



# Caratterizzazione dei meccanismi di resistenza e tipizzazione di *Citrobacter* spp multi-antibiotico-resistente (MDR)

Venditti C, Vulcano A, D'Arezzo S, Nisii C, Piscini A, Mazzearelli A, Bordi E, Paglia MG, Di Caro A

Unità di Microbiologia e Banca Biologica INMI Lazzaro Spallanzani Roma, Italia

## Introduzione

La diffusione di enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) è un importante problema di sanità pubblica. La carbapenemasi KPC, maggiormente associata a *Klebsiella pneumoniae*, si riscontra sempre più spesso anche in altri enterobatteri considerati a basso potenziale patogeno. Tra questi, *Citrobacter* spp, Gram-negativo commensale del tratto gastrointestinale umano, è stato recentemente associato ad infezioni nosocomiali gravi. Scopo dello studio è stato di monitorare la presenza di *Citrobacter* produttore di carbapenemasi in tamponi rettali.

## Metodi

Tutti i ceppi di *Citrobacter* spp, isolati da tamponi rettali seminati su terreni cromogeni (CHROMagar, BioMérieux), sono stati identificati con i sistemi Vitek 2 (BioMérieux) e MALDI-TOF (Bruker Daltonics). La conferma della produzione di carbapenemasi è stata eseguita mediante saggi di diffusione in agar con acido-fenilboronico PBA ed EDTA (Liofilchem). Una RT-PCR (Progenie Molecular), seguita da analisi di sequenza, è stata utilizzata per identificare i geni KPC, VIM, NDM e OXA-48 e beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) CTX-M di gruppo 1, 2 e 9. La tipizzazione degli isolati di *C. freundii* è stata eseguita mediante PCR Multi-Locus-Sequence-Typing (MLST). La tipizzazione dei 2 *C. farmeri* è stata eseguita mediante metodica Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) utilizzando l'oligonucleotide ERIC-2.

## Risultati

Nel periodo marzo 2014 - giugno 2016, sono stati osservati 11 tamponi rettali positivi per *Citrobacter* spp produttori di carbapenemasi (9 *C. freundii* e 2 *C. farmeri*). Di questi 11, 1 *C. freundii* è stato isolato nel 2014, 2 nel 2015 ed i restanti 6 *C. freundii* e 2 *C. farmeri* nel 2016. L'analisi molecolare e la sequenza hanno confermato in tutti gli isolati la presenza della KPC-3. In 2 isolati di *C. freundii* era presente anche VIM-2 e CTX-M-9. L'ESBL SHV-11 è stata identificata in 7/9 *C. freundii* mentre TEM-1 in 5/9. Entrambe le ESBL sono state identificate nei 2 *C. farmeri* (Tabella 1). La tipizzazione mediante MLST ha dimostrato la circolazione di 5 sequence types (ST) diversi per i 9 *C. freundii*; ST91 (nr.3), ST96 (nr.2), ST22 (1) e due nuovi cloni qui denominati STnew1 (nr.1) e STnew2 (nr.2). I risultati ottenuti mediante ERIC-2 hanno evidenziato profili di fingerprinting molto simili per gli isolati di *C. farmeri*.

Tabella 1.

Nr.	Data	Reparto	Identificazione	Geni di resistenza	MLST	MIC (mg/L) <sup>1</sup>														
						AK	AUG	FEP	CTX	CAZ	CIP	CO	ERT	FOS	CN	IMI	MEM	TZP	TGC	SXT
30	16/03/2014	Chirurgia	<i>C. freundii</i>	KPC-3, SHV-11	ST91	≤2	≥32	≥64	≥64	≥64	≥4	≤0,5	≥8	≥256	≥16	≥16	≥16	≥128	≤0,5	≥320
138	11/11/2015	ID	<i>C. freundii</i>	KPC-3, VIM-2, TEM-1, SHV-11, CTX-M-9	ST96	I=16	≥32	≥64	≥64	≥64	≥4	≤0,5	≥8	≤16	≥16	≥16	≥16	≥128	1	≥320
365	03/08/2015	Chirurgia	<i>C. freundii</i>	KPC-3, SHV-11	ST91	≤2	≥32	I=2	8	≥64	≥4	1	4	≥256	≥16	≥16	≥16	≥128	≤0,5	≥320
145	13/01/2016	ID	<i>C. freundii</i>	KPC-3, TEM-1, SHV-11	Stnew1	≤2	≥32	≥64	≥64	≥64	≥4	≤0,5	≥8	≤16	8	≥16	≥16	≥128	1	≥320
152	29/01/2016	4D	<i>C. farmeri</i>	KPC-3, TEM-1, SHV-11	ND	≤2	≥32	≥64	≥64	≥64	≥4	≤0,5	≥8	≤16	I=4	≥16	≥16	≥128	1	≥320
103	22/03/2016	4D	<i>C. farmeri</i>	KPC-3, TEM-1, SHV-11	ND	≤2	≥32	≥64	≥64	≥64	2	≤0,5	≥8	≤16	≤1	≥16	≥16	≥128	1	≥320
19	28/03/2016	Chirurgia	<i>C. freundii</i>	KPC-3, SHV-11	ST91	≤2	≥32	8	8	≥64	≥4	≤0,5	≥8	≥256	≥16	≥16	≥16	≥128	≤0,5	≥320
167	23/04/2016	4D	<i>C. freundii</i>	KPC-3, TEM-1	Stnew2	≤2	≥32	16	≥64	32	≥4	≤0,5	≥8	≤16	≥16	≥16	≥16	≥128	1.5	≥320
134	13/05/2016	Rianimazione	<i>C. freundii</i>	KPC-3, SHV-11	ST22	≤2	≥32	16	≥64	32	≥4	≤0,5	≥8	≤16	≤1	≥16	≥16	≥128	1.5	≥320
124	28/06/2016	ID	<i>C. freundii</i>	KPC-3, VIM-2, TEM-1, SHV-11, CTX-M-9	ST96	I=16	≥32	≥64	≥64	≥64	≥4	≤0,5	≥8	≤16	≥16	≥16	≥16	≥128	≤0,5	≥320
80	06/07/2016	ID	<i>C. freundii</i>	KPC-3, TEM-1	Stnew2	≤2	≥32	≥64	≥64	≥64	≥4	≤0,5	≥8	≤16	8	≥16	≥16	≥128	1.5	≥320

<sup>1</sup> MIC interpretate secondo le Linee Guida European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Suscettibilità indicata in grigio chiaro.

Abbreviazioni: AK, amicacina; AUG, amoxicillina/acido clavulanico; FEP, cefepime; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacina; CO, colistina; ERT, ertapenem; FOS, fosfomicina; CN, gentamicina; IMI, imipenem; MEM, meropenem; TZP, piperacillina/tazobactam; TGC, tigeciclina, SXT, trimethoprim/sulfamethossazolo. ID: 1 divisione, 4D: 4 divisione.

## Conclusioni

Abbiamo osservato un aumento di colonizzazioni da *Citrobacter* spp produttori di KPC tra il 2014 e il 2016; nell'ultimo anno la specie *C. freundii* è stata la CPE più frequentemente isolata da tamponi rettali preceduta solo da *K. pneumoniae*. ST91 è l'unico clone presente in tutti e tre gli anni di sorveglianza. Questa eterogeneità clonale potrebbe essere correlata alla circolazione di elementi genetici mobili quali trasposoni e plasmidi contenenti geni di resistenza. Non sono state osservate infezioni gravi nei pazienti colonizzati, il che rafforza l'importanza della sorveglianza attiva di colonizzazioni da enterobatteri MDR.