



Raccomandazioni dell'Associazione Tecnico Scientifica – S.I.T.La.B.

N.002/23

Integrazione di un nuovo test molecolare rapido nella sorveglianza e nello studio delle antibiotico-resistenze

Torrieri A. (Chieti), Gambi A. (Chieti), Del Fine P. (Chieti), Palumbieri V. (Termoli)

Rev. 1.0

SITLaB news

Publicato: 19 gennaio 2023

Copyright: © SITLaB

Abstract

Introduzione: La comparsa di MDRO (multidrug-resistant organism) è un problema dilagante in tutto il mondo, ed è stata favorita dall'utilizzo improprio e non mirato di antibiotici.

Obiettivo: Questo studio si rivolge principalmente alle Enterobacteriaceae e alla ricerca dei relativi geni di resistenza agli antibiotici attraverso un metodo molecolare rapido che possa velocizzare le procedure di diagnosi in tre scenari principali: 1) sorveglianza attiva degli MDRO tramite tampone rettale; 2) evento epidemico da MDRO; 3) stewardship antibiotica nei pazienti con batteriemia da MDRO.

Materiali e metodi: Lo strumento utilizzato per la conferma genotipica si basa sulla tecnologia LAMP (loop mediated isothermal amplification), che conduce una reazione di amplificazione seguendo le stesse fasi di una PCR ma impiegando pochi minuti. Sono stati sottoposti a conferma molecolare colonie isolate dopo la semina da vari campioni, principalmente tamponi di sorveglianza (rettali, ma anche oculari e auricolari) ed emocolture.

Risultati: I risultati ottenuti confermano le beta-lattamasi come principale meccanismo di resistenza tra le Enterobacteriaceae. Infatti, in tutti i tamponi rettali di sorveglianza è stata isolata *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi, coerentemente con l'attuale situazione endemica italiana.

Conclusioni: È emerso che il metodo molecolare rapido può avere un impatto sulla gestione del paziente colonizzato da batteri multiresistenti, ma anche sull'evoluzione dei casi in corso di evento epidemico da MDRO o di un'infezione invasiva come una batteriemia, consentendo l'adozione precoce di misure terapeutiche appropriate e di contenimento.

Parole chiave: antibiotico-resistenza, LAMP, beta-lattamasi, *Klebsiella pneumoniae*, sorveglianza, stewardship antibiotica.

Introduzione

Le Enterobacteriaceae produttrici beta-lattamasi di qualsiasi tipo costituiscono un pericolo soprattutto in ambiente ospedaliero, poiché possono diffondere con particolare facilità tramite il personale sanitario in particolare con le mani. [1] [2]. Le beta-lattamasi sono enzimi che inattivano gli antibiotici β -lattamici (farmaci che interferiscono con la sintesi della parete batterica) attraverso l'idrolisi dell'anello β -lattamico. Le β -lattamasi sono state suddivise in quattro classi in base alla loro struttura primaria (classificazione di Ambler), mostrate in figura 1: [3]

Classe Ambler	β -lattamasi	Agente del sito attivo	Esempi
A	Penicillinasi	Serina	TEM, SHV, KPC, CTX-M
B	Metallo- β -lattamasi	Zinco	IMP, VIM, NDM
C	Cefalosporinasi	Serina	AmpC
D	Oxacillinasi	Serina	OXA

Figura 1 - Classificazione di Ambler per le beta-lattamasi

La resistenza ai beta-lattamici, come per gli altri antibiotici, può essere intrinseca (naturale) o acquisita.

Nel primo caso si parla di mancata suscettibilità ed è una caratteristica di alcune specie batteriche i cui membri sono tutti resistenti a un particolare farmaco, o perché mancano del meccanismo cellulare

verso il quale il composto esercita la propria azione o perché la loro parete cellulare è impermeabile al farmaco stesso. Nel secondo caso, invece, la resistenza origina da mutazioni cromosomiche o dall'acquisizione di materiale genetico trasferibile in popolazioni batteriche correlate o meno a quella ricevente. I veicoli più importanti di questo movimento di geni sono: plasmidi, trasposoni e integroni. Solitamente è proprio questo secondo tipo di resistenza a destare maggiore preoccupazione poiché certi geni batterici sono in grado di spostarsi tra DNA cromosomiale ed extra-cromosomiale, tra batteri della stessa specie, o di specie e generi diversi (trasferimento orizzontale). [4]

Lo spettro d'azione delle beta-lattamasi è vario e negli ultimi anni si sono registrati livelli crescenti di Enterobacteriaceae produttrici di carbapenemasi (CPE), enzimi in grado di scindere i carbapenemi, ovvero beta-lattamici ad ampio spettro [5]. Per questo nel presente studio le classi di beta-lattamasi esaminate sono:

- KPC, la carbapenemasi maggiormente rilevata a livello mondiale;
- CTX-M, si tratta di una beta-lattamasi a spettro esteso, ma se combinata ad altri meccanismi di resistenza come perdita di porine, diventa attiva anche contro i carbapenemi;
- OXA, carbapenemasi prodotta naturalmente da *A.baumannii*. [6] [7]

Questo rappresenta un problema per i reparti con pazienti critici (ad esempio le Terapie Intensive) e per i pazienti debilitati (immunodepressi, intubati con dispositivi per ventilazione meccanica ecc.), maggiormente ricettivi verso questi ceppi e considerati a rischio di sviluppare infezioni invasive [8] [9]. I metodi fenotipici raccomandati dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing -EUCAST per la conferma della produzione di beta-lattamasi, come i metodi del disco combinato o i sistemi automatici, però, richiedono tempi di incubazione di 18 ore [10]. Lunghi tempi di risposta si associano a un maggior rischio di trasmissione di questi ceppi; perciò, sono stati sviluppati metodi più rapidi, come il test molecolare Eazyplex® SuperBug CRE, basato sulla tecnologia LAMP e pensato specificamente per le Enterobacterales. Nel presente studio abbiamo applicato questo test come conferma molecolare del meccanismo di resistenza in tre scenari principali: 1) sorveglianza attiva degli MDRO tramite tampone rettale, seminato su terreno cromogeno CHROMID® CARBA, selettivo e differenziale per l'identificazione di Klebsielle produttrici di carbapenemasi (le colonie sospette appaiono di colore verde malachite); 2) evento epidemico da MDRO; 3) stewardship antibiotica dei pazienti con batteriemia da MDRO.

Materiali e Metodi

Sono state seguite tre flow-chart a seconda dei casi, che vengono riportate nelle figure 2, 3, 4. Il punto in comune delle tre flow-chart è la conferma molecolare mediante Eazyplex® SuperBug CRE. Questo strumento è in grado di rilevare i seguenti geni di resistenza: KPC, NDM, VIM, OXA-48, OXA-181 per le carbapenemasi e i gruppi CTX-M-1 e CTX-M-9 per le beta lattamasi a spettro esteso. La tecnologia LAMP utilizza il DNA da amplificare, insieme a due primer interni (FIP, BIP) e primer esterni (F3, B3) che riconoscono sei regioni separate all'interno di un DNA bersaglio. È stato ottimizzato con i cosiddetti Loop-primer (LF, LB), primer aggiuntivi progettati per l'annealing che possono accelerare e migliorare la sensibilità della reazione. La reazione viene condotta in maniera isoterma alla temperatura di 66 °C e l'andamento può essere visualizzato real-time grazie alla misura della torbidità del pirofosfato di magnesio prodotto che è insolubile [11]. Il facile utilizzo, l'assenza di estrazione del DNA e la capacità di testare più geni contemporaneamente lo hanno reso un valido metodo di conferma nei casi sopra descritti.

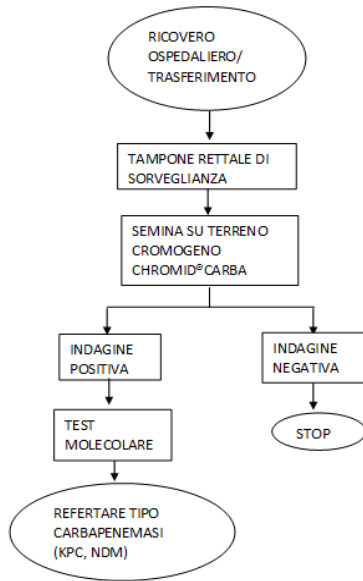


Figura 2- Flow chart seguita per la sorveglianza rettale

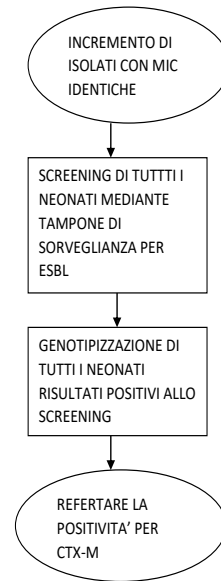


Figura 3- Flow chart in caso di evento epidemico da K.pneumoniae produttrice di CTX-M1

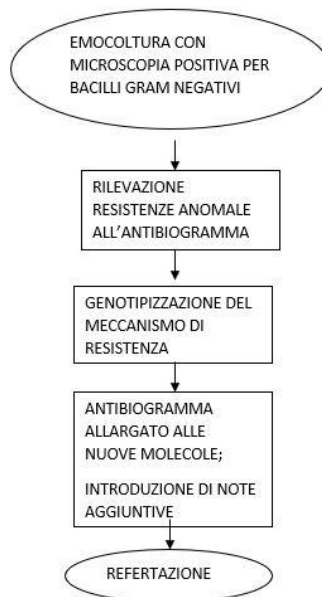


Figura 2- flow chart per la rilevazione di resistenze sulle molecole target

Risultati

a) Sorveglianza: sono stati eseguiti 2802 tamponi rettali di sorveglianza per identificare le colonizzazioni da ceppi resistenti ai carbapenemi nel periodo 1° marzo 2022- 30 settembre 2022. In figura 5 si riporta l'incidenza dei ceppi CRE.

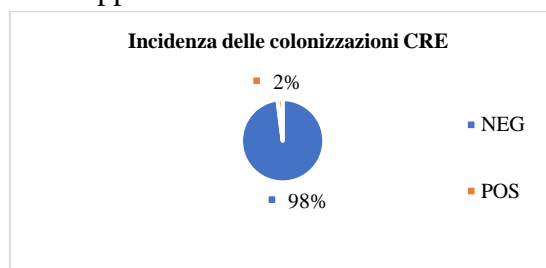


Figura 3- incidenze delle colonizzazioni rettali da ceppi CRE

In tutti i casi, ovvero 56 tamponi (2%), è stata isolata *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi confermata genotipicamente. I reparti coinvolti sono riportati in figura 6. Ben 52 su 56 ceppi hanno presentato la carbapenemasi KPC, i restanti 4 hanno presentato CTX-M1, presumibilmente associata ad un altro meccanismo di resistenza che ne ha allargato lo spettro d'azione.

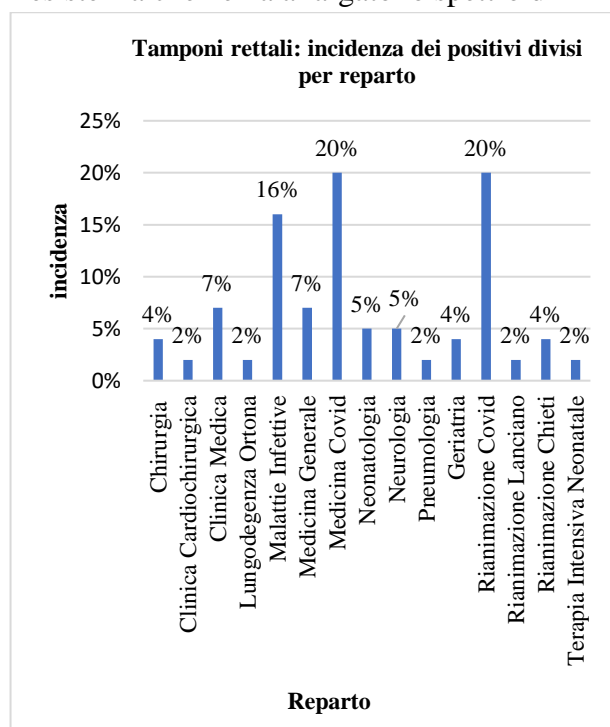


Figura 4- Suddivisione delle incidenze dei colonizzati per singoli reparti

b) Il secondo campo di applicazione del metodo molecolare rapido è stato il caso di evento epidemico da *Klebsiella pneumoniae* produttrice di CTX-M1 nei reparti di Terapia Intensiva Neonatale e Neonatologia.

Si sono registrati in totale 55 casi nel periodo 1° marzo 2022- 30 settembre 2022, con il picco che si è verificato a metà maggio con 13 casi. In figura 7 si riporta la curva epidemica: i casi includono isolamenti di *K.pneumoniae* da BAL, emocoltura, punta di tubo endotracheale, tamponi di sorveglianza, urina da mitto e urina da catetere, la cui distribuzione è riportata in figura 8.

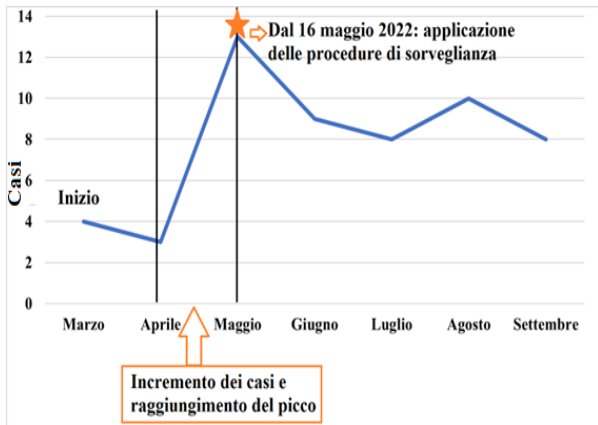


Figura 5- Curva epidemica dei 55 casi di *K.pneumoniae* CTX-M1

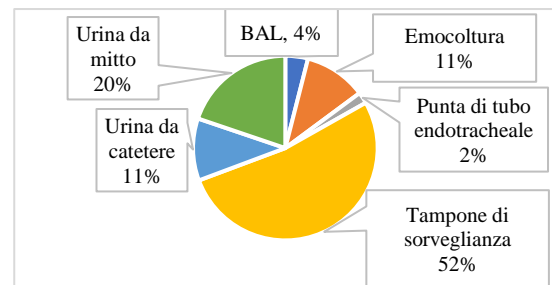


Figura 6- Materiali di primo isolamento del ceppo MDRO

È stata avviata pertanto un'attività di sorveglianza che prevedeva l'esecuzione per ogni neonato a cadenza bisettimanale di set di cinque tamponi (rettale, oculare destro e sinistro, auricolare destro e sinistro).

Dal 15 maggio 2022 fino alla fine di settembre 2022 sono stati sottoposti a sorveglianza 109 neonati per un totale di 545 tamponi di sorveglianza, in cui nell'11% dei casi è stato isolato il suddetto ceppo, come riportato in figura 9.

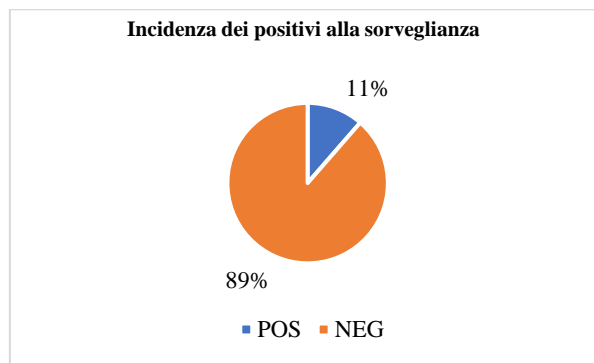


Figura 7- Tamponi con isolamento di *K.pneumoniae* CTX-M1 (POS) e negativi (NEG)

Sul totale (109) dei neonati sorvegliati, 33 sono stati quindi interessati da una colonizzazione su uno o più materiali da *K.pneumoniae* produttrice di beta-lattamasi a spettro esteso CTX-M1 confermata genotipicamente, come appare in figura 10. La distribuzione dei materiali da cui è stato isolato il suddetto ceppo, invece, è mostrata in figura 11.

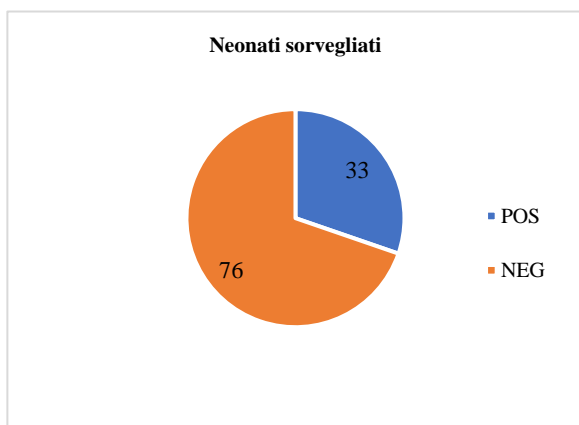


Figura 8- Neonati colonizzati e non colonizzati da *K.pneumoniae* CTX-M1

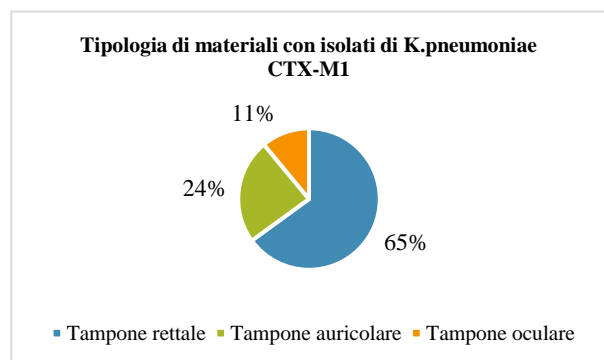


Figura 11 -suddivisione per materiale con isolati di *K.pneumoniae* CTX-M1

In seguito a questa sorveglianza attiva si è rilevato che nove neonati dei 109 sottoposti a screening hanno sviluppato infezione da parte dello stesso ceppo di *K.pneumoniae* Esbl+ nei distretti relativi ai materiali biologici indicati in figura 12 dopo una mediana di 5 giorni (range 2-20 giorni). Un neonato ha sviluppato infezione contemporaneamente in due distretti differenti; infatti, il batterio è stato isolato da emocoltura ed urina.

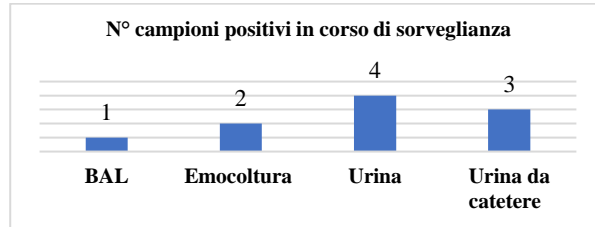


Figura 12- Campioni positivi in corso di sorveglianza attiva

c) Batteriemia: 544 emocolture sono risultate positive per un qualsiasi microrganismo nel periodo 1° marzo 2022-30 settembre 2022. Sono state testati genotipicamente solo quei ceppi che dopo antibiogramma con sistema automatico Vitek ® 2 presentavano un sospetto profilo di sensibilità antibiotica. I risultati che hanno condotto alla conferma genotipica sono: resistenza ad Ertapenem e Meropenem per *Klebsiella pneumoniae*; resistenza a Cefotaxime e Ceftazidime per *Escherichia coli*; resistenza a Meropenem per *Acinetobacter baumannii*. In figura 13 si possono visualizzare i risultati: 3% delle emocolture positive con isolamento di *K.pneumoniae* resistente ai carbapenemi, 4% di *E.coli* produttore di CTX-M1 e 2% di *A.baumannii* produttore di OXA-48.

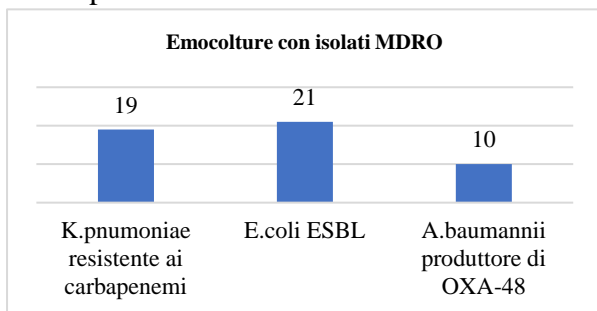


Figura 13- isolati di MDRO da emocoltura

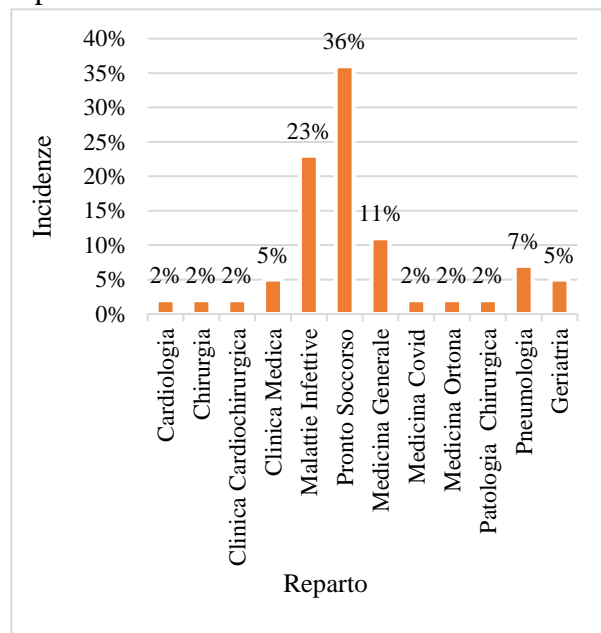


Figura 14- suddivisione per reparto delle incidenze dei casi di batteriemie MDRO

Nella figura 14 vengono riportate le incidenze nei singoli reparti.

Discussione

L'utilizzo inappropriato di antibiotici ha portato alla comparsa di ceppi multiresistenti (MDRO), a cui organizzazioni internazionali come l'OMS stanno rivolgendo la loro attenzione, in particolare per il pericolo che possono rappresentare in ambiente ospedaliero. Tra i batteri tenuti maggiormente sotto controllo figurano gli Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE), i quali essendo resistenti ad antibiotici ad ampio spettro come i carbapenemi, limitano notevolmente il ventaglio di soluzioni terapeutiche in caso di infezione. Di qui deriva la necessità di controllare la circolazione di ceppi MDRO tra ospedale e strutture di ricovero per impedirne la diffusione, attraverso la sorveglianza attiva.

I risultati dei tamponi rettali di sorveglianza ottenuti nel presente studio riflettono la preoccupante situazione endemica italiana per *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi. Inoltre, le elevate incidenze di positività riportate nei reparti Medicina Covid e Rianimazione Covid (pari in entrambi al 20%), lasciano dedurre che i ceppi MDRO circolano con più facilità tra i pazienti maggiormente debilitati e ricoverati in reparti intensivi.

Nel caso dell'evento epidemico, invece, i risultati dimostrano come chi presenti una colonizzazione da MDRO sia poi più predisposto a sviluppare un'infezione.

La sorveglianza dei neonati tramite lo screening con tamponi nelle diverse sedi ha consentito di individuare i colonizzati, successivamente isolati per impedire la diffusione del batterio.

Le emocolture positive per MDRO, invece, provenivano per la maggior parte dal Pronto Soccorso, confermando che tali batteri spesso sono di importazione esterna all'ospedale.

Conclusioni

L'utilizzo dello strumento Eazyplex® SuperBug CRE e la sua rapidità nell'esecuzione della reazione in quindici minuti hanno consentito di accorciare i tempi dell'indagine microbiologica di un giorno rispetto ai classici metodi fenotipici di conferma. Questo si è rivelato particolarmente utile nei casi di sorveglianza con tampone rettale e di evento epidemico, nei quali la tempestiva comunicazione di colonizzazione o infezione da MDRO ha permesso al reparto di avviare le misure di isolamento e contenimento in breve tempo. Inoltre, si è dimostrato un metodo valido nella stewardship antibiotica dei pazienti con batteriemia da MDRO, ha infatti consentito di ottenere informazioni aggiuntive sul meccanismo di resistenza, le quali hanno guidato la formulazione della terapia antibiotica attraverso nuove molecole. Trovare una terapia antibiotica adeguata nel minor tempo possibile vuol dire ridurre la mortalità in corso di infezioni invasive.

Bibliografia

- [1] H. Wilson, «Extended-spectrum b-lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.,» *Microial Genomics*, 2018.
- [2] M. Casewell e I. Phillips, «Hands as Route of Transmission for Klebsiella Species,» *British Medical Journal*, vol. 2, 1977.
- [3] P. R. Murray, *Microbiologia medica*, Edra.
- [4] Cambiotti, «I meccanismi con cui i batteri resistono agli antimicrobici,» *Argomenti*, n. 2, 2014.
- [5] M. McLaughlin, «Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in Enterobacteriaceae,» *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 57, n. 10, 2013.
- [6] Standards Unit Microbiology Services, *Ricerca di batteri con β -lattamasi che idrolizzano i carbapenemi (carbapenemasi)*, 2020.
- [7] J. Oliveira, «Gram Negative Bacteria,» *StatPerals*, 2022.
- [8] Istituto Superiore di Sanità, «Antibiotico-Resistenza (Epicentro),» [Online]. [Consultato il giorno 18 settembre 2022].
- [9] Ministero della Salute, «Circolare n. 35470 "Aggiornamento delle indicazioni per la sorveglianza e il controllo delle infezioni da Enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE)",» 06/12/2019.
- [10] EUCAST, *EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Versione 2.01*, 2017.
- [11] M. Yasuyoshi, «Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases,» *Journal of infection and chemotherapy*, vol. 15, 2009.
- [12] W. R. Jarvis, «The epidemiology of nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae,» *Infection control*, vol. 6, n. 2, 1985.