forniscono cure a pazienti affetti da malattie croniche che richiedono servizi medici *ad hoc*, prolungata ospedalizzazione, e/o utilizzo di *devices* invasivi (cateterizzazione, ventilazione forzata, ecc...).

In tale tipologia di strutture, il rapido rilevamento su base fenotipica e la conferma molecolare di

isolati multi-antibiotico-resistenti (MDR) carbapenemasi-produttori, sentinella di possibili evoluzioni epidemiche, possono risultare tuttavia particolarmente problematici da un punto di vista diagnostico-strumentale (5).

Stipiti KPC-Kp con fenotipo MDR mantengono sensibilità solo verso alcuni antibiotici, quali alcuni aminoglicosidi, colistina e tigeclina (4); l'estrema limitazione delle opzioni terapeutiche determina elevati tassi di morbilità e mortalità infezione-associate.

Poiché la diffusione epidemica di KPC-Kp associata a multi-resistenza è stata descritta negli ospedali italiani a partire dal 2010, l'utilizzo di

Corresponding author: Roberta Migliavacca

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

Via Brambilla, 74 - 27100 Pavia - Tel.: 0382 984143 - Fax: 0382 5484255

E-mail: r.miglia@unipv.it

colistina (COL) riveste un ruolo terapeutico chiave. Rare risultano, attualmente, le segnalazioni in Italia di isolati carbapenemasi-produttori con resistenza estesa alla colistina (4).

Descriviamo la recente comparsa di tale resistenza in isolati KPC-Kp raccolti presso una struttura di riabilitazione di alta specializzazione del Nord Italia, che accoglie pazienti provenienti dall'intero territorio Nazionale.

METODI

Settantacinque isolati di *K. pneumoniae* carbapenemico-resistenti e KPC produttori (KPC-Kp) sono stati raccolti dalla Fondazione S. Maugeri nel periodo Gennaio-Giugno 2011. I test di sensibilità per i 75 ceppi sono stati effettuati utilizzando pannelli NBC46/NM40 Microscan System (Siemens); i risultati sono stati interpretati secondo le Linee Guida EUCAST 2011 (3).

La produzione di carbapenemasi è stata valutata fenotipicamente tramite test di Hodge Modificato. Tale test è stato effettuato seminando su MH agar il ceppo *E. coli* ATCC 25922 (0.5 McFarland), deponendo al centro della piastra un dischetto di ertapenem (ETP) e strisciando alcune colonie del ceppo in esame sull'inoculo di *E. coli* (a partire dal dischetto di ETP verso l'esterno). La distorsione dell'alone di inibizione della crescita di *E. coli* in corrispondenza del ceppo testato indica una produzione di carbapenemasi (2).

La presenza del gene *blaKPC* è stata confermata mediante amplificazione genica utilizzando i seguenti primer: Kpc1FW: ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT; Kpc1RV: CAG GTT CCG GTT TTG TCT CC. Il protocollo di amplificazione (di un frammento genico di 710 bp) prevedeva una fase di denaturazione a 94°C (10 min); 30 cicli di: 94°C (1 min), 50.5°C (1 min), 72°C (1 min) ed infine un passaggio di estensione a 72°C (10 min). La genotipizzazione è stata effettuata mediante PFGE con procedura Gene Path (Bio-Rad Laboratories): il DNA genomico è stato digerito con l'enzima XbaI ed i frammenti di restrizione separati in gel d'agarosio all'1.0% in TBE 0.5X utilizzando l'apparecchio CHEF-DR II.

I concatenomeri del batteriofago λ sono stati utilizzati come marker di peso molecolare.

I profili di restrizione sono stati analizzati con il software Fingerprinting II version 3.0 (Bio-Rad) utilizzando il metodo UPGMA. Per determinare il valore percentuale di similarità fra differenti profili è stato usato il coefficiente di correlazione Dice ed impostato un valore di tolleranza pari all'1%.

Per l'analisi di correlazione sono state considerate bande maggiori di 48 Kb. Isolati che mostravano pattern di bande differenti fra loro per meno di

sei frammenti e con similarità $\geq 75\%$ sono stati considerati clonali.

I dati epidemiologici sono stati raccolti presso la banca dati ospedaliera.

RISULTATI

Durante il primo semestre 2011, dalla struttura di riabilitazione di alta specializzazione "Fondazione S. Maugeri" di Pavia, sono stati raccolti 75 isolati KPC-Kp.

Per 7/75 KPC-Kp, risultati MDR mediante il sistema Microscan, la resistenza interessava anche la colistina, con valori di MIC >2 mg/L.

Cinque di tali isolati (72%) provenivano dall'unità risveglio, 1/7 (14%) dal reparto di cardiologia ed 1/7 (14%) dal reparto di cardiologia riabilitativa. Nella maggior parte (5/7; 72%) dei casi, i ceppi KPC-Kp COL-resistenti provenivano da campioni di urina, solo in 2/7 (14%) dei casi erano stati isolati da emocoltura e bronco-aspirato (Grafici 1 A e B).

Cinque dei sette pazienti (71.7%) erano stati sottoposti in precedenza a trattamento con colistina. Gli isolati sono risultati nell'85.7% dei casi sensibili a fosfomicina e tigeciclina, nel 71.4% a gentamicina, nel 28.5% a trimetoprim/sulfametossazolo e nel 14.2% ad amikacina.

I valori di MIC per i carbapenemi sono risultati compresi tra 1 $\mu\text{g/ml}$ e 8 $\mu\text{g/ml}$ (Tabella 1). Dall'analisi PFGE eseguita su 5/7 isolati è emerso che 4/5 di questi, provenienti da tre reparti differenti (unità risveglio, cardiologia, cardiologia riabilitativa) mostravano clonalità (Figura I).

CONCLUSIONI

La colistina rappresenta attualmente uno dei pochi antimicrobici attivi nei confronti di ceppi di *K. pneumoniae* MDR produttori di carbapenemasi. Tale antibiotico è pertanto frequentemente utilizzato, spesso in associazione con i carbapenemici, per il trattamento di infezioni gravi causate da ceppi MDR.

Un eccessivo o inadeguato uso di tale antibiotico può tuttavia determinare, in pazienti critici, l'insorgenza di ceppi resistenti alla colistina in corso di terapia (1).

L'emergere di una tale resistenza tra i ceppi KPC-Kp può annullare le opzioni terapeutiche.

I risultati sottolineano la diffusione di almeno due differenti cloni di *K. pneumoniae* KPC-produttori e COL resistenti in una struttura di riabilitazione del Nord Italia.

I risultati di tipizzazione molecolare hanno inoltre confermano l'elevato potenziale epidemico di un clone KPC-Kp COL resistente, diffusosi presso tre differenti reparti.

Il rafforzamento di misure igieniche mirate alla

prevenzione/contenimento può contribuire efficacemente, soprattutto all'interno di alcune tipologie di strutture a rischio quali quelle di riabilita-

zione/lungodegenza, a limitare la diffusione di ceppi problematici dal punto di vista clinico/epidemiologico qui segnalati.

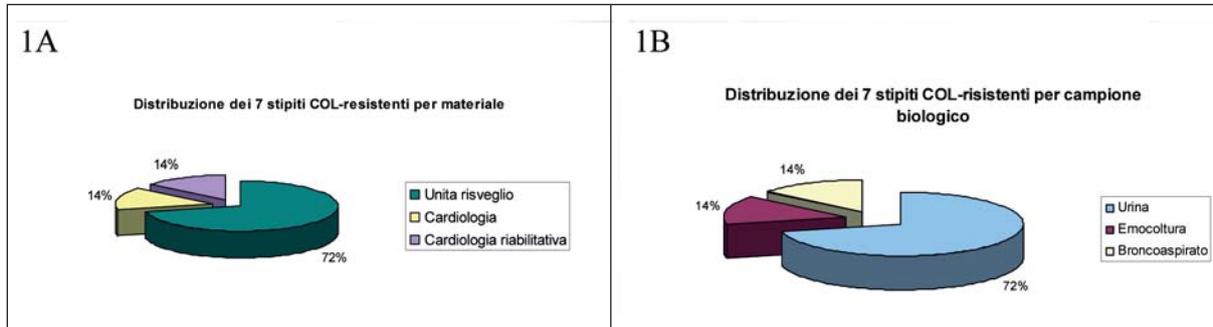


Grafico 1A e 1B. Distribuzione percentuale dei 7 stipiti COL-resistenti per materiale (1A) e campione biologico (1B).

Tabella I. Valori di MIC degli isolati *K. pneumoniae* in studio. L'interpretazione delle MIC (S, I, R) è in accordo ai breakpoint clinici EUCAST (Tabella V. 1.3, 2011-01-05). Antibiotici testati: imipenem (IMP), meropenem (MEM), ertapenem (ETP), amikacina (AK), gentamicina (CN), levofloxacina (LEV), ciprofloxacina (CIP), tigeciclina (TGC) and tobramicina (TO).

<i>K. pneumoniae</i>	Data isolamento	MIC (µg/ml)/ (S, I, R)									
		AK	CIP	COL	ERT	IMP	MEM	FOS	GM	TIGE	TO
KI 40 MG 11	24/01/2001	>16 R	> 1 R	> 2 R	> 1 R	> 8 R	> 8 R	≤ 32 S	> 4 R	1 S	> 4 R
KI 51 MG 11	04/04/2011	>16 R	> 1 R	> 2 R	> 1 R	8 I	8 I	≤ 32 S	≤ 2 S	1 S	> 4 R
KI 52 MG 11	05/04/2011	>16 R	> 1 R	> 2 R	> 1 R	> 8 R	> 8 R	≤ 32 S	≤ 2 S	1 S	> 4 R
KI 53 MG 11	09/05/2011	≤ 8 S	> 1 R	> 2 R	> 1 R	> 8 R	> 8 R	> 32 R	> 4 R	2 I	> 4 R
KI 54 MG 11	27/06/2011	16 I	> 1 R	> 2 R	> 1 R	> 8 R	> 8 R	≤ 32 S	≤ 2 S	0,5 S	> 4 R
KI 56 MG 11	30/06/2011	>16 R	> 1 R	> 2 R	> 1 R	> 8 R	> 8 R	≤ 32 S	≤ 2 S	1 S	> 4 R
KL 58 MG 11	07/07/2011	>16 R	> 1 R	> 2 R	> 1 R	> 8 R	> 8 R	≤ 32 S	≤ 2 S	1 S	> 4 R

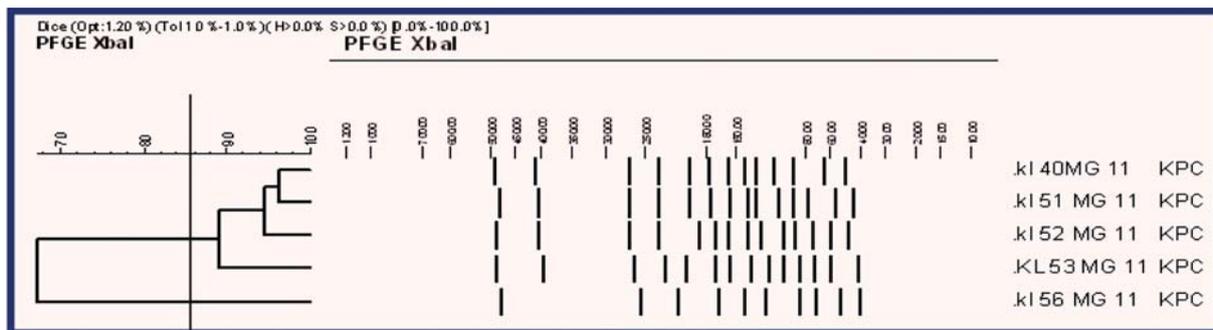


Figura I. Profili PFGE di cinque isolati di KPC-Kp colistina-resistenti dopo digestione con XbaI. La comparazione fra i profili è stata eseguita mediante software Fingerprinting II versione 3.0 (Bio-Rad).

BIBLIOGRAFIA

1. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59: 786–790
2. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Version 1.3, 5 Jan 2011. 5-Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA
3. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national

4. 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
5. Urban C., Bredford PA, Tukman M et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* harbouring *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase beta-lactamases associated with long term care facilities. *Clinical Infectious Diseases* 2008; 46: 127-30
6. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, et al. Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Infectious Diseases* 2011. 53 (6): 532-540.

ERRATA CORRIGE

Colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from a high specialization rehabilitation facility

Roberta Migliavacca¹, Viola Repetto¹, Aurora Piazza¹, Elisabetta Nucleo¹, Elisabetta Abbaneo², Silvana Telecco², Antonella Navarra², Laura Pagani¹

¹ Sezione di Microbiologia, Dipartimento S. M. E. C., Università di Pavia, Pavia

² Laboratorio di Microbiologia, I.R.C.C.S. Fondazione "Salvatore Maugeri", Pavia

MM 2012; 27 (1): 42

SUMMARY

Riga 16, "gentamincin" sostituisce "gentamicina"

Most of these strains were from urine (5/7); the remaining 2/7 were from blood and bronco-alveolar lavage. The 85.7% of the strains showed susceptibility to tigecycline and fosfomicin; 71.4% only to gentamicin, 28.5% to trimethoprim/sulfamethoxazole and 14.2% to amikacin.

MM 2012; 27 (1): 44

BIBLIOGRAFIA

nel riferimento nr. 2 eliminare **Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA**

2. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Version 1.3, 5 Jan 2011. 5