

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

**DOTTORATO DI RICERCA IN AMBIENTE,
PREVENZIONE E MEDICINA PUBBLICA
(Coordinatore: Prof. Claudio Buccelli)**

**TESI DI DOTTORATO
(IV ANNO XVII CICLO)**

**Epidemiologia molecolare di *Klebsiella pneumoniae* produttore di beta-lattamasi
ad ampio spettro (ESBL) circolante in una Terapia Intensiva Neonatale.**

Coordinatore:

Prof. Claudio Buccelli

Dottorando:

Dott. Bagattini Maria

Introduzione

Le infezioni nosocomiali rappresentano un problema di notevole importanza essendo una tra le principali cause dell'aumento della morbilità e mortalità ospedaliera e dei costi gestionali. In uno studio di prevalenza (EPIC study), condotto in un solo giorno in 1417 ICU in Europa occidentale, con più di 10.000 pazienti ricoverati, la prevalenza di infezioni acquisite durante l'ospedalizzazione è risultata del 21% (1). Le ICU sono senz'altro i reparti con il più alto tasso di infezioni (1), ciò in relazione a molteplici fattori legati all'ospite (immunodepressione, insufficienza d'organo acuta e cronica, coma, malnutrizione, prolungato ricovero, ipotensione, acidosi metabolica, diabete, prematurità, età avanzata), all'ambiente (mani del personale, strumenti non sterili, guanti non cambiati, circuiti, reservoirs, nebulizzatori contaminati) ed alla terapia (sedazione, cortisone e citotossici, interventi prolungati, uso prolungato ed inappropriato di antibiotici, uso di antiacidi con aumento della colonizzazione da bacilli G-)(2).

Sono stati messi a punto protocolli di sorveglianza attiva basati sul monitoraggio microbiologico dei pazienti ricoverati e degli ambienti allo scopo di individuare i soggetti con maggiori probabilità di contrarre infezioni, descrivere nel tempo l'incidenza di tali

infezioni, evidenziare eventuali epidemie, individuare serbatoi e meccanismi di trasmissione, intraprendere una terapia antibiotica mirata e valutare l'efficacia degli interventi di sanificazione (3).

Negli ultimi anni, nonostante siano stati compiuti notevoli passi avanti nella conoscenza dei fattori di rischio e delle misure di prevenzione e controllo, l'incidenza delle infezioni ospedaliere non si è ridotta e nuovi patogeni multiresistenti hanno assunto un ruolo sicuramente più rilevante (4,5,6). Tra i patogeni multiresistenti, i gram negativi tra cui le *Enterobacteriaceae*, hanno assunto un ruolo preminente nella eziologia di molte delle infezioni ospedaliere, tra cui le polmoniti tardive (late-onset). Le *Enterobacteriaceae* rappresentano circa il 50% di tutti i batteri di isolamento clinico e l'80% dei bastoncelli Gram-, sono vastamente distribuite nell'ambiente, rappresentano una componente importante del normale microbiota residente intestinale e sono frequentemente responsabili di una vasta gamma di infezioni. La loro resistenza agli antibiotici varia a seconda del genere e spesso della specie, ma un dato comune a molte *Enterobacteriaceae* è l'acquisizione di una resistenza sempre maggiore per la pressione selettiva conseguente all'impiego clinico di questi farmaci.

La resistenza ai β -lattamici iniziò già pochi anni dopo la scoperta della penicillina per la produzione di un enzima in grado di idrolizzare l'anello β -lattamico (7). Oggi le β -lattamasi rappresentano di gran lunga il meccanismo di resistenza più importante nelle *Enterobacteriaceae*, anche se il livello di resistenza conferito dipende spesso non solo dall'interazione enzima-substrato ma anche dalla capacità di quest'ultimo di raggiungere in quantità più o meno elevate lo spazio periplasmico e quindi, in ultima analisi, dalla permeabilità della membrana esterna batterica. La maggior parte delle *Enterobacteriaceae* produce β -lattamasi cromosomiche in quantità variabile, in modo costitutivo o inducibile, con significative differenze in relazione al genere ed alla specie in causa. Durante gli ultimi anni l'epidemiologia delle resistenze ai β -lattamici ha presentato sostanziali modifiche per la comparsa di nuovi enzimi codificati anche da plasmidi che minacciano l'efficacia delle cefalosporine di terza e quarta generazione nei confronti delle *Enterobacteriaceae* (8,9).

Tra le *Enterobacteriaceae* *Klebsiella pneumoniae* è uno dei principali patogeni nosocomiali, capace di rapida diffusione in ambito ospedaliero. Negli ultimi anni si è osservato un incremento delle infezioni da *K.pneumoniae* ed in letteratura sono stati

descritti severi focolai epidemici soprattutto nelle degenze neonatali (10-14). Alla nascita i neonati sono privi del normale microbiota intestinale, ma la colonizzazione da *K.pneumoniae* diviene rapidamente prevalente soprattutto in quelli ospedalizzati (15). Nelle aree ad alto rischio, la colonizzazione da *K.pneumoniae* è spesso seguita da infezioni sostenute sempre da questo germe (13). Tali infezioni sono difficili da trattare poiché tali microrganismi sono resistenti oltre che ai beta lattamici ed alle cefalosporine a spettro esteso (CSE) anche ad altre classi di antibiotici quali gli aminoglicosidi. La resistenza della *K.pneumoniae* alle CSE fu descritta per la prima volta nel 1980, con un incremento di questo fenomeno a partire dal 1986 (16). La produzione di beta lattamasi a spettro esteso (extended spectrum-beta-lactamases o ESBL) è considerato il principale meccanismo molecolare responsabile della resistenza alle CSE. La maggior parte dei cloni epidemici di *K.pneumoniae* responsabili di focolai epidemici sono risultati essere produttori di ESBL (10-14,16).

Nel 1996 nella Terapia Intensiva Neonatale (TIN) dell'Azienda Ospedaliera Universitaria "Federico II" di Napoli si sviluppò un focolaio epidemico causato da *K.pneumoniae* produttore di beta-lattamasi a spettro esteso (14). A distanza di alcuni anni, tra Settembre

del 2002 e Dicembre del 2004, nello stesso reparto si è osservata nuovamente la circolazione di *K.pneumoniae* produttore di ESBL. Lo scopo di questa tesi è stato quello di: a) valutare l'epidemiologia molecolare delle colonizzazioni e delle infezioni da *K.pneumoniae* produttore di ESBL; b) stabilire se l'aumentata circolazione di tale microrganismo è da ricondurre ad un unico clone endemico o epidemico; c) studiare l'epidemiologia molecolare e la diffusione delle ESBL nei diversi isolati di *K.pneumoniae*; d) identificare i fattori che hanno contribuito alla selezione della *K.pneumoniae* produttore di ESBL, in tale reparto.

Materiali e Metodi

Procedure di sorveglianza.

Per la sorveglianza delle infezioni ospedaliere il personale del DAS di Igiene si reca settimanalmente presso il reparto di TIN per lo studio delle cartelle cliniche dei piccoli pazienti. I dati raccolti riguardano il peso alla nascita, la ventilazione (libera o assistita), la durata della degenza, le eventuali infezioni (diagnosticate in accordo con i criteri del CDC adattati alla patologia neonatale) (17), la sede ed il microorganismo isolato, la terapia antibiotica. I dati raccolti vengono elaborati secondo i criteri dell'National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) (18) e comunicati al reparto come report mensile. Presso il laboratorio di Microbiologia del DAS di Igiene Ospedaliera vengono settimanalmente analizzati i tamponi faringei, nasali e rettali dei pazienti ricoverati in TIN per valutare le colonizzazioni da patogeni sentinella e correlarle con le eventuali infezioni.

Ceppi batterici.

Tra settembre 2002 e dicembre 2004 sono stati isolati dai tamponi di sorveglianza e dai campioni clinici (emoculture, urine, broncoaspirati) 252 ceppi di *K.pneumoniae* produttori di ESBL ed un solo ceppo di *K.pneumoniae* negativo per le ESBL. Nello

studio sono stati inclusi anche due ceppi di *K.pneumoniae* produttori di ESBL isolati durante il focolaio epidemico sviluppatosi in TIN durante il 1996, descritto in un precedente lavoro (14). Durante il periodo epidemico sono stati eseguiti campionamenti ambientali mediante tamponcini imbevuti in brodo di arricchimento colturale (Brain Hearth Infusione Broth), per monitorare lavandini, incubatrici, carrelli dei farmaci e del latte, bilance e tiralatte. Per tutte le altre superfici quali pavimenti, pareti e per l'aria sono state impiegate piastre Rodac con terreni selettivi. Le identificazioni di tutti i ceppi di *K.pneumoniae* sia clinici che ambientali, sono state effettuate mediante sistema manuale API E (Biomerieux Marcy-L'Etoile, France). I ceppi sono stati successivamente stoccati a -80C° in soluzione di glicerolo per la successiva tipizzazione fenotipica e molecolare.

Saggio di sensibilità in vitro.

Il saggio di sensibilità in vitro per la caratterizzazione fenotipica è stato eseguito mediante il metodo della diffusione in agar Muller-Hinton (Kirby-Bauer) in accordo con le linee guida del National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS (19). Sono stati saggiati gli antibiotici qui di seguito riportati: Amoxicillina (10µg), Amoxicillina/Acido Clavulanico (20/10 µg), Amikacina (30 µg), Aztreonam (30 µg),

Cefoxitina (30 µg), Cefotetan (30 µg), Cefotaxime (30 µg), Ceftazidime (30 µg), Ceftriaxone (30 µg), Cefepime (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Gentamicina (10 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Netilmicina (30 µg), Ticarcillina/Acido clavulanico (75/10 µg), Kanamicina (30 µg). Anche l'interpretazione dei risultati in sensibile, intermedio o resistente è stata effettuata in accordo con i criteri stabiliti dal NCCLS (19).

Saggio delle beta lattamasi.

La produzione delle beta lattamasi è stata inizialmente valutata mediante il metodo del doppio disco per evidenziare il sinergismo tra l'inibitore delle β -lattamasi e le ossimino cefalosporine o l'aztreonam. Il dischetti di Amoxicillina/Acido Clavulanico (20/10 µg) (Oxoid), sono stati usati come inibitori. Il dischetto inibitore è stato posizionato al centro di un piastra di Muller-Hinton e a 22,5 mm di distanza gli antibiotici (ossimino cefalosporine e aztreonam).L'Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) è stato scelto come test di conferma (strip contenenti cefotaxime/cefotaxime- acido clavulanico e ceftazidime/ceftazidime acido clavulanico) (20), mentre *Escherichia coli* ATCC 25922,

controllo negativo e *K. pneumoniae* ATCC 700603, controllo positivo, sono stati impiegati nei vari test come ceppi di riferimento.

Analisi del punto isoelettrico (Isoelectric focusing IEF).

Per analizzare il punto isoelettrico sono state allestite sospensioni di *K. pneumoniae* in 2,5 ml di brodo di coltura (BHIB). Dopo 18 ore di incubazione a 37°C tale inoculo è stato diluito con 47,5 ml di brodo fresco e nuovamente incubato per altre tre ore. La sospensione è stata centrifugata e le cellule risospese in 5mM di tampone fosfato a pH 7,4 contenete anche 0,5% di Triton e 4M di Urea, in presenza di un cocktail di inibitori delle proteasi. Gli enzimi intracellulari sono stati quindi rilasciati mediante trattamento con ultrasuoni.

Il punto isoelettrico è stato determinato mediante Ampholine®PAGplates pH 3.5-9.5 (Amersham BioSciences). Gli elettrodi sono stati collocati in soluzione 0.5 M H₃PO₄ (anodo) e 0.5 M NaOH (catodo). La corsa è stata allestita in una camera Multiphor. I campioni sono stati posizionati ad un terzo della distanza tra catodo ed anodo. La corsa è stata allestita a 15 C°, ad un voltaggio costante di 1700V per 1 ora e 45 minuti. Al termine della corsa il gel è stato impregnato di una soluzione contenente Nitrocefin, per

evidenziare le beta lattamasi e successivamente colorato con Crocein Scarlet e Comassie Blue per la determinazione delle proteine standard da individuare come punto isoelettrico di calibrazione (Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, U.S.A.).

Esperimenti di coniugazione.

Gli esperimenti di coniugazione sono stati eseguiti secondo protocolli già descritti (21).

Un mutante spontaneo di E.coli J53 (F2 *met pro*) resistente alla sodio azide a concentrazioni di 250 µg per ml (J53 Azir) è stato utilizzato come accettore per esperimenti di trasferimento delle resistenze (21). Sono state allestite sospensioni batteriche in BHIB rispettivamente del donatore e dell' accettore tenute in crescita per 3 ore a 37°C. Il brodo di coniugazione è stato allestito con un rapporto donatore/accettore di 1:10 e successivamente incubato a 37°C per 18 ore.

Dopo l'incubazione i batteri in sospensione sono stati trasferiti su terreno solido (MacConkey) contenente ampicillina (100 µg/ml) o ceftriaxone (16 µg/ml) + sodio azide (100 µg/ml) e nuovamente posti in crescita per 24 ore a 37°C. Al termine della coniugazione, per stabilire il numero dei donatori e degli accettori, diluizioni appropriate delle cellule sono state trasferite mediante filtri su piastre di terreno di accrescimento

(BHIA) in presenza di ogni singolo antibiotico selettivo:ampicillina per i donatori e sodio azide per le cellule recipienti. La frequenza di coniugazione è stata calcolata come rapporto tra il numero di transconiuganti ed accettori rimasti. I potenziali trasconiuganti sono stati subcoltivati su BHIA e successivamente stoccati a -80°C per la successiva caratterizzazione fenotipica e molecolare.

Tipizzazione molecolare mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) ed analisi del dendrogramma.

Dopo la preparazione del DNA genomico, la restrizione molecolare è stata eseguita mediante l'enzima *XbaI* a 37°C per 6 ore (22). Il gel dopo la corsa su CHEF-DRII system (Bio Rad Laboratories, Inc.,Hercules, CA, U.S.A.) è stato colorato con etidio bromuro e successivamente fotografato e acquisito su TIFF files in Adobe Photoshop. Per stabilire se i genomi analizzati appartenevano allo stesso clone, è stato utilizzato un programma di analisi computerizzato (GelCompare 3.5). La comparazione dei genomi è stata effettuata a gruppi di due secondo medie aritmetiche (UPGMA unweighted pair group method with arithmetic averages).L'indice di DICE è stato invece utilizzato per analizzare la similitudine tra le bande (23). Per valutare l'omologia tra i vari genomi,

sono stati impiegati i criteri di Tenover (24). Ceppi con identico pattern di PFGE (coefficiente di similarità del 100%) sono stati considerati isogenici, quelli con più di tre bande di DNA differenti ed una percentuale di similarità <al 85% all'analisi del dendrogramma, sono stati considerati come appartenenti a differenti profili genotipici.

Amplificazione genica mediante PCR

La preparazione del DNA genomico è stata effettuata utilizzando il kit di purificazione Wizard® Genomic DNA (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.); per il DNA plasmidico il Wizard® Plus SV minipreps DNA purification system (Promega Corporation, Madison, WI, U.S.A.). L'amplificazione dei geni SHV, TEM e CTX che codificano per la resistenza agli antibiotici beta-lattamici, è stata eseguita mediante esperimenti di PCR (25,26). In tabella 1 sono elencati i primers degli oligonucleotidi disegnati per l'amplificazione dei geni che codificano le più frequenti ESBL di *K.pneumoniae*.

Sequenziamento ed analisi computerizzata della sequenza.

Gli amplificati sono stati purificati dal gel di agarosio mediante estrazione in fenolo/cloroformio e precipitazione in etanolo. Il sequenziamento degli amplificati è

stato effettuato mediante ABI PRISM^R BigDyeTM Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). I primer delle sequenze *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}, TEM 1- TEM 5, SHV 1,-SHV 4, sono indicati in TAB.1.

L'analisi successiva è stata eseguita attraverso Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e le sequenze ritrovate confermate mediante tre esperimenti di PCR. Per calcolare il pI di TEM-136 è stato utilizzato Mac Vector software (Accelrys,Cambridge,UK).

Sequenze nucleotidiche depositate.

Le sequenze nucleotidiche di SHV-1, TEM-136, beta-lattamasi prodotte dal ceppo 403 di *K. pneumoniae*, e la sequenza di SHV-12 prodotta dal ceppo 2183 di *K.pneumoniae* sono state depositate presso il nucleotide database della GenBank con i seguenti numeri di accesso: no. AY826416, AY826417, AY826418.

Risultati.

Epidemiologia molecolare delle colonizzazioni e delle infezioni da K. pneumoniae produttore di ESBL

Tra Settembre 2002 e Dicembre 2004 è stata studiata l'epidemiologia molecolare delle *K. pneumoniae* circolanti nel reparto di Terapia Intensiva Neonatale, periodo in cui era stato osservato un aumento degli isolati clinici di *K. pneumoniae* produttore di ESBL.

Nel periodo analizzato il numero totale di infezioni acquisite è risultato di 111 casi con 103 neonati infetti. Gli Stafilococchi coagulasi negativi sono stati i germi implicati nel maggior numero di infezioni (20.7%) seguiti da *K. pneumoniae* produttore di ESBL (17.1%), da *Candida albicans* (10,8%) e da *Escherichia coli* (9.9%). Nel 12,6% dei bambini infetti non è stato possibile isolare il microrganismo responsabile. *K. pneumoniae* produttore di ESBL ha determinato 19 infezioni (3 sepsi, 2 polmoniti, 11 infezioni del tratto urinario, 3 infezioni oculari) (Fig.1).

Tra settembre 2002 e dicembre 2004 sono stati posti sotto sorveglianza attiva 554 pazienti mediante lo studio dei tamponi faringei, nasali e rettali. Il 42,1% dei pazienti

sorvegliati (233) sono risultati colonizzati da *K. pneumoniae* produttore di ESBL, con percentuale maggiore di isolamento nel tampone rettale (47,4%) seguito da quello faringeo (35,5%) e da quello nasale (26,4%) (Fig.1). Grazie all'analisi dei tamponi di sorveglianza è stato possibile isolare anche Stafilococchi coagulasi negativi (84.4%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,3%) e *Candida albicans* (7%). Il focolaio epidemico è stato seguito fino al Gennaio 2005, periodo della dimissione dell'ultimo paziente colonizzato da *K. pneumoniae* produttore di ESBL (fig.1).

Per stabilire se l'aumentato isolamento di *K. pneumoniae* produttore di ESBL nel periodo in questione potesse essere ricondotto alla diffusione di un unico clone epidemico, è stato analizzato il genotipo di tutti gli isolati clinici di *K. pneumoniae* mediante PFGE ed analisi del dendrogramma.

Poiché nel 1996 si era sviluppato un focolaio epidemico nello stesso reparto causato sempre da *K. pneumoniae*, sono stati analizzati anche due ceppi del pregresso clone.

Tramite la PFGE sono stati identificati 3 cloni principali definiti A, B e C con percentuale di similarità <60% (FIG.2). Di questi il pattern di PFGE definito A era comune ai due isolati clinici del 1996 scelti per l'analisi, mentre i cloni B e C sono stati i cloni prevalenti

tra Settembre 2002 e Dicembre 2004 (isolati rispettivamente da 81 e da 152 pazienti). Grazie all'analisi molecolare è stato possibile collocare questi ultimi due cloni epidemici in due periodi temporali ben definiti: il clone B infatti è stato isolato tra Settembre 2002 e Dicembre 2003, il clone C tra Ottobre 2003 e Dicembre 2004 (Fig.1). Inoltre i due cloni epidemici si sono anche sovrapposti tra Ottobre 2003 e Dicembre 2003 (Fig.1). Tali cloni epidemici hanno comunque mostrato una differente virulenza. Infatti il clone B è stato responsabile di 10 infezioni e 72 colonizzazioni, il clone C di 9 infezioni e 143 colonizzazioni. Va inoltre ricordato che è stato possibile isolare i due cloni dal retto e dal faringe di uno dei pazienti colonizzati.

Per poter stabilire le fonti ed i serbatoi responsabili del contagio, tra Novembre 2003 e Marzo 2004, sono stati effettuati controlli straordinari di sanificazione con campionamento dell'aria e di diverse superfici, oltre alle mani del personale.

Sono state isolate *K. pneumoniae* ESBL+ con profilo C di PFGE da 3 lavabi e dalle superfici di tre stanze oltre che dalle incubatrici e dalle mani di una nurse. Durante il focolaio epidemico sono state adottate una serie di misure di controllo come una più scrupolosa attenzione nel lavaggio delle mani soprattutto dopo il contatto con il paziente

e nell'uso dei guanti. Inoltre si è provveduto anche all'isolamento dei neonati infetti e colonizzati. A ciò è seguito un intenso programma educativo basato sulla diffusione tra il personale della TIN dei risultati degli antibiogrammi e della tipizzazione molecolare, su di una maggiore adesione alle norme di igiene (lavaggio delle mani e uso di guanti), sull'utilizzo di un appropriata terapia per i neonati infetti da *K. pneumoniae* produttore di ESBL.

Profilo di antibiotico sensibilità dei diversi cloni epidemici di K.pneumoniae produttore di *ESBL*.

Il saggio di sensibilità in vitro ha evidenziato per tutti e tre i cloni epidemici A, B e C, la resistenza alle aminopenicilline, ureidopenicilline, monobattamici, cefalosporine di terza generazione e penicilline associate all'acido clavulanico. Tutte e tre i cloni risultavano invece sensibili alle cefalosporine di seconda generazione, a quelle di quarta generazione ed ai carbapenemi. Inoltre tutti e tre i cloni erano sensibili anche ai fluorochinoloni ed all'amikacina ma resistenti alla kanamicina ed alla netilmicina. E' interessante sottolineare che mentre il clone A risultava sensibile alla gentamicina, i cloni B e C, che mostravano un identico antibiotipo, erano invece resistenti.

Analisi fenotipica e molecolare delle beta-lattamasi.

Tutti i ceppi epidemici di *K. pneumoniae* isolati in TIN durante il 1996 e tra Settembre 2002 e Dicembre 2004 sono risultati positivi allo screening per le ESBL (test del doppio disco) ed al test di conferma E-test. Come mostrato in tabella 3, l'E-test eseguito sugli isolati del 1996 (clone A), mostra una Minima Concentrazione Inibente (MIC) di 1,5 µg/µl e 0,023 µg/µl per cefotaxime e cefotaxime/ac.clavulanico, con un rapporto cefotaxime/cefotaxime/ac.clavulanico di 46 ed una Minima Concentrazione Inibente (MIC) per ceftazidime, ceftazidime/ac.clavulanico, rispettivamente maggiore di 32 µg/µl e di 0,125 µg/µl con un rapporto di ceftazidime, ceftazidime/ac.clavulanico maggiore di 256. Si è osservato inoltre per il clone A, per entrambe le strip, la presenza della Phantom zone. Per i cloni B e C è stato possibile evidenziare un profilo simile all'Etest con valori di MIC superiore a 16 e a 0,023-0,047 per cefotaxime e cefotaxime/ac.clavulanico, con un rapporto cefotaxime/cefotaxime/ac.clavulanico di 340 e 695 ed una Minima Concentrazione Inibente (MIC) per ceftazidime, ceftazidime/ac.clavulanico,

rispettivamente maggiore di 32 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e di 0,125–0,19 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con un rapporto di ceftazidime, ceftazidime/ac.clavulanico di 168 e 256.

Per identificare gli enzimi responsabili dell'attività beta lattamasica è stato analizzato il profilo molecolare mediante IEF e mediante PCR. L'analisi del profilo isoelettrico ha evidenziato nel clone A due bande con punto isoelettrico tra 5.5 e 7.6, mentre per i cloni B e C sono state evidenziate due bande con pI di 5.4 e 8.3 (Tabella 3). Grazie alla PCR è stata amplificato un gene *bla*_{TEM} nel DNA cromosomico di tutti e tre i cloni epidemici e nel DNA plasmidico dei cloni B e C ed il gene *bla*_{SHV} nel DNA plasmidico di tutti e tre i differenti cloni epidemici. La sequenza CTX non è stata amplificata in nessuno dei tre cloni. L'analisi della sequenza ha identificato un nuovo enzima TEM nel clone epidemico A ed un enzima TEM-1 nei cloni B e C. La nuova sequenza è stata designata TEM-136 (<http://www.lahey.org/studies/webt.htm>) e mostra le seguenti sostituzioni rispetto a TEM-1 secondo la numerazione di Ambler (27): una serina alla posizione 164, una treonina alla posizione 237, una lisina alla posizione 240 ed una glicina alla posizione 268. Per TEM-136, le sostituzioni ai residui 164, 237 e 240 sono identiche a quelle riscontrate in un'altra beta-lattamasi TEM-5. Sostituzioni in corrispondenza di analoghi

residui sono stati riscontrati anche in altri enzimi TEM mentre, sostituzioni di una glicina alla posizione 268, è stata descritta solo in TEM-49. E' interessante sottolineare che le sostituzioni di una serina in posizione 164 e di una lisina alla posizione 240 conferiscono attività beta-lattamasi in TEM-5 e TEM-10 (16,28)

Il punto isoelettrico dell'enzima TEM-136, calcolato sulla base della sequenza, corrisponde esattamente a quello ottenuto mediante IEF. L'analisi della sequenza del gene amplificato *bla_{SHV}*, ha identificato un enzima SHV-1 nel clone A ed un SHV-12 nei cloni B e C. Questo ultimo mostra le seguenti sostituzioni rispetto ad SHV-1 secondo la numerazione di Ambler (27): una aminoacido glutammina alla posizione 35, una serina alla posizione 238 ed una lisina alla posizione 240. Le due ultime mutazioni conferiscono attività beta-lattamasi a spettro esteso. Due sostituzioni silenti sono state inoltre osservate nella sequenza nucleotidica di SHV-1 del clone A. Per dimostrare se l'attività beta-lattamasi fosse trasferibile, i tre cloni di *K. pneumoniae*, sono stati coniugati con un ospite *E. coli*, selezionato per la resistenza al ceftriaxone. E' stata dimostrata l'avvenuta coniugazione per i cloni B e C rispettivamente con una frequenza significativa pari a 4×10^{-6} and 1×10^{-6} UFC/cellule accettrici. Mediante PCR e successiva analisi

della sequenza è stata dimostrata la presenza degli alleli di SHV-12 e TEM-1 nel DNA plasmidico dei transconiuganti ceftriaxone-resistenti. Non sono stati ottenuti transconiuganti tra il ceppo di *K. pneumoniae* del clone epidemico A e l' *E.coli* accettore selezionato per la resistenza al ceftriaxone.

Discussione

K. pneumoniae, produttore di beta-lattamasi ad ampio spettro, è tra i germi che più comunemente causano focolai epidemici soprattutto nei reparti di Terapia Intensiva (10,14,15,25). Presso la TIN dell'AOU da marzo ad ottobre del 1996 si sviluppò un focolaio epidemico, responsabile di 27 infezioni (12 sepsi, 9 infezioni urinarie, 3 polmoniti e 3 cutanee) e 51 colonizzazioni (14). Tra settembre 2002 e dicembre 2004 si è sviluppato un nuovo focolaio epidemico descritto nella tesi della durata di 28 mesi. Dei 554 neonati sottoposti a sorveglianza attiva tra Settembre 2002 e dicembre 2004, 233 (42,1%) sono risultati colonizzati da *K. pneumoniae*, produttore di ESBL e diciannove dei 233 bambini colonizzati hanno sviluppato infezione. Sebbene *K. pneumoniae* produttore di ESBL è stato la seconda causa di infezione nel reparto, la colonizzazione nel periodo di studio è da considerare endemica. Questo in accordo con diversi studi che dimostrano che la colonizzazione da *K. pneumoniae* o da *K. pneumoniae* produttore di ESBL è molto frequente (13,15) e che quest'ultima è da considerare un prerequisito all'infezione (13).

La caratterizzazione molecolare degli isolati clinici di *K. pneumoniae*, ha dimostrato che l'epidemia è stata determinata dalla diffusione di due distinti cloni, uno subentrante l'altro, entrambi diversi dal clone isolato nel 1996. Sono state riscontrate differenze nella virulenza tra i cloni epidemici con un rapporto tra colonizzati ed infetti di 7,2:1 per il clone B e di 15,9:1 per il fenotipo C. E' interessante notare come il rapporto tra colonizzazione-infezione riscontrato per il clone C di *K. pneumoniae*, sia uguale (16:1) a quello osservato da altri autori (13). Grazie ai controlli straordinari di sanificazione, sono state individuate le possibili sorgenti di infezione: lavandini, incubatrici e soprattutto le mani delle vigilatrici che per il secondo clone epidemico sono state indicate come possibile veicolo di trasmissione orizzontale da un paziente all'altro. A supporto di questa ipotesi vi è la dimostrazione che anche in altri reparti di Terapia Intensiva sono stati isolati identici cloni nei neonati infetti e sulle mani del personale (11,28). Numerosi studi indicano che ceppi epidemici di *K.pneumoniae*, responsabili di infezioni nosocomiali, vengono selezionati grazie al loro fenotipo resistente (10-14,22,24,29). In accordo con tali dati vi è l'analisi dell'antibiotipo che mostra per tutti e tre i cloni epidemici resistenza alle aminopenicilline, ureidopenicilline, monobattamici,

cefalosporine di terza generazione e penicilline associate all'acido clavulanico. Durante l'outbreak, i pazienti considerati più a rischio di infezione, sono stati trattati empiricamente con ampicillina e gentamicina. Tale terapia avrebbe contribuito alla selezione dei cloni nel reparto. A supporto di tale ipotesi ricordiamo che i cloni epidemici B e C sono resistenti alla gentamicina, mentre il clone A, isolato nel 1996, era sensibile alla gentamicina quando la terapia empirica era basata sull'uso dell'ampicillina e della netilmicina. Sebbene non siano stati presi provvedimenti per cambiare l'approccio terapeutico empirico, è stata invece introdotta la terapia con meropenem per il trattamento dei bambini infetti. Ciò ha favorito il controllo dell'epidemia. A conferma di quanto detto, un recente studio eseguito in diversi paesi, ha dimostrato che la monoterapia con carbapenemi è il trattamento di scelta nella infezioni da *K. pneumoniae* produttore di ESBL (30).

Attraverso l'analisi molecolare sono state ottenute importanti informazioni anche dal punto di vista epidemiologico. Nel clone epidemico A sono state determinate, mediante analisi del punto isoelettrico, due beta-lattamasi con pI di 5,5 e di 7,6. Tali enzimi sono stati identificati come TEM-136 ed SHV-1 mediante PCR ed analisi della sequenza. I

cloni epidemici B e C, che presentano un identico antibiotipo, esprimono entrambi due beta-lattamasi con pI di 5,4 e 8,3 che sono state identificate come TEM-1 e SHV-12 mediante PCR ed analisi della sequenza. TEM-136 è stata identificata come beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL) del clone A, mentre SHV-12 come beta lattamasi ad ampio spettro (ESBL) dei cloni B e C. Infatti è stato già dimostrato che questo enzima è dotato di tale attività (16,31). Per l'enzima TEM-136 è opportuno ricordare che le sostituzioni ai residui 164 (serina al posto di arginina), 237 (treonina al posto dell'alanina) e 240 (lisina al posto dell'asparagina) sono identiche a quelle ritrovate nell'enzima TEM-5, dotato di attività a spettro esteso (16). Si ritiene quindi che anche TEM-136 abbia attività a spettro esteso. L'enzima TEM-136 prima non era stata identificato, ma TEM-5 e TEM-10, i due enzimi che con esso mostrano un'alta omologia, sono stati spesso associati a diversi focolai epidemici sia negli Stati Uniti che in Europa a partire già dal 1995 (16,29). E' interessante osservare che TEM-136, è la ESBL isolata nel 1996 in *K. pneumoniae* durante il primo focolaio epidemico, mentre SHV-12, che è stata isolata per la prima volta durante il 1997 (31), è quella maggiormente prevalente in Italia, dove è stata identificata in 70 su 108 isolati di *K. pneumoniae* produttori di ESBL durante il 1999

(32). La diffusione delle ESBL nei cloni epidemici potrebbe essere acquisita mediante trasferimento orizzontale o per selezione di un nuovo clone resistente. I dati riportati in questa tesi mostrano che la diffusione è stata determinata dalla selezione di un singolo clone epidemico produttore di TEM-136 durante il 1996 e di due diversi cloni, entrambi produttori di SHV-12 tra il 2002 ed il 2004. L'outbreak tra il 2002 e 2004 è stato sostenuto dalla disseminazione di SHV-12, tramite trasferimento orizzontale tra i due differenti cloni B e C. Infatti i due cloni epidemici di differente pattern di PFGE sono stati isolati contemporaneamente per tre mesi nel reparto. Inoltre il gene SHV-12 è stato amplificato dalla preparazione plasmidica di entrambi i cloni. Gli esperimenti di coniugazione hanno dimostrato che la resistenza alle cefalosporine di terza generazione, mediata dal gene SHV-12 è stata trasferita dai cloni epidemici B e C ad un accettore *E. coli* con una frequenza altamente significativa. Questo trova riscontro anche in altri lavori che dimostrano come la disseminazione di SHV-5 in un ospedale pediatrico del Messico è stata causata da una diffusione clonale con trasferimento orizzontale delle resistenze. Infatti, come descritto in letteratura ed in accordo con i nostri dati, i geni SHV-5 e SHV-

12 presenti all'interno di un grosso plasmide, possono essere trasferiti mediante esperimenti di coniugazione (12,31).

Conclusioni.

K. pneumoniae è responsabile di un gran numero di infezioni e di colonizzazioni nei reparti a rischio. L'uso di antibiotici betalattamici avrebbe selezionato il clone produttore di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL), mentre l'espansione di entrambi cloni ed il trasferimento orizzontale dei geni avrebbe contribuito alla diffusione degli enzimi di resistenza ESBL. Il frequente isolamento di *K.pneumoniae* produttore di ESBL in reparti ad alto rischio quali le Terapie Intensive Neonatali conferma l'importanza dei programmi di sorveglianza per il controllo e la prevenzione delle infezioni da microrganismi multiresistenti.

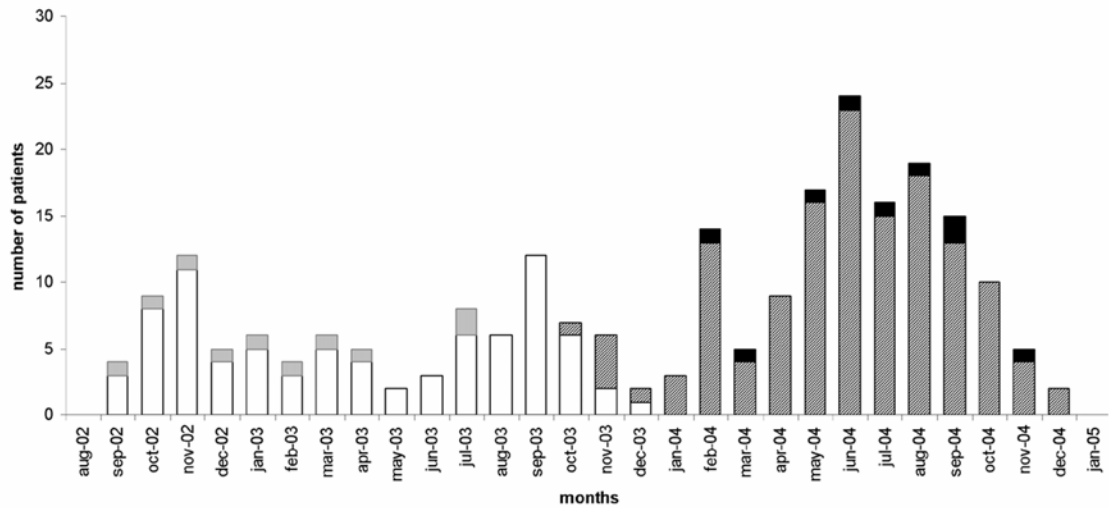


FIG. 1. Incidenza di *K. pneumoniae* produttore di beta-lattamasi a spettro esteso in TIN^a durante il periodo di studio. Le colonne bianche e grigie indicano i pazienti colonizzati ed infetti dal clone B. Le colonne contrassegnate in diagonale e quelle nere indicano i pazienti colonizzati ed infetti dal clone C.

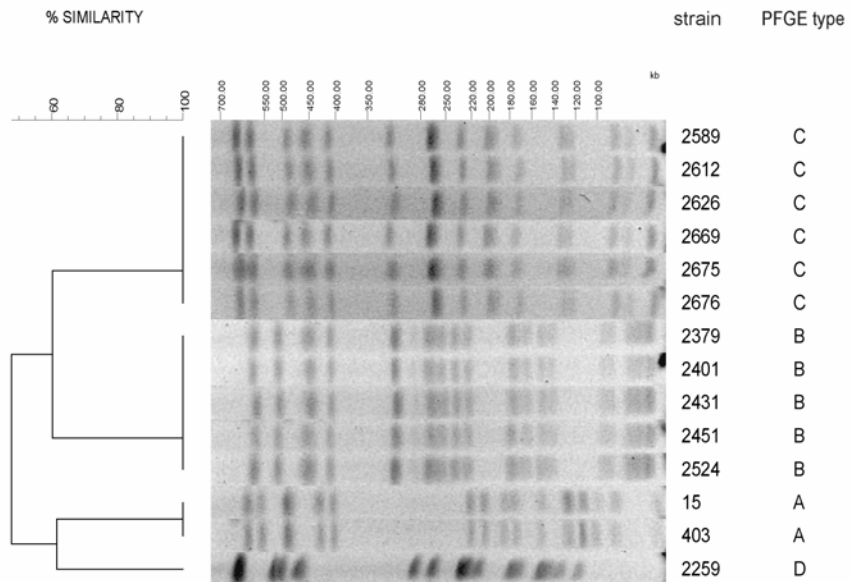


FIG. 2. Analisi genotipica dei ceppi di *K. pneumoniae* dopo restrizione con enzima *Xba*I.

Il dendrogramma è stato costruito sulla base della similarità alla PFGE e dell'analisi dei cluster mediante coefficiente di DICE e UPGMA con GelCompare 3.5 software. La percentuale di similarità è mostrata al di sopra del dendrogramma.

TABLE 1. Oligonucleotidi utilizzati per amplificazione mediante PCR ed analisi della sequenza

Primer name	Primer sequence	Location ^a	Reference
TEM 1	5'-ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G-3'	1-22	8
TEM 2	5'-TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G-3'	861-840	8
TEM 3	5'-TTC TGT GAC TGG TGA GTA CT-3'	324-305	This study
TEM 4	5'-GAG TAA GTA GTT CGC CAG TT-3'	595-576	This study
TEM 5	5'-GCA GGA CCA CTT CTG CGC T-3'	619-637	This study
SHV 1	5'-ATG CGT TAT ATT CGC CTG TG-3'	1-20	8
SHV 2	5'-GTT AGC GTT GCC AGT GCT CG-3'	865-846	8
SHV 3	5'-CTG CGC CGC AGA GCA CTA CT-3'	226-207	This study
SHV 4	5'-CAG CTG CTG CAG TGG ATG GT-3'	604-623	This study
CTX-M-1 up	5'-GGT TAA AAA ATC ACT GCG TC-3'	3-22	7
CTX-M-1 lw	5'-TTG GTG ACG ATT TTA GCC GC-3'	866-847	7
CTX-M-2 up	5'-ATG ATG ACT CAG AGC ATT CG-3'	1-20	7
CTX-M-2 lw	5'-TGG GTT ACG ATT TTC GCC GC-3'	871-852	7
CTX-M-9 up	5'-ATG GTG ACA AAG AGA GTG CA-3'	1-20	7
CTX-M-9 lw	5'-CCC TTC GGC GAT GAT TCT C-3'	870-852	7

^aOligonucleotide positions are numbered from the start of the enzyme-coding region.

TABLE 2. Profilo di antibiotico sensibilità dei cloni epidemici di *K. pneumoniae* circolanti in TIN^a

Antimicrobial agent	PFGE type		
	A	B	C
Amoxicillin	r	r	r
Amoxicillin/Clavulanic acid	r	r	r
Ticarcillin	r	r	r
Ticarcillin/Clavulanic acid	r	r	r
Cefoxitin	s	s	s
Cefotetan	s	s	s
Cefotaxime	r	r	r
Ceftriaxone	r	r	r
Ceftazidime	r	r	r
Cefepime	s	s	s
Aztreonam	r	r	r
Imipenem	s	s	s
Meropenem	s	s	s
Amikacin	s	s	s
Gentamicin	s	r	r
Kanamycin	r	r	r
Netilmicin	r	r	r
Ciprofloxacin	s	s	s

^aAbbreviazioni:TIN, terapia intensiva neonatale; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; s,sensibile; r, resistente. Antibiogramma eseguito mediante il metodo della diffusione in agar. Isolati intermedi sono stati refertati resistenti.

TABLE 3. Analisi molecolare delle beta-lattamasi nei cloni epidemici di *K. pneumoniae* isolati in TIN^a

PFGE type	MIC of drug ($\mu\text{g/mL}$) ^b						Isoelectric points	Beta-lactamase genes ^c	Conjugation frequency of ESBL activity
	CT	CTL	CT/	TZ	TZL	TZ/			
	CTL			TZL					
A	1.5*	0.023	46	>32*	0.125	256	5.5, 7.6	TEM-136 , SHV-1	-
B	>16	0.023	695	>32	0.125	256	5.4, 8.3	TEM-1, SHV-12	4×10^{-6}
C	>16	0.047	340	>32	0.19	168	5.4, 8.3	TEM-1, SHV-12	1×10^{-6}

^aAbbreviazioni: TIN, terapia intensiva neonatale; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; CT, cefotaxime; CTL, cefotaxime/acidoclavulanico; TZ, ceftazidime; TZL, ceftazidime/acido clavulanico.

^b L'asterisco indica la presenza della phantom zone.

Si ringrazia il Dott. George Jacoby, Lahey Clinic, Burlington, MA, USA, per l'aiuto dato per l'identificazione della bata-lattamasiTEM-136; Dott. Domenico Vitale del CEINGE Biotecnologie avanzate, Napoli, Italia, per il supporto tecnico nel sequenziamento del DNA e la Sig.ra Maria Grazia Catenacci per l'artwork. Questo lavoro ha avuto il supporto del Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica, Italia (PRIN 2004 al Dott. Raffaele Zarrilli) e del Ministero della Salute, Italia.

Bibliografia

- 1) Vincent JL et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee . YAMA 1995; 274(8):639-644.
- 2) Olaechea PM et al. Factors related to hospital stay among patients with nosocomial infection acquired in the intensive care unit. Infect Control Hosp Epidemiol 2003;24(3):207-213.
- 3) Karchmer TB, Durbin LJ, Simonton BM, Farr BM. Cost-effectiveness of active surveillance cultures and contact/droplet precautions for control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Hosp Infect. 2002 Jan; 50(1): 18-
- 4) Zarrilli R, Crispino M, Bagattini M, et al. Molecular Epidemiology of Sequential Outbreaks of *Acinetobacter baumannii* in an Intensive Care Unit shows the emergence of Carbapenem resistance. Journ of Clinical Microb. 2004 Mar, p946-953.
- 5) Bagattini M, Crispino M, Gentile F, Barretta E, Schiavone D, Boccia M.C., Triassi M, Zarrilli R. A nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* producing inducible Amp C-

type beta-lactamase enzyme and carrying antimicrobial resistance genes within a class 1 integron. *Journ of Hospital Inf.* 2004 Jan 56,29-36

6) Casillo R, Utili R, Cuccurullo S, Di Popolo A, Mattei A, Mocavero P, Galdiero N, Squillante F, Ragone E, Fortunato R, Bagattini M, Triassi M, Giordano A, Cusano T, Zarrilli R Clonal outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a teaching hospital in Italy: Genetic Epidemiology and Efficacious Containment *F3* 12:00
Therapeutic Problem and epidemiology *Acinetobacter* 2004 Dublin

7) Rammelkamp CH, Maxon T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1942;51:386-389.

8) Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, et al. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987;ii:302-306.

9) Mammeri H, Poirel L, et al. Resistance to Cefepime and Cefpirome due to a 4-Amino-Acid deletion in the chromosome-encoded Amp-C β -lactamase of *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:716-720.

- 10) Gastmeier, P., K. Groneberg, K. Weist, and H. Rüden. 2003. A cluster of nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in a neonatal intensive care department: identification of transmission and intervention. *Am. J. Infect. Control.* 31: 424-430.
- 11) Gupta, A., P. Della-Latta, B. Todd, P. San Gabriel, J. Haas, F. Wu, D. Rubenstein, and L. Saiman. 2004. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit linked to artificial nails. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 25: 210-215.
- 12) Miranda, G., N. Castro, B. Leanos, A. Valenzuela, U. Garza-Ramos, T. Rojas, F. Solorzano, L. Chihu, and J. Silva. 2004. Clonal and horizontal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* expressing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Mexican pediatric hospital. *J. Clin. Microbiol.* 42:30-35.
- 13) Pessoa-Silva, C.L., B. Meurer Moreira, V. Camara Almeida, B. Flannery, M.C. Almeida Lins, J.L. Mello Sampaio, L. Martins Teixeira, L.E. Vaz Miranda, L.W. Riley, and J.L. Gerberding. 2003. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit: risk factors for infection and colonization. *J. Hosp. Infect.* 53:198-206.

- 14) Villari, P., L. Iacuzio, I. Torre, and A. Scarcella. 1998. Molecular epidemiology as an effective tool in the surveillance of infections in the neonatal intensive care unit. *J. Infect.* 37:274-281.
- 15) Hart, C.A. 1993. *Klebsiellae* and neonates. *J. Hosp. Infect.* 23: 83-86.
- 16) Bradford, P.A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:933-951.
- 17) Gaynes, R.P., and T.C. Horan. Surveillance of nosocomial infections. In: Mayall CG, Ed. *Hospital epidemiology and infection control* Baltimore, Md: The Williams & Wilkins, 1996; 1017-1031.
- 18) National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) *System Report data Summary from January 1992 through June 2003* *Am.J. Infect Control* 2003 Dec;31(8):481-98
- 19) National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved standards M2-A8*. NCCLS, Waine, PA, USA, 2003

- 20) Cormican, M.G., S.A. Marshall, and R.N. Jones. 1996. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. *J. Clin. Microbiol.* 34:1880-1884.
- 21) Jacoby, G.A., and P. Han. 1996. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34:908-911.
- 22) Arlet G., M. Rouveau, I. Casin, P.H. Lagrange, and A. Philippon. 1994. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 beta-lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2553-2558.
- 23) Nei M., and Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.
- 24) Tenover, F.C., R.D Arbeit, R.V. Goering, P.A. Mickelsen, B.E. Murray, D.H. Persing, and B. Swaminathan. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33:2233-2239.

- 25) Essack, S.Y., L.M. Hall, D.G. Pillay, M.L. McFadyen, and D.M. Livermore. 2001. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:88-95.
- 26) Eckert, C., V. Gautier, M. Saladin-Allard, N. Hidri, C. Verdet, Z. Ould-Hocine, G. Barnaud, F. Delisle, A. Rossier, T. Lambert, A. Philippon, and G. Arlet. 2004. Dissemination of CTX-M-Type β -Lactamases among Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Paris, France. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1249-1255.
- 27) Ambler, R.P., F.W. Coulson, J.-M. Frère, J.-M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R.C. Levesque, G. Tiraby, and S.G. Waley. 1991. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem. J.* 276:269-270
- 28) Waters, V., E. Larson, F. Wu, P. San Gabriel, J. Haas, J. Cimiotti, P. Della-Latta, and L. Saiman. 2004. Molecular epidemiology of Gram-negative bacilli from infected neonates and health care workers' hands in neonatal intensive care units. *Clin. Infect. Dis.* 38:1682-1687.

- 29) Barroso H, Fritas-Veira A, Lito LM et al. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases at Portuguese hospital: TEM-10 as endemic enzyme. *J Antimicrob Chemother* 2000 ; 45 :611-616
- 30) Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A et al. Antibiotic Therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis* 2004;39:31-37.
- 31) Nüesch-Inderbilen M.T., F.H. Kayser, and H. Hächler. 1997. Survey and molecular genetics of SHV β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:943-949.
- 32) Perilli, M., E. Dell'Amico, B. Segatore, M.R. de Massis, C. Bianchi, F. Luzzaro, G.M. Rossolini, A. Toniolo, G. Nicoletti, and G. Amicosante. 2002. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* 40:611-614.