

.. *“Dietro ogni linea d’arrivo c’è sempre una linea di partenza”* .. (M. T. di Calcutta)

Vorrei dedicare il presente elaborato alla mia Famiglia, in particolare:

a Marcello, mio modello di studio e costante motivo di confronto dedico questa tesi, semplicemente per esserci sempre stato ma soprattutto .. avermi ascoltato,

a mia sorella Niicola, con i suoi piccoli gesti e attenzioni mi è stata vicina ed ha saputo partecipare al mio percorso di studi,

e infine ..

ai miei genitori, Ferruccio e Marinella, se mi trovo a scrivere la tesi una parte di merito va certamente a loro.



SEDE DI SVOLGIMENTO DEL TIROCINIO

In Azienda esterna

Azienda: Laboratorio Unico del Centro Servizi AUSL della Romagna

U. O. Microbiologia

Indirizzo: Piazza della Liberazione, 60 - 47522 Pievesestina di Cesena (FC)

Responsabile: Prof. Vittorio Sambri

**ALMA MATER STUDIORUM UNIVERSITA' DI
BOLOGNA**

SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE MOTORIE

Corso di studio in Biologia della Salute

**Valutazione del *Beta Carba test* per il rapido
rilevamento di enterobatteri produttori di
carbapenemasi (CPE)**

Tesi di laurea in Microbiologia clinica

Presentata da:

Erika Venturi

Matricola n°

0000748895

Relatore:

Paola Dal Monte

Correlatore:

Vittorio Sambri

Anno accademico 2015-2016

Sessione I

Abstract

L'antibiotico resistenza negli enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) rappresenta una problematica emergente in sanità pubblica, dato che le opzioni alternative per il trattamento di pazienti infetti sono limitate. L'andamento epidemiologico delle CPE a livello globale appare ad oggi molto variegato con differenze significative tra paesi. In Italia la diffusione di *K. pneumoniae* produttrice di KPC è endemica ed è stimata essere un terzo (32,9%) delle infezioni invasive (sangue e liquor) da *K. pneumoniae*. Al contrario per *E. coli* produttore di KPC è presente un minore riscontro.

A tale riguardo, la regione Emilia-Romagna ha emanato nel 2011 una specifica direttiva, che descrive le indicazioni pratiche per la sorveglianza e il controllo degli enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) in sanità pubblica e nel territorio. Le strategie indicate sono finalizzate a reagire efficacemente e tempestivamente prima che la diffusione sia arrivata a livelli tali da non potere essere bloccata. Pertanto, in virtù di quanto descritto, diventa indispensabile implementare gli studi di farmaco-resistenza per valutare e ridurre il potenziale di crescita di tali microrganismi.

Questo studio presenta come fine la valutazione del *Beta Carba test*, ovvero, un metodo cromogeno per il rapido rilevamento di enterobatteri produttori di carbapenemasi(CPE) in confronto con il metodo standard di riferimento. Lo studio è stato svolto presso l'Unità Operativa Microbiologia Laboratorio Unico del Centro Servizi AUSL della Romagna ed è di natura retrospettiva, di tipo esclusivamente qualitativo in quanto osservazionale. Sono stati analizzati 412 campioni completamente anonimizzati: 50 emocolture, 250 urine e 112 tamponi rettali di sorveglianza.

La valutazione del test è stata condotta sia direttamente a partire dalle matrici biologiche (emocolture e urinocolture positive) che dalle colonie isolate di enterobatteri produttori di carbapenemasi da tamponi rettali di sorveglianza, urine o emocolture.

I risultati sperimentali ottenuti *in vitro* con il *test β Carba*, mostrano una totale concordanza con i metodi sia fenotipici che genotipici utilizzati come riferimento: è stata ottenuta una sensibilità e specificità pari al 100%.

Inoltre, a favore del test si inserisce il parametro fondamentale della rapidità, consentendo quindi una celere rilevazione di enterobatteri produttori di carbapenemasi direttamente su campioni clinici con un tempo di risposta piuttosto veloce e affidabile pari a 15-30 minuti. In definitiva, grazie alla *performance* dimostrata *in vitro*, il *test* può rappresentare un valido strumento per arginare e limitare lo *spreading* di CPE, svolgendo un buon ruolo nella gestione dei pazienti infetti.

INDICE

1. Introduzione	11
1.1 Antibiotico resistenza	11
1.1.1 Esordio della resistenza	12
1.1.2 Tipologie di resistenza batterica	13
1.1.3 Meccanismi generali dell'antibiotico resistenza	15
1.1.4 Antibiotici beta-lattamici	17
1.1.5 Fenomeno di resistenza in <i>Enterobacteriaceae</i>	21
1.1.6 Betalattamasi	22
1.1.6.1 Carbapenemasi	24
1.2 Epidemiologia delle carbapenemasi	26
1.3 Modalità di prevenzione della trasmissione	28
1.4 Tecniche microbiologiche per l'identificazione di Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE)	30
1.4.1 Identificazione e Antibiogramma (Abg)	31
1.4.2 <i>Test di screening</i> per riconoscere i soggetti colonizzati	37
1.4.3 <i>Test di conferma fenotipica</i>	39
1.4.4 <i>Test di conferma genotipica</i>	42
1.5 <i>Beta Carba Test</i> per rapido rilevamento di Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE)	46
2. Obiettivi della tesi	49
3. Materiali e metodi	51
3.1 Disegno dello studio e campioni analizzati	51
3.2 Identificazione e Antibiogramma (Abg)	60
3.3 <i>Test di screening</i> per riconoscere i soggetti colonizzati	60

3.4 <i>Test</i> di conferma fenotipica	62
3.5 <i>Test</i> di conferma genotipica	64
4. Risultati	73
4.1 Emocolture	73
4.2 Urine	75
4.3 Tamponi rettali	77
5. Discussione	81
6. Bibliografia	85
7. Sitografia	89

Allegato 1 - The Bio-Rad β CARBA Assay Detects a Diverse Range of Carbapenemase-Producing Organisms (CPO) **93**

Allegato 2 - Evaluation of the novel β CARBA test (Bio-Rad) for rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in different samples **94**

1. INTRODUZIONE

1.1 Antibiotico resistenza

Uno stipite batterico è resistente ad un farmaco quando è in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni del farmaco che risultano inibitorie per la massima parte degli stipiti della stessa specie o, operativamente, quando uno stipite batterico sia in grado di moltiplicarsi in presenza di concentrazioni del farmaco pari a quelle massime raggiungibili nel corso dell'impiego terapeutico. Come suggerisce *Keiji Fukuda* Vicedirettore per la Sicurezza Sanitaria del *World Health Organization* (WHO) “l'era post-antibiotici nella quale infezioni comuni possono diventare mortali, ormai lontana dall'essere considerata una fantasia apocalittica, è diventata invece una reale possibilità del XXI secolo”.

Dall'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) traspare infatti uno scenario non promettente, tale per cui l'utilizzo inappropriato di antibiotici ha portato ad un vasto e rapido sviluppo di un ceppo di batteri resistenti a questa classe di farmaci, che rende difficile il trattamento di una gamma sempre più ampia di infezioni abbastanza comuni e facili da contrarre. Da qui l'impegno dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel ribadire la necessità di una rete sinergica che coordini a livello globale il monitoraggio delle antibiotico resistenze e la condivisione dei dati. Le agenzie nazionali hanno indicato tra le principali minacce per la salute pubblica *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemi come coppia “batteri-antibiotici” per eccellenza. Pertanto risulta indispensabile uno sforzo comune da parte di tutti gli Stati membri per contrastare lo sviluppo delle resistenze antimicrobiche, per implementare e coordinare le azioni messe in campo a livello globale. Oltre alla prevenzione e alle vaccinazioni per ridurre la necessità di antibiotici, è importante abbassare drasticamente l'utilizzo inappropriato di tali farmaci.

A tal proposito, essendo la resistenza agli antibiotici un problema di emergenza mondiale, l’OMS fornisce alcune indicazioni rivolte a:

cittadini

- utilizzare gli antibiotici solo se prescritti da un medico
- effettuare la terapia completa e non interromperla come spesso succede
- evitare la somministrazione di più antibiotici in periodi ravvicinati

operatori sanitari

- migliorare prevenzione e controllo delle infezioni
- perfezionare l’appropriatezza prescrittiva
- prescrivere antibiotici solo quando è strettamente necessario

istituzioni e industria del farmaco

- adottare misure per promuovere l’innovazione e la ricerca
- regolamentare la cooperazione e la condivisione di informazioni tra tutti i soggetti interessati

1.1.1 Esordio della resistenza

La nascita della resistenza si riconduce a due principali teorie: di adattamento e di mutazione-selezione.

Secondo la teoria di adattamento, la maggior parte di ceppi batterici godono della capacità di adattarsi all’ambiente circostante man mano che essi vengono a contatto con gli antibiotici. Si parla di resistenza “*multi-step*” quando essa

compare *in vitro* gradatamente e conseguentemente l'uso di concentrazioni progressivamente crescenti di antibiotico.

Per quanto riguarda invece la teoria di mutazione-selezione, in ogni popolazione batterica sensibile potrebbe insorgere successivamente all'utilizzo di antibiotici, l'eventuale presenza di mutanti resistenti, evidenziati dalla pressione selettiva del farmaco. In questo caso parliamo di resistenza “*one-step*” per cui *in vitro* si manifesta la selezione, all'interno di una popolazione microbica sensibile, di ceppi batterici resistenti ad alte concentrazioni di antibiotico al primo contatto con esso.

1.1.2 Tipologie di resistenza batterica

La resistenza viene acquisita *ex novo* come risultato di una modificazione del genoma dello stivite sensibile. I meccanismi mediante i quali tale modificazione si realizza sono fondamentalmente due: resistenza **naturale** e **acquisita**. In molti casi e per molte specie batteriche si può parlare di resistenza naturale, vale a dire una insensibilità costituzionale verso un determinato antibiotico. Le caratteristiche di questa resistenza naturale sono di essere immutabile nel tempo e di manifestarsi in tutti i ceppi di una stessa specie. Essa dipende dalle caratteristiche dell'antibiotico e delle strutture cellulari del microrganismo.

Molto spesso tuttavia, le specie batteriche sono naturalmente sensibili all'attività di un antibiotico e, in certe condizioni, perdono la sensibilità verso le concentrazioni del farmaco che, terapeuticamente sono raggiungibili *in vivo* nell'organismo umano. Si parla allora di resistenza acquisita, la quale a differenza della resistenza descritta precedentemente, si manifesta e viene selezionata in alcuni ceppi di una determinata specie. Si divide in **cromosomica** ed **extracromosomica**.

Per quanto riguarda la resistenza cromosomica costituisce solo il 10-15% di tutte le resistenze acquisite (bassa frequenza di insorgenza). Risulta caratterizzata da una mutazione spontanea del DNA del cromosoma che avviene nella sequenza del gene che specifica il bersaglio d'azione dell'antibiotico. Tale resistenza interessa solo quel determinato antibiotico o antibiotici con caratteristiche simili (resistenza crociata o cross-resistenza) verso il quale sono stati isolati i mutanti resistenti, da ultimo il carattere genetico mutato si trasmette verticalmente tramite la discendenza (da cellula madre a cellula figlia).

Certamente, una maggior importanza è incarnata nella così denominata resistenza extracromosomica che costituisce invece, il 90% di tutte le resistenze (alta frequenza di insorgenza). Essa si origina per nuova acquisizione di informazione genetica proveniente da altri microrganismi, che penetra nella cellula mediante i meccanismi di scambio genetico orizzontale: coniugazione (plasmidi, trasposoni), trasformazione e trasduzione (profagi). Diventa interessante apprezzare come, per le caratteristiche degli elementi genetici mobili interessati, tale resistenza riguarda spesso più classi di antibiotici (resistenza multipla). Questo fatto pone problemi aggiuntivi alla scelta della terapia antibiotica più adatta alla cura di una determinata malattia infettiva. In particolare, il trasferimento dei determinanti di resistenza non è specie-specifico (trasferimento tra ceppi della stessa specie) ma può avvenire anche tra microrganismi appartenenti a specie differenti. Chiaramente questo comportamento contribuisce in maniera considerevole alla diffusione delle resistenze ed è un fattore di rischio associato all'utilizzo degli antibiotici, da non sottovalutare affatto.

1.1.3 Meccanismi generali dell'antibiotico resistenza

Qualunque sia la natura della resistenza in questione, essa si può realizzare attraverso una serie numerosa di possibili meccanismi (fig.1.1); tuttavia quelli aventi un effettivo riscontro si riducono sostanzialmente a:

- produzione di enzimi inattivanti il farmaco;
- pompa d'efflusso;
- modificazione della permeabilità al farmaco;
- modificazione del bersaglio su cui agisce il farmaco;
- sviluppo di vie metaboliche alternative a quelle inibite dal farmaco.

La produzione di enzimi inattivanti il farmaco consiste nella capacità del batterio di produrre proteine ad attività enzimatica in grado di degradare o di modificare direttamente l'antibiotico, con differente rapidità, rendendolo dunque inattivo. Alcuni ceppi batterici sfruttano tale strategia nei confronti di antibiotici beta-lattamici, in particolare le *Enterobacteriaceae* (bacilli Gram-negativi) sono produttori di endo-beta-lattamasi contenuti nello spazio periplasmico della cellula batterica e agiscono proprio a questo livello, inattivando il farmaco *vs* a germi Gram-positivi i quali producono eso-beta-lattamasi, ovvero enzimi inattivanti diffusi in quello che è l'ambiente esterno alla cellula batterica.

Per quanto riguarda la pompa d'efflusso, il batterio produce essenzialmente enzimi di membrana o parietali che funzionano come vere e proprie pompe, estromettendo concretamente l'antibiotico dall'ambiente intracellulare nel quale, cinematicamente, non si riuscirebbero a raggiungere concentrazioni inibitorie sufficienti. Pertanto, si verifica una diminuita concentrazione di antibiotico all'interno della cellula batterica dovuta ad una celere espulsione del farmaco per mezzo di un processo di efflusso attivo svolto dalla proteina di membrana.

Saggiando il terzo meccanismo di resistenza, gli Enterobatteri in quanto bacilli Gram-negativi sono caratterizzati dalla presenza di una sorta di avvolgimento rappresentato da uno strato lipopolisaccaridico esterno attraversato da porine. Ad opera di modificazioni presenti nella costituzione degli involucri esterni del batterio o nella permeabilità di membrana mediata da proteine di trasporto, si innesca un meccanismo tale per cui il betalattamico ad esempio, non penetra più in quantità tali e sufficienti da interferire efficacemente con il proprio *target* molecolare, ed esplicare così la propria azione inibitoria nei confronti del determinato bersaglio.

Pensando invece, alle modificazioni a carico del bersaglio su cui agisce il farmaco, si valuta come il *target* dell'azione dell'antibiotico possa andare incontro ad alterazioni, o per mutazione con conseguente ridotta affinità di legame con l'antibiotico o per aggiunta enzimatica di gruppi chimici, cioè può essere prodotto in quantità maggiori, tali da non essere inattivate a sufficienza dalle quantità di antibiotico utilizzabili nei protocolli terapeutici. In alcuni casi è possibile apprezzare come la cellula batterica riesca ad espletare la funzione normalmente a carico del bersaglio dell'antibiotico, sfruttando una via alternativa modificata, circonvendendo al blocco operato dall'antibiotico stesso.

Da ultimo, tra le ipotesi di meccanismi responsabili dell'antibiotico resistenza, si fa riferimento allo sviluppo di vie metaboliche alternative come tattica messa a punto da batteri per aggirare l'azione antimetabolica dell'antibiotico che avrà pertanto un'azione completamente vanificata.

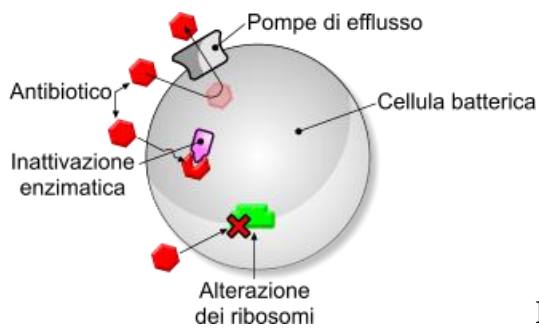


Fig.1.1: Meccanismi di antibiotico resistenza

1.1.4 Antibiotici beta-lattamici

Tali antibiotici rappresentano il gruppo più numeroso, noto e maggiormente utilizzato nella pratica clinica. Essi si dividono in quattro classi differenti, sfruttando come criterio discriminante la modalità attraverso cui l'anello betalattamico si lega al resto della molecola.

Dunque, distinguiamo:

- Penicilline
- Cefalosporine
- Monobattami
- Carbapenemi

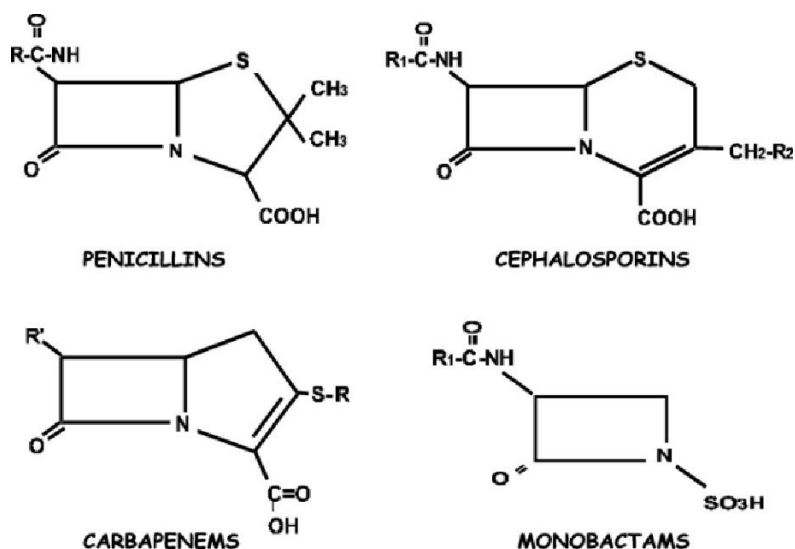


Fig.1.2: Struttura molecolare antibiotici betalattamici

Tra le caratteristiche comuni, si osservano la presenza dell'anello betalattamico (fig.1.2) legato ad anello tiazolidinico (Penicilline) o ad un anello diidrotiazinico (Cefalosporine) ed un identico meccanismo d'azione in quanto sono farmaci ad azione battericida, poiché interferiscono con la sintesi della parete cellulare batterica.

Il componente fondamentale della tal parete è rappresentato dal peptidoglicano (o muco peptide batterico o mureina), un enorme polimero le cui unità strutturali sono rappresentate da due carboidrati azotati, l'N-acetilglucosamina (NAG) e l'acido muramico, legati tra loro mediante un legame β , 1-6 che può essere scisso dal lisozima. Tale polimero è presente sottoforma di strati concentrici nella parete cellulare batterica. In particolare, per batteri Gram-negativi quali *Enterobacteriaceae*, essi dispongono di strati concentrici uniti da legami semplici tra i penta-peptidi di catene adiacenti di peptidoglicano, rispetto ai Gram-positivi nei quali si ha la presenza di ponti glicinici che legano tra loro le catene peptidiche.

Quanto descritto rappresenta il risultato combinato di un processo metabolico a cui prendono parte tre enzimi localizzati sulla superficie della membrana citoplasmatica: transglicosilasi, transpeptidasi e carbossipeptidasi o altrimenti conosciuti sotto l'acronimo PBP (*Penicillin Binding Protein*), classificate in base al differente peso molecolare e denominate quindi PBP_{1a}, PBP_{1b}, PBP₂ *etc.*. Esse rappresentano un facile bersaglio per gli antibiotici betalattamici, che agiscono attraverso un meccanismo competitivo, esplicando la loro azione inibente selettiva nei confronti di ciascun PBP.

Ancora, tra le analogie che correlano gli antibiotici betalattamici si ricorda il carattere acido, la determinazione di reazioni allergiche spesso crociate e la possibilità di inattivazione da parte di enzimi (betalattamasi).

Penicilline:

Costituiscono un gruppo numeroso di antibiotici aventi un nucleo (acido 6-amino-penicillanico) con varie catene laterali in grado di condizionare le peculiarità farmacocinetiche e lo spettro d'azione.

È importante discriminare le penicilline in naturali cioè “estrattive” e semisintetiche, ovvero derivanti dall'acido 6-amino-penicillanico con l'aggiunta di catene laterali. Tra quelle naturali l'attenzione si è focalizzata inizialmente sulla benzil-penicillina o penicillina G, scoperta casualmente da *Fleming* nell'anno 1928, essa rappresenta il capostipite della famiglia. Da qui sono poi derivate per semi-sintesi numerosi composti raggruppati in altre classi quali, Aminopenicilline (*Amoxipenicillina*, *Ampicillina*); Carbossipenicilline (*Ticarcillina*, *Carbenicillina*); Ureidopenicilline (*Azlocillina*, *Mezlocillina*, *Piperacillina*). In particolare, l'evoluzione di questa famiglia di antibiotici è stata dettata dalla necessità di ampliare lo spettro d'azione ristretto essenzialmente ai batteri Gram-positivi verso i germi Gram-negativi e nel

tentativo di superare spiacevoli fenomeni di resistenza dovuti per lo più a enzimi inattivanti.

Cefalosporine:

Nel corso degli anni sono state sviluppate un abbondante numero di cefalosporine, le quali presentano un nucleo base costituito dall'acido 7-aminocefalosporanico (anello betalattamico più anello tiazolidinico), sul quale sono possibili tre sostituzioni: sull' NH₂ (potenziamento ed ampliamento dell'attività antibatterica), sul C3 dell'anello tiazolidinico (variazione delle caratteristiche farmacocinetiche), sull'anello betalattamico con introduzione di un gruppo 7-alfa-metossi (resistenza alle betalattamasi) Cefamicine. La classificazione attuale distingue le cefalosporine avvalendosi di criteri quali: via di somministrazione (orale o parenterale), capacità di resistenza all'idrolisi da parte delle betalattamasi batteriche (totale o parziale), immissione in commercio, prerogative e spettro di attività antibatterica (I, II, III, IV). Tra quelle considerate di prima generazione, il riferimento va a *Cefazolina*, *Cefradina*, *Cefalexina* etc.. Appartenenti alla seconda generazione invece, *Cefoxitina*, *Cefuroxime*, *Cefalo* etc.. Di terza generazione, tra cui *Cefotaxime*, *Ceftriaxone*, *Ceftazidime* etc.. Infine, comprese nella quarta generazione si ricorda ad esempio *Cefepime*.

Monobattami:

Strutturalmente sono caratterizzati dall'aver un anello betalattamico solo, cioè non fuso con un altro anello (a differenza dei betalattamici descritti precedentemente). L'unico antibiotico monobattamico disponibile in commercio è l'*Aztreonam*, resistente in maniera relativa alle betalattamasi e attivo nei confronti dei Gram-negativi, privo di attività però verso Gram-positivi e anaerobi.

Carbapenemi:

Rappresentano una classe di antibiotici ad ampio spettro d'azione, buona resistenza alle betalattamasi, attivi nei confronti di molti batteri Gram-positivi e Gram-negativi, aerobi ed anaerobi. Per quanto riguarda la struttura molecolare, sono definiti da una modifica dell'anello tiazolinico tipico delle penicilline già descritte, con l'introduzione di un atomo di carbonio al posto di uno di zolfo.

Di facile disponibilità in commercio risultano farmaci quali: *Imipenem*, *Meropenem*, *Ertapenem*.

1.1.5 Fenomeno di resistenza in *Enterobacteriaceae*

La diffusione di *Enterobacteriaceae* resistenti ad antibiotici quali carbapenemi, rappresenta un'importante problema di sanità pubblica: si tratta infatti, di un fenomeno in notevole aumento negli ultimi anni in molto paesi, rendendo problematica la terapia di molte infezioni, ed è aggravato anche dalla mancanza di nuovi antibiotici in commercio o in fase di sperimentazione. Più nello specifico, in Italia, si è osservato un *trend* in drammatico aumento per quanto riguarda la specie *Klebsiella pneumoniae* appartenente alla famiglia di Enterobatteri, che risultano resistenti ai carbapenemi (es. *Imipenem* e *Meropenem*), farmaci essenziali per la cura di infezioni gravi e causate da batteri multi-resistenti. Numerosi studi confermano tale diffusione come una minaccia per la popolazione, in quanto coinvolti nell'eziologia di molte infezioni sia in ambito ospedaliero che comunitario e, la loro progressiva propagazione rende alquanto problematico il trattamento dei pazienti. Tra i fattori di rischio evidenziati per le infezioni da CPE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*) si ricordano: la gravità delle condizioni cliniche del paziente, la presenza di dati anamnestici quali il trasferimento da altre strutture

ospedaliere, la permanenza in Unità di Terapia Intensiva, un precedente intervento chirurgico, così come il trapianto di midollo o di organi solidi, la presenza di ferite chirurgiche, il cateterismo delle vie biliari e da ultimo ma non meno importante la ventilazione assistita. Attualmente, il più importante elemento che accresce la probabilità di insorgenza di infezioni da CPE è rappresentato dal trasferimento di pazienti ricoverati, o che abbiano ricevuto assistenza medica, in ospedali, anche di altri paesi, con un alto tasso di infezioni da CPE.

Per quanto concerne le *Enterobacteriaceae* esse rappresentano un'ampia famiglia di batteri aventi habitat intestinale nell'uomo e negli animali. Asporigeni, la cui forma richiama quella di un bastoncello (*bacillus*), Gram-negativi, mobili per la presenza di flagelli peritrichi o immobili e quasi costantemente provvisti di pili. Aerobi-anaerobi facoltativi, tranne alcuni stipiti, riducono i nitrati a nitriti. In grado di produrre citocromi se coltivati in aerobiosi e di ricavare energia dalla completa ossidazione dell'acido piruvico attraverso il ciclo di *Krebs*. Tuttavia, privi del citocromo C e, dunque, risultanti sempre negativi al test dell'ossidasi. In anaerobiosi invece, riescono ad utilizzare il glucosio per via fermentativa con conseguente produzione di acidi e talvolta di gas. Queste caratteristiche e l'assenza del citocromo C sono i cardini principali utili a differenziare gli Enterobatteri dagli altri bacilli Gram-negativi.

1.1.6 Betalattamasi

Le betalattamasi sono enzimi batterici capaci di idrolizzare il legame amidico dell'anello betalattamico, tipico di tutti gli antibiotici betalattamici, vanificando completamente le proprietà antibatteriche della molecola. Esse, prodotte dagli stessi batteri, sono considerate la principale causa di resistenza batterica a tali antibiotici.

Per la catalogazione delle betalattamasi è opportuno sfruttare criteri discriminanti, sia essi funzionali sia molecolari. Secondo la classificazione funzionale, si considerano quelle che sono le caratteristiche biochimiche ed enzimatiche per determinare il substrato, oltre alla capacità di idrolisi e gli inibitori. Operando invece, in virtù della classificazione molecolare, ci si basa sull'omologia della sequenza amminoacidica e suddivide le betalattamasi in quattro diverse classi raggruppate sotto le lettere A,B,C & D. Di cui, rientrano nella classe A,C e D le molecole aventi un residuo di Serina essenziale per l'attività idrolitica a livello del sito attivo, inibite da Acido Clavulanico e *Tazobactam*. Appartenenti invece alla classe delle B, quei metallo-enzimi che necessitano per la loro attività catalitica di cofattori come Zinco (Zn), catione bivalente.

Molteplici studi evidenziano betalattamasi codificate da geni cromosomici rispetto ad altre la cui localizzazione è tipica in plasmidi o trasposoni. Per quanto concerne le betalattamasi **cromosomiche** posso essere prodotte in maniera costitutiva o inducibile, quasi ubiquitarie nelle *Enterobacteriaceae* precedentemente l'era antibiotica. Tra le ipotesi, sembra che questi enzimi ricoprano un importante ruolo fisiologico nell'assemblaggio del peptidoglicano. Focalizzando l'attenzione sulle betalattamasi **plasmidiche** ad oggi sono in abbondante aumento, caratterizzate da una variabilità di sequenza piuttosto eterogenea. Tuttavia, è possibile identificarne di prevalenti in Enterobatteri, quali enzima TEM-1 rispetto a geni più rari quali TEM-2, SHV-1 e OXA-1. In continua evoluzione varianti con sostituzioni amminoacidiche limitate (da 1 a 4 amminoacidi), le quali si ripercuotono su una netta trasformazione dell'attività enzimatica delle betalattamasi.

1.1.6.1 Carbapenemasi

Per carbapenemasi si definisce una famiglia di betalattamasi piuttosto versatile, il cui spettro di idrolisi è estremamente ampio nei confronti dei betalattamici. In virtù di quanto detto dunque, tali enzimi sono in grado di conferire una resistenza estesa ai vari betalattamici in circolazione e anche ai carbapenemi (da qui il nome che ne deriva), i quali sappiamo costituire un'importante nicchia nel trattamento antibiotico.

Le carbapenemasi conosciute si distinguono nelle classi A, B e D della classificazione molecolare, nella classificazione funzionale invece si trovano nei gruppi 2f e 3.

Carbapenemasi di classe A

Si tratta di Serina-carbapenemasi, appartenenti al gruppo 2f in grado di idrolizzare numerosi betalattamici inclusi carbapenemi, cefalosporine, penicilline e aztreonam e sono inibiti da clavulanato e tazobactam. Più nel dettaglio ci sono tre grandi famiglie di enzimi, quali: NMC/IMI, SME, KPC e GES. Gli enzimi NMC (*Non Metalloenzyme Carbapenemase*), IMI (*Imipenem hydrolizing beta-lactamase*) e SME (*Serratia Marcescens Enzyme*) risultano codificati da geni cromosomici ed inducibili, il profilo di resistenza dei ceppi che li esprimono è caratteristico: la resistenza ai carbapenemi si associa con una sensibilità alle cefalosporine ad ampio spettro. Invece, gli enzimi KPC (*Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*) discriminano dalle altre famiglie di questa classe in quanto sono codificati da geni plasmidici e per il fatto che come substrati di idrolisi presentano anche cefalosporine, tra cui cefotaxime. Le carbapenemasi KPC idrolizzano betalattamici di tutte le classi, effettuando una idrolisi più efficiente per nitrocefina, cefalotina, cefaloridina, benzilpenicillina, ampicillina, piperacillina. Al contrario, presentano uno spettro d'azione minore per imipenem, meropenem, cefoxitina e ceftazidime. Ultimi membri di questa classe, gli enzimi GES (*Guiana Extended Spectrum*), inizialmente classificati

come ESBL (idrolisi di penicilline e cefalosporine ad ampio spettro) ma un sottogruppo di questi enzimi si è scoperto avere una bassa ma misurabile idrolisi per imipenem ed è quindi stato incluso nelle carbapenemasi a tutti gli effetti. Tali enzimi si collocano su integroni plasmidici e sebbene non siano di facile riscontro ad oggi se ne osservano nove varianti.

Carbapenemasi di classe B

Sono metallo-beta-lattamasi, caratterizzate dalla capacità di idrolisi dei carbapenemici, per la loro resistenza agli inibitori delle betalattamasi (Ac. Clavulanico e Tazobactam) e suscettibilità all'inibizione per i chelanti di ioni metallici come EDTA e Ac. Dipicolinico. Questi enzimi sono suddivisi in tre sottoclassi: B1, B2 e B3 sfruttando come criterio discriminante le caratteristiche strutturali, affinità per lo Zinco per i due siti di legame e le caratteristiche di idrolisi. Specialmente, B1 e B3 differenziano per sequenza amminoacidica e richiedono il legame di due atomi di Zinco per un'idrolisi ottimale, mentre gli enzimi B2 sono inibiti quando un secondo atomo di Zinco si lega al sito attivo. Inoltre, la sottoclasse B2 idrolizza in maniera preferenziale i carbapenemi in contrasto con l'ampio spettro mostrato dagli enzimi delle sottoclassi B1 e B3.

Carbapenemasi di classe D

Questi enzimi rientrano nella famiglia delle OXA beta-lattamasi, descritte funzionalmente come penicillasi in grado di idrolizzare oxacillina e cloxacillina. Sono debolmente inibite da Ac. Clavulanico e Tazobactam, in particolare presentano una grande variabilità di sequenze amminoacidiche. Possiedono un'attività idrolitica nei confronti di penicilline, alcune cefalosporine e scarsa attività per imipenem. La classificazione è stata modificata con la scoperta di una OXA beta-lattamasi avente attività carbapenemasica con la creazione di una sottoclasse apposita. Al primo enzima rilevato ARI-1 (*Acinetobacter Resistant to Imipenem*) rinominato successivamente come OXA-23, si sono affiancate altre proteine, e attualmente si contano nove maggiori sottoclassi di OXA

carbapenemasi. Gli studi di struttura hanno mostrato che a differenza delle OXA beta-lattamasi questi enzimi presentano a livello di sito attivo residui che lo rendono più piccolo e idrofobico favorendo in questo modo l'interazione con i carbapenemi. Per quanto concerne invece, il meccanismo di idrolisi esso rimane sostanzialmente analogo a quello di tutte le serine beta lattamasi. Questi enzimi sono codificati da geni plasmidici e sono stati ritrovati in *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, ed infine in *K. pneumoniae* (OXA-48). Presentano attività idrolitica nei confronti di penicilline, alcune cefalosporine e una scarsa attività carbapenemasi, maggiore per imipenem rispetto a meropenem.

1.2 Epidemiologia delle carbapenemasi

La nascita e la diffusione di enterobatteri multiresistenti ha creato una grande preoccupazione nei servizi sanitari di tutto il mondo. Infatti, le *Enterobacteriaceae* sono ritenuti i microrganismi commensali più numerosi dell'uomo ma rappresentano anche la più comune e frequente causa di infezioni nosocomiali e comunitarie. Tale constatazione è avvalorata dalla loro capacità di diffondere facilmente e acquisire materiale genetico tramite meccanismi di *gene transfer* orizzontale, mediati principalmente da plasmidi e trasposoni.

L'andamento epidemiologico delle CPE a livello globale appare ad oggi molto variegato con differenze significative tra paesi; in alcuni casi si sono verificate epidemie di larga scala che hanno coinvolto numerosi ospedali di una stessa regione, in altri contesti la presenza di questi microrganismi è divenuta endemica mentre vi sono paesi in cui il fenomeno è emergente.

Più nel dettaglio, nella regione europea i dati ECDC rilevano che la diffusione delle CPE è generalmente in crescita e presente in modo endemico in Grecia, Italia e Turchia; in altri nove paesi è segnalata la diffusione inter-regionale. Inoltre, numerosi studi epidemiologici internazionali rivelano come oltre le nazioni descritte precedentemente, altre abbondantemente colpite siano Stati Uniti d'America, Israele, Porto Rico, Colombia e sub-continente indiano. A

giugno 2015 c'è stata un'importante segnalazione dalla Francia e da Malta di casi da infezione da CPE, in strutture ospedaliere in pazienti provenienti dalla Libia. Pertanto, il fenomeno di resistenza ai carbapenemi merita un'importante attenzione da parte delle autorità sanitarie europee, considerando l'elevata mobilità della popolazione (turisti, lavoratori, pazienti) all'interno dell'Europa e la difficoltà nel contenere l'epidemic diffusion di CPE.

Ovunque si notano *trend* in crescita o stazionari: in Italia la diffusione di *K. pneumoniae* produttrice di KPC è endemica (fig. 1.3) ed è stimata essere un terzo (32,9%) delle infezioni invasive (sangue e liquor) da *K. pneumoniae*. Al contrario per *E. coli* produttore di KPC è presente un minore riscontro.

Più nello specifico, i tipi di carbapenemasi più diffusi tra le *Enterobacteriaceae* sono la KPC (*K. pneumoniae Carbapenemase*), appartenente alla classe A, e in misura minore ma crescente la OXA-48, classe D, distribuite in modo differente tra i vari paesi. Ulteriori carbapenemasi rilevate appartengono alla classe B delle metallo beta-lattamasi: le NDM (*New Delhi metallo beta-lactamase*), anch'esse in aumento, sono attualmente causa di *outbreak* ospedalieri sporadici, le VIM (*Verona Integron-encoded metallo beta-lactamase*) e raramente le IMP (*Imipenemase*).

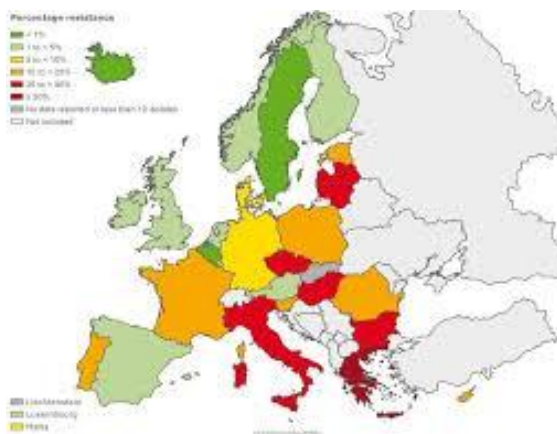


Fig. 1.3: Distribuzione geografica KPC

1.3 Modalità di prevenzione della trasmissione

La modalità per trasmettere enterobatteri produttori di carbapenemasi avviene principalmente in due sensi: direttamente da un paziente portatore a un'altra persona, oppure, attraverso l'ambiente circostante. Rispettivamente, la prima situazione può accadere ad esempio, se una persona tocca il portatore con le mani e poi le porta alla bocca o tocca qualunque oggetto o i suoi indumenti prima di aver lavato accuratamente le mani. L'ambiente diventa invece veicolo di infezione se il paziente portatore, con le mani non pulite tocca la superficie di un mobile o di un corrimano o di un qualsiasi altro oggetto nella stanza e questo a sua volta prima di essere pulito e disinfettato viene toccato da un'altra persona.

Esperienze in singoli ospedali o in interi paesi hanno dimostrato come sia possibile eradicare o contenere fortemente la diffusione attraverso interventi aggressivi di controllo delle infezioni in ambito sanitario, mirati ad identificare tempestivamente i casi di infezioni clinicamente manifeste ed i colonizzati (per ogni caso clinico si stimano da 3 a 5 pazienti colonizzati) ed a adottare celermente misure stringenti di contenimento della diffusione. A questo proposito sono state messe a punto linee guida da numerosi istituzioni internazionali (*Centers for Disease Control; Health Protection Agency; European Centre for Disease, Prevention and Control*): le strategie indicate sono omogenee e tutte queste linee guida sottolineano l'importanza di reagire opportunamente ed efficacemente, prima che la diffusione sia arrivata a livelli tali da potere essere bloccata solo a costo di interventi molto complessi ed onerosi.

Qualora in una realtà ospedaliera emerga un caso di infezione o di colonizzazione da enterobatteri produttori di carbapenemasi, oltre ad acquisire dati pregressi utili a valutare eventuali altri casi nel passato, si deve predisporre un piano di sorveglianza attiva che prevede due tipi di strategie (A e B) per l'individuazione dei soggetti colonizzati.

-Strategia A: si esegue uno *screening* di tutti i contatti dei casi indice e dei casi secondari; tra i contatti si annoverano i pazienti gestiti dalla stessa *equipe* assistenziale (cioè il personale infermieristico e medico o altre figure aventi contatti stretti e ripetuti) che ha in carico altri casi.

-Strategia B: negli ospedali dove sono presenti molti casi potrebbe essere necessario ottimizzare la selezione dei contatti da sottoporre a *screening* includendo solo quelli a più alto rischio di colonizzazione. Dunque, adattando la strategia di *screening* al caso, ci si può orientare in due direzioni. Se il caso è autosufficiente, dovranno essere sottoposti a *screening* soltanto quei pazienti che sono stati degenti nella stessa stanza del caso; se il caso è allettato lo *screening*, oltre che ai compagni di stanza, dovrà essere esteso anche a tutti i soggetti allettati del reparto.

Alla luce di quanto descritto, al fine di arginare lo *spreading* di CPE, diventa dunque indispensabile durante il ricovero in ospedale rispettare alcune semplici regole, quali: isolamento dei casi, limite del numero di persone e degli accessi nella stanza del paziente, pulizia e decontaminazione ambientale, adeguato utilizzo dei DPI (dispositivi di protezione individuale come guanti e sovracamice) ed igiene delle mani. Tra quelle citate la misura più efficace e basilare per evitare il contagio è rappresentata da un'accurata e scrupolosa igiene delle mani (fig.1.4).



Fig. 1.4: Le “8” regole per un lavaggio accurato delle mani

1.4 Tecniche microbiologiche per l’identificazione di Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE)

La diagnostica microbiologica effettuata presso U.O Microbiologia Centro Servizi – Area Vasta Romagna, risulta fondamentale sia dal punto di vista epidemiologico che dal punto di vista clinico, in quanto rappresenta un punto cardine per la corretta scelta della terapia antibiotica. Essa prevede un primo *step* di *screening* per individuare i pazienti colonizzati, a cui segue un ulteriore *step* di conferma fenotipica e/o genotipica. Chiaramente, la selezione dei pazienti da sottoporre a tale *screening* così come la sua frequenza, possono variare a seconda del programma di sorveglianza adottato, in funzione dei diversi contesti epidemiologici e organizzativi locali. Lo *screening* dei pazienti colonizzati viene effettuato mediante un semplice esame colturale di un campione prelevato con tampone in sede rettale, nonostante vi sia anche la possibilità di colonizzazione anche a livello cutaneo, orale, respiratorio ed urinario. Quindi, il tampone è strisciato sulla superficie di un opportuno terreno cromogeno e selettivo per bacilli Gram-negativi. Dunque, nella zona di semina più densa è posizionato un dischetto di meropenem (10 µg). Si considerano sospette le colonie aventi una morfologia tipica per *Enterobacteriaceae*, in grado di crescere all’interno dell’alone di inibizione della crescita batterica,

avente diametro ≤ 23 mm. Tale pratica comunemente utilizzata dal Laboratorio di Pievesestina possiede più vantaggi, tra i quali:

-lettura dei risultati dopo 18-24 ore circa, da cui scaturisce la potenzialità di comunicare rapidamente al reparto ospedaliero un risultato presuntivamente positivo;

-facile riconoscimento delle colonie sospette e conseguente contenimento dell'utilizzo dei test di conferma;

-identificazione presuntiva di specie;

-costi relativamente discreti.

1.4.1 Identificazione e Antibiogramma (Abg)

Nella comune pratica di laboratorio, successivamente la selezione delle colonie presenti sulle piastre mediante un opportuno tampone, la manipolazione del campione si riduce alla preparazione della sospensione batterica con una soluzione fisiologica sterile avente una torbidità pari a circa 0.5 *McFarland*, misurata mediante un opportuno densitometro (*DensiCheck BioMérieux*) (fig.1.5).



Fig. 1.5: *DensiCheck BioMérieux*

Quindi, attraverso la *Smart Carrier Station (SCS)*, ovvero, un discreto *computer* dotato di lettore di codice a barre, si associano le informazioni sulle *card* che vengono utilizzate per l'identificazione e per i *test* di sensibilità agli

antimicrobici con i campioni da analizzare, garantendo perciò la totale tracciabilità delle determinazioni. Concretamente, le provette contenenti la sospensione batterica sono caricate in apposite cassette dotate a loro volta di *microchip*, il quale andrà a trasferire tutte le informazioni all'incubatore che fungerà dunque da analizzatore. A questo punto, le cassette sono inserite nel carrello trasportatore dello strumento: i processi di inoculazione, incubazione e lettura avvengono in maniera automatizzata, cioè sono guidati dallo strumento e dal *software* del *computer*. Completato il processo, le *card* sono eliminate in un adeguato contenitore. Più nel dettaglio, le *card* VITEK 2 utilizzate per l'identificazione e l'antibiogramma, sono caratterizzate da una serie di pozzetti con all'interno la presenza di reagenti biochimici e diversi antibiotici a concentrazioni crescenti, quindi nella *card* di identificazione è immesso un tubicino atto a trasferire la sospensione batterica. Si intende una *card* di identificazione formata da 30 pozzetti con substrati biochimici fluorescenti in forma disidratata. L'identificazione dei microrganismi avviene attraverso diverse prove biochimiche, mentre la lettura delle prove di sensibilità si verifica in turbidimetria. Dunque, lo strumento rileva il pozzetto in cui la crescita del microrganismo viene inibita dall'antibiotico e i risultati sono espressi in termini di Minima Concentrazione Inibente (MIC). Pertanto, in base ai valori assunti dalla MIC, il ceppo batterico può trovarsi nella categoria di Sensibile, Intermedio o Resistente. Come completamento indispensabile del VITEK 2 si ha l'*Advance Expert System* (AES), si tratta di un particolare *software* innovativo basato su tre fasi di azione ed in grado di analizzare in profondità i risultati dei *test* di identificazione ed antibiogramma, quali:

- la conferma biologica della qualità dei risultati *in vitro* dal punto di vista tecnico,
- l'interpretazione terapeutica: cioè l'interpretazione del risultato per facilitare e migliorare la terapia,

- l'aggiunta sistematica di consigli che il microbiologo desidera comunicare al clinico.

L'AES ad esempio può segnalare risultati non coerenti, suggerire eventuali correzioni di MIC o cambiamenti delle Categorie di Interpretazione. Pertanto, si deduce come esso dia un enorme contributo al laboratorio, aiutando il microbiologo a controllare le diverse popolazioni batteriche, l'eventuale sviluppo di modelli di resistenza e fornire quindi informazioni clinicamente rilevanti.

Conseguentemente l'ID, si fa riferimento all'antibiogramma (Abg): si tratta di un *test in vitro* che va a saggiare il profilo di sensibilità batterica a vari antibiotici, esponendo una concentrazione *standard* dell'agente eziologico in esame ad una serie di concentrazioni scalari e definite di farmaci. Dunque, esso agisce con la pretesa principale di predire il risultato clinico di un trattamento antimicrobico con il farmaco saggiato. Più nel dettaglio, l'Abg rappresenta un esame molto utile ed importante, nella misura in cui permette di determinare la terapia più appropriata e mirata al quadro clinico del singolo paziente a partire dal material biologico prelevato.

Nella pratica clinica quotidiana, l'allestimento dell'antibiogramma è affidato a sistemi automatici in grado di calcolare la MIC (concentrazione minima inibente), ovvero, la più bassa concentrazione di farmaco in grado di bloccare la crescita *in vitro* del microrganismo saggiato, andando così ad esprimere il livello di sensibilità del microrganismo a diversi antibiotici. A questo punto, ottenuta la MIC si sfrutta il parametro del confronto, cioè, tale concentrazione minima inibente è rapportata a *breakpoints* o altrimenti noti come valori soglia stabiliti da alcune istituzioni scientifiche per le diverse combinazioni microrganismo-antibiotico. Tali *breakpoints* sono fissati in funzione di un insieme piuttosto complesso di parametri:

microbiologici (es. distribuzione delle MIC o degli aloni di inibizione dei ceppi selvaggi – *wild type*, cioè privi di meccanismi di resistenza acquisiti),

farmacologici (es. dosaggio del farmaco terapeuticamente utilizzabile e concentrazioni sieriche ottenibili),

clinici (es. studi di efficacia clinica).

In particolare, per la lettura dell'antibiogramma, ci si avvale di vari *standard* armonizzati dall'anno 2011 in un unico sistema europeo ad opera di EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* – Comitato Europeo per i *Test* di Sensibilità agli Antibiotici). Attraverso il confronto con il *breakpoint*, i risultati ottenuti possono essere tradotti nelle così definite Categorie di Interpretazione (fig.1.6):

S (sensibile): quando un ceppo batterico viene inibito *in vitro* da una concentrazione di antibiotico che si associa ad un'alta probabilità di successo terapeutico.

I (intermedio): quando un ceppi batterico viene inibito *in vitro* da una concentrazione di antibiotico che si associa ad una probabilità incerta di successo terapeutico.

R (resistente): quando un ceppo batterico viene inibito *in vitro* da una concentrazione di antibiotico che si associa ad un'alta probabilità di fallimento terapeutico.

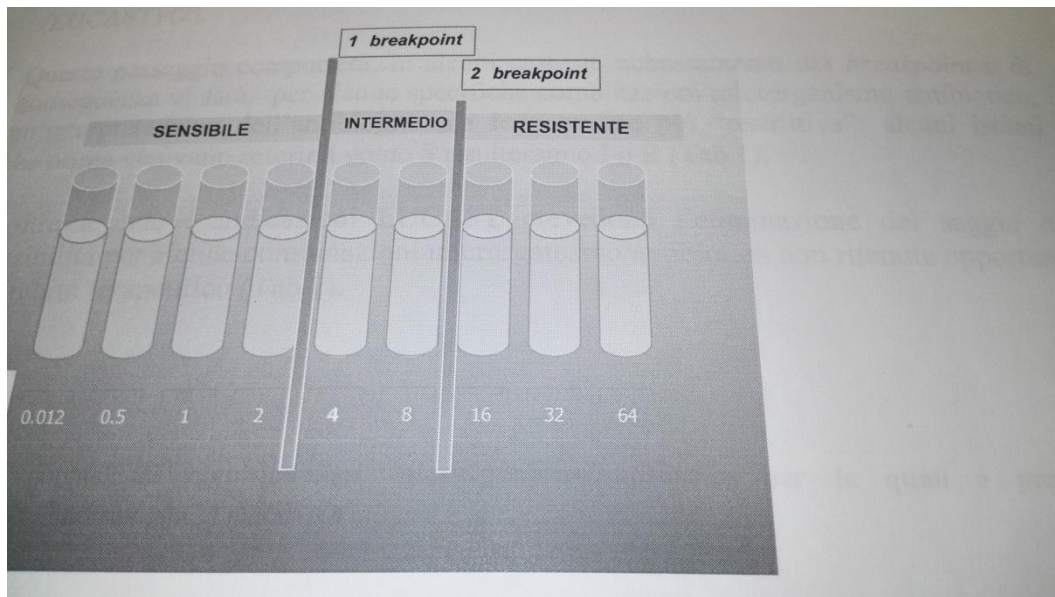


Fig. 1.6: Breakpoints e Categorie di Interpretazione

Per ogni combinazione microrganismo-antibiotico vengono fissati due *breakpoints* (se sono previste tre categorie di interpretazione: S-I-R) o un solo *breakpoint* (se sono previste due categorie di interpretazione: S-R). Tali *breakpoints* sono definiti dalle concentrazioni espresse in $\mu\text{g/mL}$.

Allo scopo di riconoscere i ceppi carbapenemici resistenti, sono testati antibiotici quali *meropenem*, *imipenem*, *ertapenem* (tabella 1.7)

Tabella 1.7: Definizione di *breakpoints* per carbapenemi secondo EUCAST

ANTIBIOTICO	EUCAST	
	S_≤	R_≥
<i>Meropenem</i>	2	8
<i>Ertapenem</i>	0,05	1
<i>Imipenem</i>	2	8

Il tempo medio necessario per un *test* di antibiogramma è di circa 5-7 ore con un *range* di 2-18 ore: in particolare, si può sottolineare come il tempo varia a seconda del gruppo di microrganismi esaminati ed è in grado di coprire un intervallo esteso di MIC con speciale attenzione alla rilevazione di resistenze emergenti. (fig. 1.8) Inoltre, lo strumento possiede un *software* “*Window*” semplice e intuitivo per aiutare a gestire rapidamente i risultati, infatti, consente una ricerca rapida per paziente, settore, data, microrganismo, operatore, numero di accesso, dotato di una validazione e refertazione automatica dei risultati.

ANTIBIOTICO	CMI mg/L (S/I/R)
AMPI/SULBACTAM	32 R
PIP/TAZOBACTAM	128 R
CEFTRIAXONE	64 R
CEFTAZIDIME	64 R
CEFEPIME	64 R
ERTAPENEM	32 R
IMIPENEM	32 R
MEROPENEM	32 R
AZTREONAM	64 R
AMIKACINA	64 R
GENTAMICINA	2 S
TOBRAMICINA	16 R
CIPROFLOXACINA	4 R
FOSFOMICINA	32 S
TIGECICLINA	2 I
COLIMICINA	0,4 S
KLEBSIELLA PNEUMONIAE KPC	

Fig. 1.8: Esempio di antibiogramma (Abg) per un isolato di *Klebsiella pneumoniae*, sospetta CPE

1.4.2 Test di screening per riconoscere i soggetti colonizzati

Al fine di individuare agevolmente gli enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE), si eseguono specifici test di screening che vanno a sfruttare determinati terreni cromogeni e selettivi, i quali permettono di isolare e differenziare le singole specie batteriche su piastra. Pertanto si utilizzano:

ChromID® CARBA agar (BioMérieux)

Lo *screening* si effettua mediante la semina del tampone rettale su *agar*, caratterizzato da un carbapenemico modificato secondo i criteri adottati da EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – Comitato Europeo per i Test di Sensibilità agli Antibiotici*), garantendo risultati affidabili con un'elevata varietà di CPE. In particolare, il terreno contiene due cromogeni che consentono di distinguere *Escherichia Coli*, che si colora di rosa, rispetto a *Klebsiella pneumoniae* la quale si colora di blu (fig. 1.9), mentre le

colonie batteriche non resistenti a carbapenemi rimangono bianche o più semplicemente pigmentate naturalmente.

Tale terreno colturale costituisce un mezzo di screening efficace, permettendo la rilevazione di enterobatteri produttori di carbapenemasi in sole circa 16-24 ore. Ne segue pertanto, l'applicazione celere di quelle che sono le buone pratiche per tenere sotto controllo l'infezione ed impedire quindi lo *spreading* della resistenza.

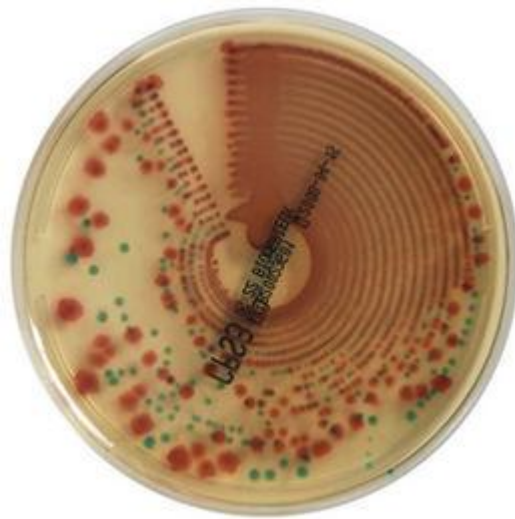


Fig. 1.9: Isolati di E.coli (rosa) e K.pneumoniae (blu) su piastra di *ChromID*[®] CARBA agar

ChromID[®] ESBL agar (BioMérieux)

Lo *screening* prevede l'aggiunta al momento della semina, di un dischetto di un carbapenemico, precisamente *Meropenem*, rendendolo specifico nei confronti dei ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi. Quindi, le colonie cresciute all'interno dell'alone di inibizione del *Meropenem* e definite perciò presunte "sospette", saranno successivamente caratterizzate attraverso identificazione (Id), antibiogramma (Abg) ed eventuali test di conferma

fenotipica e genotipica. Si tratta di piastre costituite da un terreno di coltura in grado di rilevare selettivamente e in tempi veloci, pari a circa 18-24 ore, ceppi produttori di betalattamasi a spettro esteso (ESBL). Questo terreno possiede la peculiarità di essere cromogeno, ovvero, nello stesso mezzo su cui avviene lo sviluppo e la presumibile crescita del microrganismo, sono stati inclusi una serie di substrati cromogeni per l'evidenziazione di carbapenemasi prodotti ad esempio da batteri come, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, i quali risulteranno sotto forma di colonie rispettivamente dal colore rosa a *bordeaux* e di colorazione blu (fig. 1.10)



Fig. 1.10: Isolati di E.coli (rosso) e K.pneumoniae (blu) su piastra di ChromID[®] ESBL agar

1.4.3 Test di conferma fenotipica

Attualmente, la conferma fenotipica della produzione di Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) rappresenta uno dei maggiori problemi di interpretazione dell'antibiogramma (Abg). A tutt'oggi molti laboratori di microbiologia non si servono di un unico *test* fenotipico risolutivo per tutti i casi possibili, ma si avvalgono dell'utilizzo combinato di molteplici *test* per

consentire il riconoscimento del tal meccanismo di resistenza con buona sensibilità e specificità, tra questi si ricorda ad esempio il *test* di *Hodge* modificato, descritto qui di seguito.

Test di Hodge modificato

Si basa sulla riduzione dell'attività del carbapenemico saggiato nei confronti del ceppo indicatore sensibile, mediata dalla carbapenemasi prodotta dal microorganismo in esame. Tra i vantaggi: facile esecuzione, economico, caratterizzato da reagenti e dispositivi richiesti di ampia reperibilità. Per quanto concerne i limiti, invece:

- a. non permette la distinzione fra carbapenemasi appartenenti alle diverse classi ma evidenzia solo la presenza di attività carbapenemasi,
- b. risulta difficilmente standardizzabile, l'interpretazione dipende dal giudizio dell'operatore e dal suo grado di esperienza.

Questi svantaggi fanno del *test* di *Hodge* un test di seconda scelta o di supporto per casi dubbi.

In virtù di quanto descritto precedentemente, il laboratorio di microbiologia di Pievesestina ha scelto di avvalersi pertanto del *test* di sinergia mediante disco di diffusione, dotato di maggiore accuratezza in quanto in grado di discriminare tra le diverse carbapenemasi.

Per quanto riguarda dunque, la conferma fenotipica, essa è in grado di evidenziare l'azione degli antibiotici sulla crescita batterica rilevando il fenotipo di resistenza e andando perciò, a riflettere l'espressione della resistenza stessa, codificata dal materiale genetico.

Tra i criteri di selezione dei ceppi che devono essere testati per la conferma fenotipica e genotipica, il Comitato Europeo EUCAST ha stabilito che gli

enterobatteri dovrebbero essere valutati clinicamente sensibili a *Imipenem* se la MIC è $\leq 2 \mu\text{g/mL}$; si ricorda inoltre, come con questi *breakpoints* alcuni ceppi produttori di carbapenemasi sono considerati sensibili e devono essere riportati come tali, cioè, la presenza o assenza di carbapenemasi non influenza di per sé la corrispondenza a marcata sensibilità. Interessante apprezzare come, tra le indicazioni fornite dal Comitato di Studio degli Antimicrobici dell'AMCLI (2012), si raccomanda di sottoporre a conferma fenotipica i ceppi di enterobatteri aventi una MIC $\geq 5 \mu\text{g/mL}$ per *Meropenem*.

In aggiunta, a dispetto di quanto ottenuto dall'antibiogramma automatico, per definire con certezza la produzione di carbapenemasi occorre procedere con la conferma fenotipica, che come già accennato prima, nel laboratorio di microbiologia di Pievesestina è ottenuta, attraverso il *test* di sinergia mediante disco di diffusione.

Test di sinergia mediante disco di diffusione per identificazione di carbapenemasi

Si tratta di un *test* eseguito su piastra, su cui viene valutata la crescita di un ceppo potenzialmente produttore di carbapenemasi in presenza di un antibiotico carbapenemico e di diversi inibitori per le carbapenemasi.

Tra i vantaggi, il *test* risulta essere di semplice esecuzione e permette la caratterizzazione fenotipica delle varie tipologie di resistenza. Si ricorda invece, come limite principale il fatto che attraverso questo *test* non si verifica il riconoscimento della produzione di carbapenemasi di tipo OXA, individuabili in alternativa accertando un fenotipo di resistenza alla temocillina.

In particolare, si ricorda come la produzione di carbapenemasi KPC è positiva, se il diametro della zona di inibizione della crescita attorno al dischetto di *Meropenem* con APBA e a quello con entrambi AFBA (acido amino-fenil-

boronico) e DPA (acido dipicolinico) è ≥ 4 mm rispetto a quello del disco di *Meropenem* senza inibitori (tabella 1.11).

Tabella 1.11: Schema per l'interpretazione del *test* secondo il metodo di combinazione

Ceppi non produttori di KPC (< 4 mm)	Ceppi produttori di KPC (≥ 4 mm)
(alone <i>Meropenem</i> + AFBA) alone <i>Meropenem</i>	(alone <i>Meropenem</i> + AFBA) alone <i>Meropenem</i>
(alone <i>Meropenem</i> + AFBA + DPA) alone <i>Meropenem</i>	(alone <i>Meropenem</i> + AFBA + DPA) alone <i>Meropenem</i>

1.4.4 Test di conferma genotipica

Si ricorre ai *test* di conferma genotipica in caso di eventi epidemici urgenti e immediati oppure, nell'eventualità si abbia una dubbia interpretazione dei *test* di conferma fenotipica descritti precedentemente. Quindi, ci si avvale dell'ausilio di una serie di metodiche di amplificazione molecolare, la cui peculiarità consiste nella capacità di amplificare una esigua quantità di sequenze *target* specifiche, presenti in concentrazioni piuttosto discrete rispetto a quello che è il limite di vari metodi convenzionali.

Per quanto concerne dunque la caratterizzazione molecolare, ad esempio, in caso di analisi fenotipica sospetta per ceppi produttori di KPC (riscontrati per la maggior parte in questo studio), tali ceppi saranno analizzati mediante il *test EasyQ KPC*, il quale è in grado di individuare in maniera diretta la presenza del gene codificante per l'enzima. A differenza di campioni in cui vi sono geni di

resistenza sospetti MBL per i quali si procede alla caratterizzazione molecolare per evidenziare il tipo di gene presente nell'isolato.

Test EasyQ KPC

Come già accennato precedentemente, il presente *test* è in grado di rilevare direttamente il gene bla_{kpc} dagli estratti di acidi nucleici batterici, pertanto, rappresenta un importante mezzo di ricerca per evidenziare ma al contempo confermare il tal meccanismo di resistenza.

Concretamente, il *test* andrà ad analizzare tamponi rettali e colonie batteriche provenienti da campioni di urine.

La procedura analitica si avvale di due fasi principali così distinte:

1. Estrazione NucliSENS® *easyMAG*® per isolare gli acidi nucleici dai campioni.
2. Amplificazione e rilevazione NASBA™ in *real time* dell'RNA *target* della KPC presente negli acidi nucleici.

1.Estrazione NucliSENS® *easyMAG*®

Questa prima fase prevede l'estrazione vera e propria degli acidi nucleici dai campioni, attraverso l'utilizzo di un particolare agente caotropico il quale possiede la capacità di rompere i legami idrogeno delle proteine con conseguente denaturazione del substrato. In particolare, l'estrazione di acidi nucleici sarà osservata costantemente addizionando un controllo interno sintetico. Quindi, una volta lisato il campione vengono aggiunte una serie di particelle di silice magnetica alle quali si andranno ad ancorare gli acidi nucleici rilasciati. A questo punto, si procede al lavaggio atto a rimuovere la silice magnetica prima che gli acidi nucleici vengano eluati dalla fase solida. Infine, si avanza con l'amplificazione.

2. Amplificazione e rilevazione NASBA™ in *real time*

La medesima fase sfrutta il metodo NASBA™, una tecnica isotermica (cioè la reazione di amplificazione avviene ad una temperatura costante pari a 41°C) che consente di amplificare sequenze *target* di DNA o RNA, mediante un protocollo che si avvale di processi quali: trascrizione, a seguito dell'inserzione di un promotore T7, contenuto nel *primer* specifico. Come risultato si avrà la sintesi di RNA a singolo filamento. Si tratta di una tecnica piuttosto versatile e comoda per applicazioni che prevedono specifiche amplificazioni per sequenze di acidi nucleici di genomi virali o genomi di agenti patogeni, infettanti, o determinanti mRNA cellulari. Essenzialmente, gli enzimi coinvolti sono tre:

- a. AMV Trascrittasi Inversa: per la sintesi di Cdna
- b. RNasi H: per la degradazione dell'RNA nell'eteroduplex RNA-DNA
- c. T7 RNA polimerasi: per la sintesi di RNA a partire dal promotore T7

La rilevazione del segnale avviene tramite l'ausilio di una serie di sonde specifiche, altrimenti note sotto l'epiteto di sonde *molecular beacon* (a faro molecolare) (fig.1.12) caratterizzate da una particolare struttura formata da una forcina e un'ansa. Queste possiedono alle loro estremità due tipi differenti di molecole: una denominata *reporter*, la quale emette una certa fluorescenza e un'altra molecola definita *quencher*, in grado di spegnere l'emissione di fluorescenza emessa dalla molecola precedente, quando la distanza tra le due è piuttosto breve.

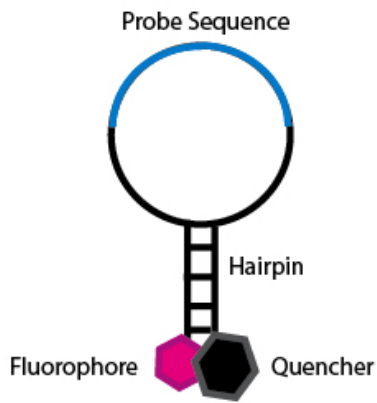


Fig. 1.12: Sonda *molecular beacon*

Specialmente, la sequenza nell'ansa della sonda è specifica e risulta complementare alla sequenza presente sull'acido nucleico bersaglio. Dunque, il *beacon* si lega alla sequenza bersaglio ed essendo il *quencher* e il *reporter* ad una distanza elevata, si avrà come conseguenza primaria una netta emissione di fluorescenza. A questo punto, tramite l'opportuno rilevatore identificato nel NucliSENS® *easyQ*® System, si potrà andare a misurare la fluorescenza ottenuta in tempo reale, rappresentata a livello grafico da una determinata curva sigmoidea (fig.1.13)

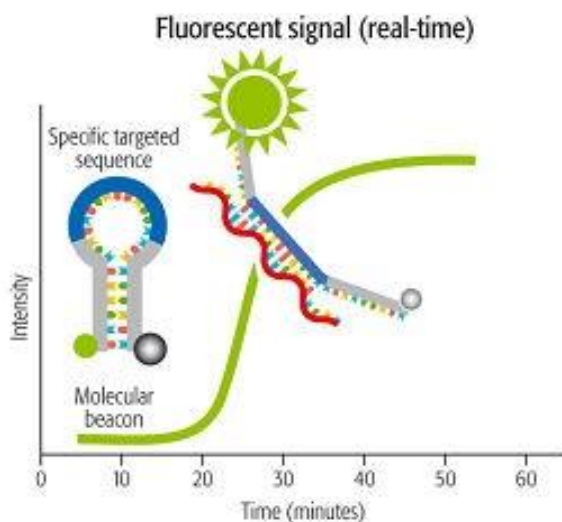


Fig. 1.13: Rilevazione segnale in *real time*

In questo modo pertanto, si effettua un monitoraggio continuo e costante sull'emissione di fluorescenza. Si ricorda inoltre, come la tempistica necessaria per la reazione di amplificazione e rilevamento per un'analisi tipica sia di circa 60 minuti.

Invece, per quanto concerne la caratterizzazione molecolare dei ceppi produttori di metallo-betalattamasi (MBL), una volta considerato il sospetto fenotipo MBL, a conferma della determinazione del gene coinvolto nel meccanismo di resistenza si sfrutta la classica reazione di PCR (reazione di polimerasi a catena) di tipo *end-point*. Concretamente, dopo aver effettuato l'estrazione del campione attraverso il sistema NucliSENS® *easyMAG*®, al fine di evidenziare l'eventuale presenza di: Bla_{NDM}, Bla_{IMP}, Bla_{VIM}, sono preparate una serie di reazioni singole. Quindi, i prodotti di reazione saranno osservabili su gel di agarosio, caratterizzato da bande che, per ogni gene valutato, presenteranno un peso molecolare specifico e distintivo.

1.5β Carba Test per rapido rilevamento di Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE)

Principio del test

Il β Carba è un *test* colorimetrico che permette il rapido rilevamento (15-30 minuti) dei ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (CPE).

Il test è basato sull'uso di un substrato cromogeno che cambia dal colore originario giallo ad un secondo colore (arancione o rosso o porpora) se l'isolato batterico produce carbapenemasi (in questo caso il test è da considerare positivo). La miscela cromogena contiene il carbapenemico (IMIPENEM); in presenza di CPE si ha la lisi dell'anello beta lattamico dell'antibiotico che comporta un cambiamento di pH causando un viraggio della soluzione.

Al contrario, se non si osservano cambiamenti di colore, il test è da considerare negativo ovvero l'isolato non è considerato un produttore di carbapenemasi.

Al contrario, se non si osservano cambiamenti di colore, il test è da considerare negativo ovvero l'isolato non può essere valutato come produttore di carbapenemasi.

A partire dagli isolati batterici, il *test* viene eseguito in tre fasi:

1. raccogliere diverse colonie recenti e ben isolate;
2. mescolare le colonie raccolte con i reagenti;
3. osservare un cambiamento di colore (entro 15 minuti o 30 minuti a 37°C)

Interpretazione e analisi risultati

Per quanto concerne la lettura del *β Carba Test*, se si osserva un cambiamento di colore da giallo ad arancione, rosso o porpora a 15 minuti e 30 minuti, il risultato è da considerarsi positivo. Se non si osservano cambiamenti di colore rispetto al T0 ed entro i 30 minuti, il risultato è da considerarsi negativo (fig.1.5).

Nel confronto tra i risultati del *test β Carba* e il *Gold standard*:

I risultati sono concordanti se:

- ❖ conferma di produzione di carbapenemasi e positività del *test β Carba*;
- ❖ assenza di produzione di carbapenemasi e negatività del *test β Carba*.

I risultati sono discordanti se:

- ❖ conferma di produzione di carbapenemasi e negatività del *test*;
- ❖ assenza di produzione di carbapenemasi e positività del *β Carba*.

Quindi si effettua un duplice calcolo:

Calcolo della sensibilità (a 15 e 30 minuti) = numero di CPE con un *test β Carba positivo* / numero totale di CPE

Calcolo della specificità = numero di isolati non produttori di carbapenemasi con un *test β Carba* negativo / numero totale di isolati non produttori di carbapenemasi

Limitazioni del *test*

Tra i limiti principali del *test β Carba* si ricordano:

- l'utilizzo di colonie di *Enterobacteriaceae* isolate da *agar Mac Conkey*, non sono consigliate *agar CLED*, BCP O EMB.
- non è possibile eseguire il test su colonie la cui miscela a T0 assuma colorazione arancione chiaro, rosso o porpora.
- alcuni ceppi che producono carbapenemasi di tipo IMI e GES non sono rilevabili.

2. OBIETTIVI DELLA TESI

La diffusione delle infezioni da *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (CPE) rappresenta un motivo di grande preoccupazione nell'UE visto che le opzioni alternative per il trattamento di pazienti infetti sono limitate. In particolare, il trattamento ottimale delle infezioni dovute ai ceppi di *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli* risulta essere piuttosto incerto, rappresentando così una vera e propria minaccia in sanità pubblica.

Specialmente, negli ultimi dieci anni si è assistito ad un incremento notevole di casi o focolai di infezioni da CPE in molti paesi del mondo.

Intressante apprezzare come in Italia, la frequenza per KPC (*Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi), è aumentata dall'1.3% nel 2009 al 25% nel 2015. Pertanto, si può spiacevolmente sostenere come la suddetta nazione si collochi al secondo posto come maggiore frequenza di KPC, subito dopo la Grecia (25-50%).

Pertanto, in virtù di quanto descritto, diventa indispensabile implementare gli studi di farmaco-resistenza per valutare e ridurre il potenziale di crescita di tali microrganismi. Più nel dettaglio, il fine ultimo del presente elaborato verte a:

- stimare la *performance* del β Carba Test, metodo cromogeno che consente il rapido rilevamento (15-30 min) dei ceppi di *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (CPE), su stipiti batterici già presenti presso l'Unità Operativa Microbiologia Laboratorio Unico del Centro Servizi AUSL della Romagna, saggiando tra i criteri di valutazione specificità, sensibilità, tempi di lettura, facilità di utilizzo, interpretazione e utilizzo;

- comparare i risultati ottenuti dal tale *test* con quelli ricavati dalle classiche metodiche di analisi microbiologiche per il rilevamento di enterobatteri produttori di carbapenemasi, quali antibiogramma, test di conferma fenotipica e genotipica.

Questo studio di natura retrospettiva è di tipo esclusivamente qualitativo in quanto osservazionale, poiché i risultati non vengono utilizzati per modifiche nel trattamento terapeutico dei pazienti. Si tratta di uno studio condotto su 412 campioni completamente anonimizzati mediante le procedure di anonimizzazione utilizzate dall'UOM. Rientrano nell'oggetto di studio:

-50 ceppi di CPE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*) isolati da emocolture positive per batteri Gram-negativi,

-250 ceppi di CPE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*) isolati da campioni di urine. Tra questi, 200 isolati provenivano da uno *screening* generale, mentre i restanti 50 sono stati selezionati per reparto ospedaliero a maggiore incidenza di CPE (lungo degenza, geriatria, medicina interna *etc.* ..),

-112 ceppi di CPE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*) isolati da tamponi rettali di sorveglianza.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio e campioni analizzati

Attraverso il β Carba Test si effettua uno studio retrospettivo che prevede l'utilizzo di isolati batterici conservati presso l'Unità Operativa di Microbiologia (UOM) del Centro Servizi del Laboratorio Unico dell'AUSL della Romagna. Lo studio è condotto su isolati batterici che sono completamente anonimizzati mediante le procedure di anonimizzazione utilizzate dall'UOM. Si precisa inoltre, che lo studio è esclusivamente di tipo qualitativo in quanto osservazionale, poichè i risultati non vengono utilizzati per modifiche nel trattamento terapeutico dei pazienti. I risultati ottenuti dal β Carba Test saranno comparati, in un secondo momento, con quelli dei test di suscettibilità antimicrobica routinariamente utilizzati nel laboratorio per il rilevamento di ceppi produttori di carbapenemasi e i cui risultati sono già disponibili presso l'UOM. Il *gold standard* è la conferma di produzione di carbapenemasi. Quest'ultima è ottenuta in *routine* nel laboratorio tramite l'utilizzo di Vitek-II® e di MicroScan WalkAway (Siemens) per colonie selezionate. Per ogni isolato raccolto, vengono definite l'identificazione batterica (ID) e il tipo di resistenza (KPC, MBL, OXA48). Chiaramente, in caso di discordanza tra il *gold standard* e il β Carba Test, saranno eseguiti ulteriori test di conferma. Infine, si ricorda come ogni ceppo risultato “falso negativo” o “falso positivo” con il β Carba Test è inviato alla ditta produttrice Bio-Rad.

Campioni analizzati:

- ❖ 50 ceppi di CPE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*) isolati da emocolture positive per batteri Gram-negativi,

- ❖ 250 ceppi di CPE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*) isolati da campioni di urine. Tra questi, 200 isolati provenivano da uno *screening* generale, mentre i restanti 50 sono stati selezionati per reparto ospedaliero a maggiore incidenza di CPE (lungo degenza, geriatria, medicina interna *etc.*),
- ❖ 112 ceppi di CPE (*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*) isolati da tamponi rettali di sorveglianza. In particolare tali colonie sono state testate su terreni di coltura quali *ChromID ESBL* (preferibilmente) o *ChromID CARBA* (se il ceppo non cresce su *ChromID ESBL*), ceppi isolati due o più volte dallo stesso paziente durante lo studio sono stati esclusi.

Si ricorda inoltre, che al momento dell'esecuzione del *test*, le colonie recenti e ben isolate possono essere prelevate da qualsiasi mezzo di coltura fatta eccezione per *Mac Conkey*, CLED, BCP o EMB *agar*. Questi terreni di coltura infatti, non sono raccomandati per la raccolta di colonie ai fini del β *Carba test* in quanto possono verificarsi delle interferenze con il colore dei reagenti che risulterebbe in una bassa resa del *test*. Esso ne rappresenta sostanzialmente il principale limite.

Reagenti

Il *kit* (fornito dalla ditta francese *Bio-Rad*) è composto da 25 microprovette *eppendorf* più tre tipi di reagenti (tabella 3.1):

- ❖ reagente 1: pronto all'uso;
- ❖ reagente 2: liofilizzato e da ricostituire con il reagente 3, cioè, prelevare 1000 μ L del reagente R3 e trasferirli nel reagente R2 più prelevare altri 100 μ L del reagente R3 e trasferirli nel rispettivo flaconcino di R2.

Tabella 3.1: Definizione reagenti R1, R2, R3

Identificazione	Descrizione	Presentazione
R1	Soluzione di estrazione incolore conservante: 0.1% <i>ProClin™</i> 300	Un flaconcino pronto all'uso, 1.0 ml
R2	Miscela cromogena gialla liofilizzata	Un flaconcino da ricostituire con R3
R3	Soluzione di sospensione conservante: 0.1% <i>ProClin™</i> 300	Un flaconcino pronto all'uso, 1.1 ml

Condizioni di conservazione e trattamento

Il *kit* (fig.3.3) deve essere conservato ad una temperatura ottimale di $+2 \leq T \leq +8^{\circ}\text{C}$ (tabella 3.2).

Tabella 3.2: Conservazione reagenti R1, R2

Identificazione	Conservazione (dopo la prima apertura)
R1	3 mesi a $+2-8^{\circ}\text{C}$
R2 (soluzione ricostituita)	3 mesi a $+2-8^{\circ}\text{C}$

Al momento dell'esecuzione è importante assicurarsi che i tappi delle due fiale (conservate in posizione verticale) siano saldamente avvitati per evitare un'eventuale contaminazione o essiccazione dei reagenti .



Fig. 3.3: Kit β Carba test (Az. Bio-Rad)

Controllo qualità

Al momento dell'esecuzione del *test* devono essere allestiti controlli negativi & positivi, usati settimanalmente.

- ❖ Controllo negativo: *Escherichia coli* ATCC 35218 o 25922
- ❖ Controllo positivo: *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13438. Questo ceppo contiene carbapenemasi KPC-3 che conferisce resistenza ai carbapenemi.

È preferibile fare due subculture successive allo scongelamento prima di seguire il test QC (*Quality Control*).

Protocollo del test

La seguente procedura analitica descrive il protocollo microbiologico comune applicato alle varie matrici (A,B,C) (fig. 3.4).

1)Prima dell'uso aspettare 10 minuti così da portare i reagenti a temperatura ambiente e omogeneizzare ogni reagente (R1 e R2) con una breve vortexata.

2) Aggiungere 40 µl di ogni reagente 1 e 2 in una microprovetta appena prima dell'inizio del *test*.

3) Prelevare con un'ansa da 1 µl diverse colonie recenti, circa 3-4 (16-24h di incubazione) e ben isolate.

4) Mescolare le colonie batteriche con la *mix* di reazione, *vortexando* o pipettando.

5) Osservare il colore della colonia a T0 così da apprezzare il cambiamento di colore della *mix* di reazione (inizialmente gialla). Incubare a 37°C per un massimo di 30 minuti. Quindi leggere a 15 e 30 minuti.

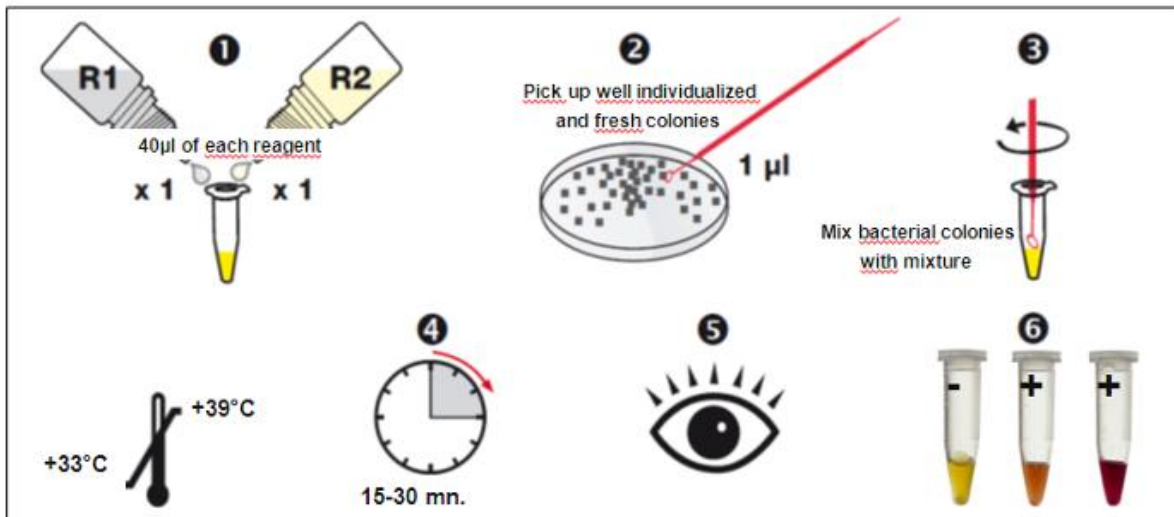


Fig. 3.4: Descrizione β Carba test

Lettura e interpretazione:

Se a 15 e 30 minuti si osserva un viraggio di colore da giallo ad arancione, rosso o porpora, il *test* è da considerare positivo. Se al contrario, non si osservano cambiamenti di colore rispetto al T0 ed entro 30 minuti, il risultato sarà valutato come negativo. (fig.3.5)

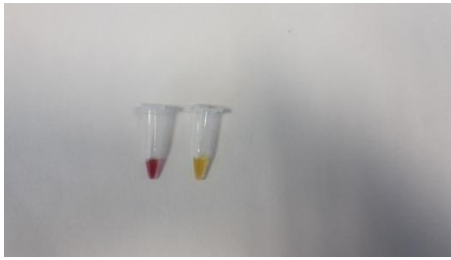


Fig. 3.5: Esempi di *test* positivo *eppendorf* sx

vs *test* negativo *eppendorf* dx

Alla fine dell'esecuzione del *test*, lo sperimentatore procederà a compilare un foglio di lavoro dei risultati ottenuti dal *test* β Carba (tabella 3.6).

Tabella 3.6: Foglio di lavoro

Data	Analisi - numero	Tipo di terreno (CARBA o ESBL)	Test β CARBA				Gold standard / test di riferimento		Meccanismi di resistenza ai β -lattamici + Tipo di β -lattamasi (se presente) + Commenti
			Colore al T0 (se non giallo)	Colore a 15 min	Colore a 30 min	Risultati Positivo P Negativo N	ID batterica	Produttore di carbapenemasi? Yes/ No	

A) Valutazione delle colonie batteriche isolate da urine

Sono stati valutati due protocolli a partire da urina primaria (a) e da colonia isolata dalle medesime urine (b).

a) Procedura analitica (a partire da campione intero, cioè urina primaria):

1) Aggiungere 1.5 ml di urina positiva in un tubo di reazione (p.g. *Eppendorf tube*).

2) Centrifugare 5 minuti a 3,000g.

3) Rimuovere il sopranatante con una pipetta e scartarlo.

4) Conservare il *pellet* batterico, quindi inserire la *mix* di reazione.

5) Osservare il colore della colonia a T0 così da apprezzare il cambiamento di colore della *mix* di reazione (inizialmente gialla). Incubare a 37°C per un massimo di 30 minuti. Quindi leggere a 15 e 30 minuti.

b) Procedura analitica (da colonia):

Come descritto precedentemente a pagina 54.

B) Valutazione di colonie batteriche o *pellet* precedentemente isolati da emocolture positive

Sono stati valutati due protocolli rispettivamente senza pre-arricchimento (e) e con pre-arricchimento (f), in aggiunta il protocollo per colonie isolate dalle medesime emocolture (g).

e) Procedura analitica (senza pre-arricchimento):

- 1) Prelevare da flacone 3.0 ml di emocoltura positiva per Gram-negativi tramite aghi da prelievo.
- 2) Centrifugare 10 minuti a 3000 rpm.
- 3) Scartare il surnatante.
- 4) Risospendere con 1,0 ml di H₂O distillata sterile, avendo cura di non toccare il gel.
- 5) Trasferire 800 µl di soluzione ottenuta nel punto 4 in una provetta pulita.
- 6) Centrifugare 1 minuto a 10000 g.
- 7) Scartare il surnatante (se il pellet non è rosso ci si può fermare a questo passaggio). Qualora il pellet sia rosso: risospendere con 1.0 ml di H₂O distillata sterile, centrifugare 1 minuto a 10000 g, rimuovere il surnatante.
- 8) Quindi inserire nella provetta 40 µl di reattivo e procedere con il test.

f) Procedura analitica (con pre-arricchimento):

- 1) Prelevare da flacone 3.0 ml di emocoltura positiva per Gram-negativi tramite aghi da prelievo.
- 2) Centrifugare 10 minuti a 3000 rpm.
- 3) Scartare il surnatante.
- 4) Risospendere con 1,0 ml di H₂O distillata sterile, avendo cura di non toccare il gel.
- 5) Trasferire 50 µl di soluzione ottenuta nel punto 4 in un tubo contenente 3.0 ml di brodo TCS (*Tryptone Soya Agar Casein*).

6) Mescolare per inversione.

7) Incubare 2 ore a $36 \pm 2^\circ\text{C}$, quindi centrifugare 5 minuti a 3000 rpm.

8) Scartare il surnatante per inversione.

9) Risospendere con vortex in 3.0 ml di H₂O distillata sterile e centrifugare 5 minuti a 2000 g, scartare per inversione il surnatante.

10) Quindi inserire nella provetta 40 µl di reattivo e procedere con il test.

g) Procedura analitica (da colonia):

Come descritto precedentemente a pagina 54.

C) Valutazione delle colonie di *Enterobacteriaceae* precedentemente isolati da tamponi rettali

Si è valutato un singolo protocollo (h) per colonie recenti e ben isolate (18-24h di incubazione) su terreni di coltura quali *ChromID* ESBL o *ChromID* CARBA.

h) Procedura analitica (da colonia):

Come descritto precedentemente a pagina 54.

I protocolli microbiologici proposti qui di seguito sono quelli utilizzati dal laboratorio di Microbiologia di Pievesestina e mirano principalmente, a rilevare i microrganismi in questione, interrompendo quella che è la loro catena di trasmissione.

3.2 Identificazione e Antibiogramma (Abg)

Presso l'Unità Operativa di Microbiologia (UOM) del Centro Servizi del Laboratorio Unico dell'AUSL della Romagna, i *test* di identificazione e l'antibiogramma sono effettuati con strumenti automatizzati, in particolare è in uso il VITEK 2 (*BioMérieux*). Concretamente, si procede attraverso l'utilizzo di un tampone sterile con il quale si vanno a selezionare le colonie di *Enterobacteriaceae* presenti sulle piastre, quindi si prepara la sospensione batterica in soluzione fisiologica sterile caratterizzata da una torbidità pari a circa 0,5 McFarland, misurata mediante un densitometro.

Al fine di rilevare Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE), si vanno a sfruttare apposite *card*, le quali discriminano essenzialmente per i tipi di antibiotici saggiati:

- ❖ ID-GN per l'identificazione di microrganismi Gram-negativi;
- ❖ AST-204 & AST-202 per determinare l'antibiogramma (Abg) di batteri Gram-negativi.

3.3 Test di screening per riconoscere i soggetti colonizzati

Materiali

-Agar ChromID CARBA

-Agar ChromID ESBL

-Dischetto dell'antibiotico *Meropenem* (10µg).

Semina

I campioni vengono seminati i tamponi sono seminati su una piastra di *Agar ChromID ESBL*, posizionando conseguentemente sull'agar un dischetto dell'antibiotico *Meropenem*; in alternativa su una piastra *Agar ChromID CARBA*. La semina può essere effettuata in maniera automatizzata sfruttando il seminatore automatico *Previ Isola (BioMérieux)* presente presso il laboratorio di Microbiologia di Pievesestina, oppure eseguita manualmente dall'operatore avente buona esperienza. In questo caso, si immerge un'ansa calibrata da 10 µL nel liquido della provetta a tappo rosa (contenente il tampone) e la si deposita su un'area discreta della piastra opportuna. A questo punto, il campione viene strisciato con la tecnica “dei quattro lati” (fig.3.7), quindi si addiziona un eventuale antibiotico.

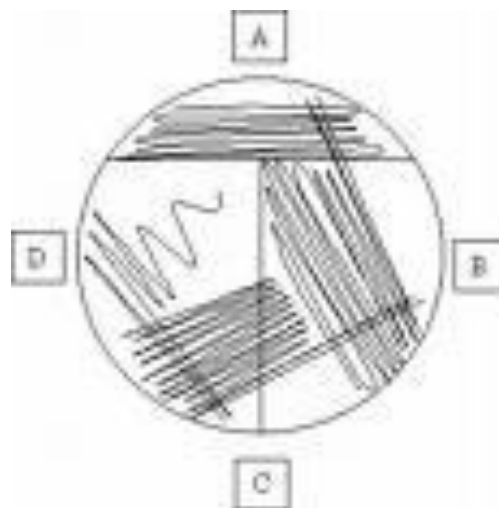


Fig. 3.7: Semina: tecnica “dei quattro lati”

Incubazione

Si procede ad incubare la piastra all'interno di un contenitore sigillato in aerobiosi per 16-24 ore circa, alla temperatura ottimale compresa in un *range* tra i 35-37°C.

3.4 Test di conferma fenotipica

Test di sinergia mediante disco di diffusione per identificazione di carbapenemasi

Materiali

- Acido amino-fenil-boronic AFBA (per inibitore KPC)
- Acido dipicolinico DPA (per inibire MBL)
- Acqua distillata o demineralizzata
- Agar Mueller Hinton* MH II (singola piastra con diametro pari a 150 mm)
- Cloxacillina sale sodico CLOXA (per inibire AmpC)
- DimetilSulfossido (DMSO)
- Inoculo 0,5 McFarland
- Meropenem* 10 µg (MEM)

Preparazione dei reagenti

Acido amino-fenil-boronic (AFBA)

- Sciogliere 240 mg di acido amino-fenil-boronic in 2 mL di DMSO in addizione a 2 mL di acqua distillata (concentrazione d'uso pari a 600 µg/10 µL). Quindi, conservare il reagente in frigorifero e la soluzione a temperatura ambiente al riparo dalla luce.

Acido dipicolinico (DPA)

- Sciogliere 400 mg di acido dipicolinico in 4 mL di DMSO (concentrazione d'uso pari a 1000 µg / 10 µL). Dunque, conservare il reagente in frigorifero e la soluzione a temperatura ambiente al riparo dalla luce.

Cloxacillina (CLOXA)

- Sciogliere 75 mg di cloxacillina in 1 Ml di DMSO in aggiunta a 1 mL di acqua distillata (concentrazione d'uso pari a 750 µg / 20 µL). A questo punto, conservare il reagente in frigorifero e la soluzione a temperatura ambiente al riparo dalla luce.

Semina

Si prepara una sospensione batterica con una densità pari a 0,5 McFarland, quindi essa è strisciata in maniera propriamente detta, su di una piastra di *Muller Hinton*. Si applicano cinque dischetti dell'antibiotico *Meropenem* (MEM) in posizioni prestabilite sulla superficie dell'*agar*. La piastra è capovolta e vengono numerate sul retro le posizioni su cui sono collocati tali dischetti in ordine da 1 a 5 in senso antiorario. Dunque, si addizionano ai dischetti di *Meropenem* i diversi inibitori degli enzimi carbapenemasi in tal maniera (fig.3.8):

posizione 1) MEM singolarmente

posizione 2) MEM + 10 µL di acido amino-fenil-boronic (AFBA)

posizione 3) MEM + 10 µL di acido dipicolinico (DPA)

posizione 4) MEM + 10 μ L di acido amino-fenil-boronic (AFBA) + 10 μ L di acido dipicolinico (DPA)

posizione 5) MEM + 20 μ L di cloxacillina (CLOXA)

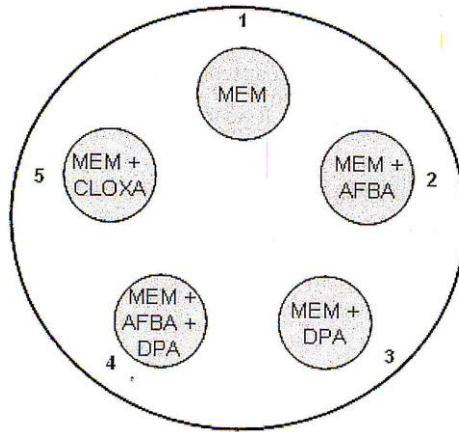


Fig. 3.8: Disposizione dischetti di antibiotico *Meropenem* (MEM) sulla piastra *Muller Hinton*

Incubazione

A questo punto, la piastra viene posta in un contenitore sigillato in incubazione alla temperatura ideale compresa in un *range* tra i 35-37°C in aerobiosi per un tempo ottimale di 16-24 ore circa.

3.5 Test di conferma genotipica

Identificazione KPC: EasyQ KPC (BioMèrieux)

Preparazione da colonie batteriche isolate: da una coltura su piastra preparare una sospensione a 0,5 McFarland.

Procedura di estrazione NucliSENS® easyMAG®

- trasferire 50 μ l della soluzione 0,5 McFarland (preparata prima da una coltura su piastra) in una provetta NucliSENS® *Lysis Buffer*,

- mescolare con agitatore *vortex* e centrifugare per un tempo ottimale di 10 secondi a 1500 g,
- incubare le provette dei campioni per minimo 10 minuti a temperatura ambiente,
- trasferire con cura i campioni lisati sul fondo dei pozzetti delle *strip* dei campioni *easyMAG*[®], cercando di inibire la formazione di eventuale schiuma e goccioline,
- installare le *strip* dei campioni nello strumento *easyMAG*[®],
- preparare la soluzione *Internal Control* (IC), prestando attenzione a ricostituire il contenuto della provetta che lo contiene con 550 µl di diluente del controllo interno (CAL dil.), utilizzando il programma 1,
- mescolare la soluzione ottenuta e consentire la formazione del sedimento centrifugando brevemente,
- mescolare la provetta contenente la silice magnetica NucliSENS[®] *easyMAG*[®] sino a ricavare una sospensione omogenea,
- preparare la *premix* IC-Silice per effettuare l'estrazione aggiungendo 550 µl di silice magnetica NucliSENS[®] *easyMAG*[®] alla soluzione IC usando sempre il programma 1,
- per ogni pozzetto del campione NucliSENS[®] *easyMAG*[®] aggiungere: 100 µl della soluzione *premix* IC-Silice avvalendosi del programma 3, quindi selezionare l'avvio dell'estrazione,
- una volta conclusa la corsa di estrazione, scaricare le *strip* contenenti i campioni e trasferire entro 30 minuti in microprovette da 1,5 ml gli estratti degli acidi nucleici senza particelle di silice,
- da ultimo, trasferire i campioni nel settore laboratoristico destinato all'amplificazione.

Procedura di amplificazione e di rilevazione NASBA[™] in *real time*

- ricostituire gli enzimi (AMV-RT, RNasi H, T7-RNA pol) aggiungendo alla loro provetta 45 µl di opportuno diluente,
- lasciare riposare per 15 minuti e centrifugare brevemente prima dell'uso,
- preparare la soluzione del *primer* aggiungendo 90 µl di diluente del *primer*,
- mescolare immediatamente mediante *vortex* sino a completo dissolvimento,
- collocare le *strip* o le provette destinate a contenere il campione estratto nell'apposito supporto e trasferisci un'aliquota di 5 µl di estratto sul fondo e coprirle con l'apposito coperchio,
- quindi, aggiungere 10 µl di soluzione del *primer* in ogni pozzetto di una *strip*, e inserire il vassoio delle provette nell'incubatore NucliSENS® *easyQ*®: incubare per 2 minuti a 65°C e per 2 minuti a 41°C usando lo specifico programma RNA,
- durante le fasi di incubazione, è importante posizionare i tappi per le provette capovolti in un vassoio apposito per provette,
- quindi, aggiungere 5 µl di soluzione degli enzimi in ogni tappo,
- dopo l'ultima fase di incubazione chiudere le *strip* inserendo i tappi contenenti gli enzimi utilizzando l'apposito dispositivo di chiusura.

A questo punto, è indispensabile che le fasi descritte qui di seguito vengano eseguite in meno di 8 minuti dal momento di aggiunta degli enzimi e l'inizio della corsa:

- centrifugare la *strip* nell'opportuna centrifuga per 2 secondi,
- miscelare le *strip* sfruttando un *vortex*,
- centrifugare una seconda volta la *strip* per altri 2 secondi,
- reinserire la *strip* nell'incubatore NucliSENS® *easyQ*® ad una temperatura ideale di 41°C,
- trasferire la *strip* nell'analizzatore NucliSENS® *easyQ*® preriscaldato a 41°C,
- quindi, avviare la corsa secondo i parametri impostati,
- infine, dopo avere osservato i risultati si procede alla stampa degli stessi.

Identificazione MBL: PCR *end-point*

Prima di effettuare l'estrazione del DNA dal campione attraverso l'estrattore automatizzato NucliSENS® *easyMAG*® (Bio Mérieux), l'operatore esegue quella che è la lisi esterna manuale, addizionando:

-2 ml di *Buffer* di lisi per ogni campione

-500 µl di campione

-incubazione alla temperatura ambiente del laboratorio per 10 minuti

-aggiunta di 100 µl di silice diluita rispettando il rapporto ottimale 1:2 con acqua sterile

Conclusi gli *step* l'eluato ottenuto è raccolto in una *epENDORF* RNAase free.

PCR *end-point*

Per consentire l'amplificazione i geni Bla_{NDM}, Bla_{IMP}, Bla_{VIM} (µl), in aggiunta ad ogni campione vengono addizionati 5 µl di estratto in 45 µl di soluzione *Master – mix* preparata anteriormente, in maniera accurata mediante i seguenti reagenti (tabella 3.9).

Tabella 3.9 *Composizione Master – mix solution*

REAGENTI	BLA_{VIM}	BLA_{IMP}	BLA_{NDM}
<i>BUFFER 10X</i>	5	5	5
dNTPs	5	5	5
<i>PRIMER FORWARD</i>	0.5	0.5	0.5
<i>PRIMER REVERSE</i>	0.5	0.5	0.5
MgCl ₂	3 (1.5 Mm)	4 (2.0 Mm)	3 (1.5 Mm)
H ₂ O	30.75	29.75	30.75
<i>Taq</i> POLIMERASI	0.25	0.25	0.25

L'amplificazione di tali geni avviene secondo il medesimo schema:

Bla_{vim}:

5 minuti a 95°C, seguiti da 35 cicli:

- 30 secondi a 95°C
- 45 secondi a 52°C
- 1 minuto a 72°C

10 minuti a 72°C

Bla_{imp}:

5 minuti a 95°C, seguiti da 35 cicli:

- 30 secondi a 95°C
- 45 secondi a 52°C
- 1 minuto a 72°C

10 minuti a 72°C

Bla_{ndm}:

5 minuti a 95°C, seguiti da 35 cicli:

- 1 minuto a 95°C
- 1 minuto a 58°C
- 1 minuto a 72°C

10 minuti a 72°C

A questo punto, l'analisi dei prodotti di reazione è eseguita attraverso la corsa su gel.

Elettroforesi su gel di agarosio

Il gel di agarosio all'1% è ottenuto mediante la seguente procedura, che prevede l'aggiunta di 1 g di agarosio in polvere a 100 ml di tampone allo 0.5%; la

miscela è quindi risaldata, mescolando casualmente, sino a ricavare lo scioglimento completo della polvere. Dunque, la soluzione è versata nella vaschetta stampo con l'ausilio di un opportuno pettinino per la formazione di una serie di pozzetti. Si lascia gelificare per almeno un'ora.

Trascorsi 60 minuti circa, il gel viene ricoperto di tampone, dopo essere stato posto nell'adeguata struttura.

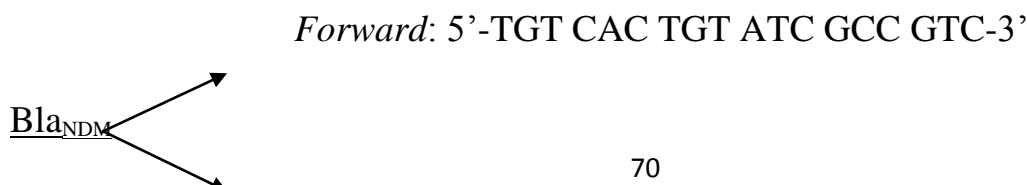
Pertanto, in ogni pozzetto si caricano 10 µl di amplificato miscelato precedentemente con 2.5 µl di *buffer* di corsa; tra questi pozzetti si ricorda come nell' primo sarà seminato un *marker* di peso molecolare. Ebbene, si procede con l'applicare la corrente elettrica a 50 V per i primi 10 minuti, a cui seguono 100 V per i restanti 50-60 minuti.

Interessante apprezzare come, tramite questa tecnica elettroforetica sia plausibile appurare nei campioni considerati, l'eventuale presenza di sequenze *target* amplificate per ciascun gene, le cui dimensioni risultano essere le seguenti:

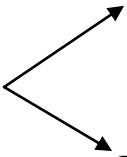
Bla _{VIM}	Bla _{IMP}	Bla _{NDM}
↕	↕	↕
748 bp	587 bp	621 bp

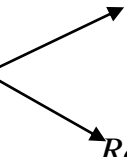
Sequenza dei primers

La sequenza dei *primers* sfruttati per i geni Bla_{NDM}, Bla_{IMP}, Bla_{VIM} risulta così rappresentata:



Reverse: 5'-CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC-3'

Bla_{IMP} 
Forward: 5'- CTA CCG CAG CAG AGT CTT TG-3'
Reverse: 5'- ACC AGT TTT GCC TTA CCA T-3'

Bla_{VIM} 
Forward: 5'- TCT ACA TGA CCG CGT CTG TC-3'
Reverse: 5'- GTG CTT TGA CAA CGT TCG C-3'

4. RISULTATI

Il percorso di tesi affrontato ha coinvolto 412 campioni, analizzati presso il laboratorio di Microbiologia di Pievesestina Ausl della Romagna, in sede di tirocinio formativo curriculare e di prova finale. I campioni (emocolture, urine, tamponi rettali) sono stati precedentemente selezionati da pazienti positivi per enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE). Su questi campioni è stato eseguito il *test Beta Carba* ai fini di confrontare tale metodo con il *Gold Standard*.

4.1 Emocolture

Tra le 50 emocolture analizzate, 10 sono risultate positive per enterobatteri: 6 hanno evidenziato la presenza di KPC, mentre le restanti 4 hanno prodotto il gene di resistenza ESBL. Le restanti 40 emocolture sono risultate positive per altri batteri (es: *Pseudomonas aeruginosa* etc). Tra i microrganismi produttori di KPC, 4 sono risultati essere *K. Pneumoniae* (67%), mentre 2 (33%) *E.coli*. Per quanto riguarda i microrganismi produttori di ESBL, 3 (75%) sono risultati essere *E.coli* e uno (25%) *K. Pneumoniae*.

Il *Beta Carba test* è stato eseguito inizialmente a partire da tutte le 50 emocolture positive, utilizzando il pellet batterico.

Nella tabella 4.1 sono confrontati i risultati ottenuti utilizzando il *Beta Carba test* e il

		Gold Standard	
		CPE+	CPE-
CPE	Positive	6	0
	Negative	0	44

metodo di riferimento per l'identificazione di (*Gold standard*).

Tabella 4.1: Confronto tra *Gold standard* e *Beta Carba test* condotto su emocolture

La sensibilità e la specificità del *Beta Carba test* è quindi risultata essere del 100%, in quanto abbiamo ottenuto la totale concordanza con il *gold standard*.

I sei ceppi produttori di CPE (4 *K. Pneumoniae* e 2 *E. coli*) sono stati poi isolati e saggiati nuovamente con il *Beta Carba test*, che è risultato positivo in tutti e sei i casi.

4.2 Urine

Sono state analizzate 250 urine, delle quali 200 provenienti da uno *screening* generale, mentre le restanti 50 sono state selezionate tra i reparti ospedalieri a maggiore incidenza di CPE (lungo degenza, geriatria, medicina interna *etc*).

- ✓ Tra le 200 urine provenienti dallo screening , 81(40.5%) sono risultate positive. Tra queste 50 (61.7%) sono risultate positive per la presenza di *E.coli*, mentre le restanti 31 sono risultate positive per altri batteri o funghi (es: *Proteus*, *Candida*).

Il β Carba test è stato eseguito a partire dai pellet di tutte le 200 urine . Come riportato nella tabella 4.2 si ha la piena concordanza tra i risultati ottenuti con il *on bacterial* *pellets* e quelli ricavati dal Gold Standard *Gold* *standard*. Tutti i campioni sono risultati negativi al test e nessuno tra i 50 ceppi batterici isolati è risultato produttore di carbapenemasi con il metodo di riferimento. Abbiamo potuto quindi calcolare solo la specificità che è risultata essere del 100%

Tabella 4.2: Confronto tra test β Carba e il Gold standard condotto sui pellet di 200 urine

		CPE+	CPE-
βCARBA Test	Positive	0	0
	Negative	0	200

✓ Per quanto riguarda le 50 urine selezionate nei reparti a maggiore incidenza di CPE, 4 (8%)

risultate

K.

Pneumoniae

		Gold Standard	
		CPE+	CPE-
βCARBA Test	Positive	4	0
	Negative	0	46

sono positive per

produttrici

di KPC, mentre le restanti 46 (92%) sono risultate negative.

Il *β Carba test* è stato eseguito a partire dai pellet di tutte le 50 urine. Come riportato nella tabella 4.3 si ha la piena concordanza tra i risultati ottenuti con il pellet batterico e quelli ricavati dal *Gold standard*.

Tabella 4.3: Confronto tra *test β Carba* e il *Gold standard* condotto sui pellet di 50 urine

La sensibilità e la specificità del *Beta Carba test* è quindi risultata essere del 100%, in quanto abbiamo ottenuto la totale concordanza con il gold standard.

I quattro ceppi di *K. Pneumoniae* produttori di KPC sono stati poi isolati e saggiati nuovamente con il *Beta Carba test*, che è risultato positivo in tutti e 4 i casi.

4.3 Tamponi rettali

Sono stati analizzati 112 tamponi rettali provenienti da una popolazione selezionata e con precedente positività per enterobatteri produttori per KPC.

Nel grafico 4.4 si può apprezzare come dei 112 campioni positivi per enterobatteri, 108 sono risultati positivi al *test* β Carba. Pertanto il 96% manifesta una positività al *test* mentre un 4% risulta negativo.

Grafico 4.4: *β Carba test results positive and negative*

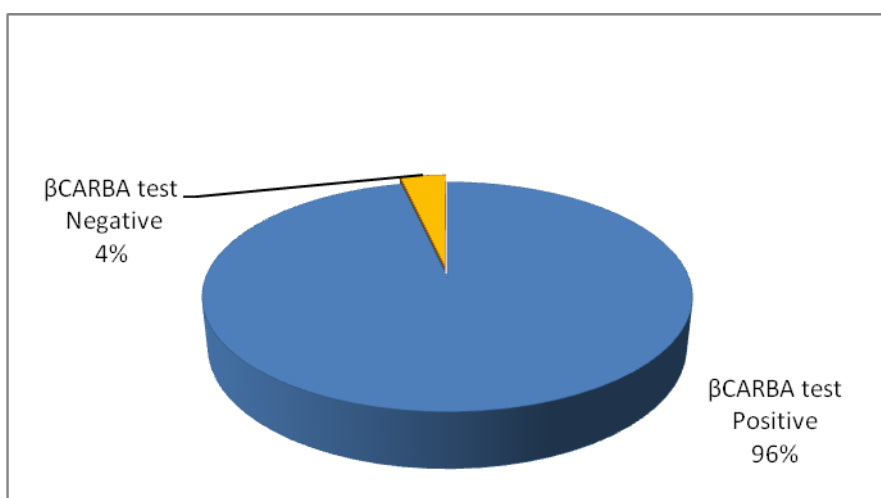
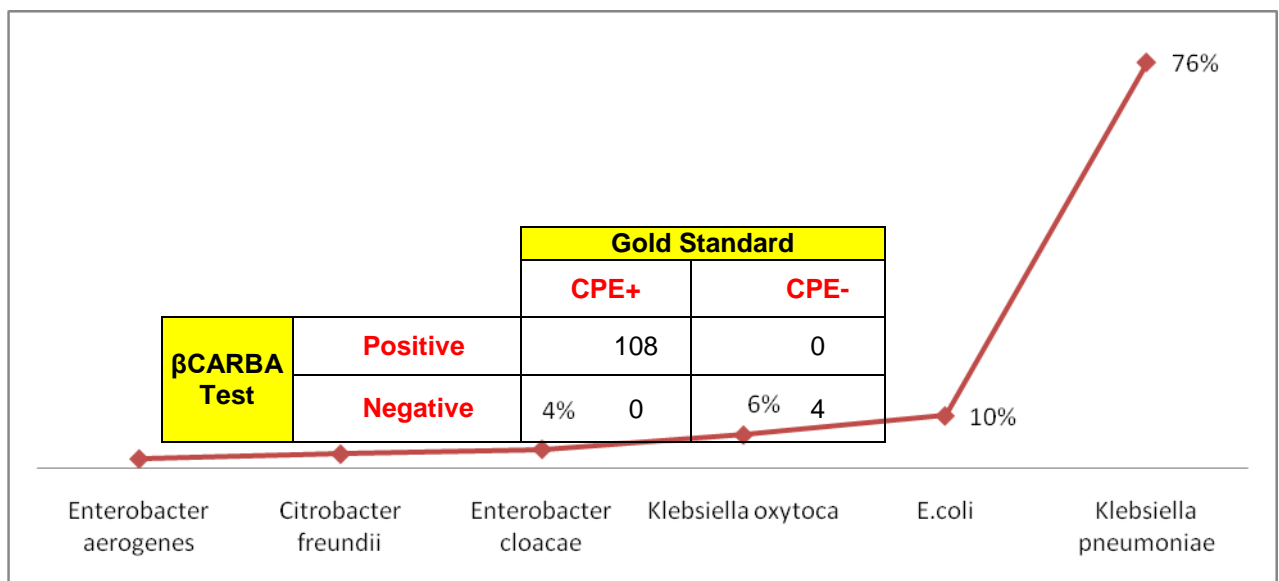


Tabella 4.5: Confronto tra *Gold standard* e *Beta Carba test* sui tamponi rettali

Anche in questo caso la sensibilità e la specificità del *Beta Carba test* è risultata essere del 100%, in quanto abbiamo ottenuto la totale concordanza con il *gold standard* (tabella 4.5).

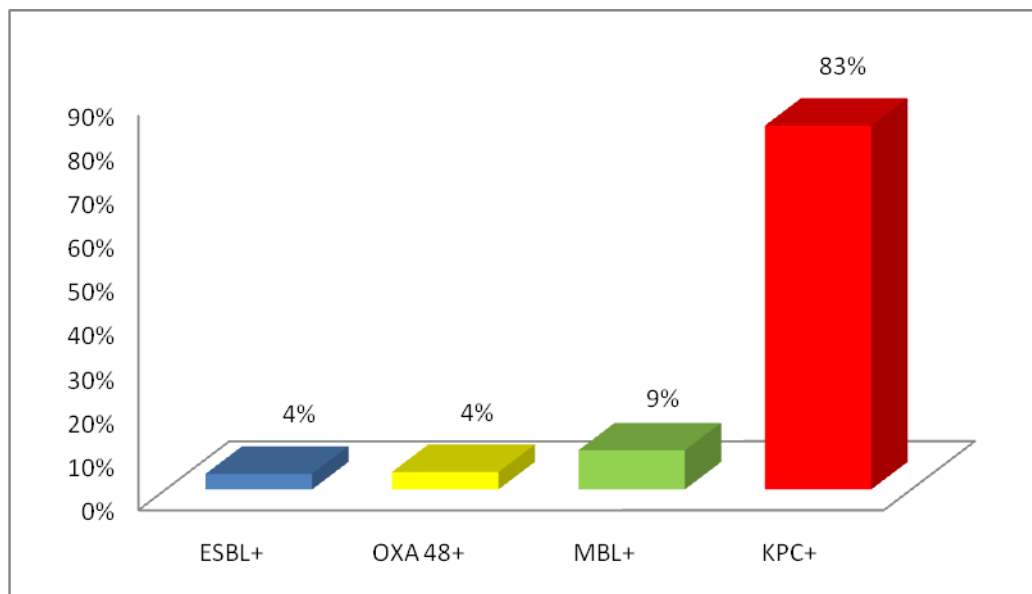
Esaminando più da vicino l'identificazione di CPE, così come riportato nel grafico 4.6 si può osservare come la specie maggiormente isolata è rappresentata da *Klebsiella pneumoniae* (76%), seguita da *E.coli* (10%).

Grafico 4.6: *Bacterial ID*



Il grafico 4.7 riporta la frequenza dei geni di resistenza riscontrata negli isolati di *Klebsiella pneumoniae*. Come si evince dal grafico il gene KPC+ è quello prevalente (83%), seguito da MBL+ (9%) e da OXA48+ e ESBL (4% entrambi).

Grafico 4.7: Resistance genes



5. DISCUSSIONE

L'affiorare di infezioni da enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) rappresenta una criticità clinica e terapeutica, in virtù del fatto che gli antibiotici carbapenemi costituiscono i farmaci di riferimento per la terapia di tali infezioni invasive da enterobatteri Gram-negativi multi resistenti. In Europa la diffusione di enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE) è un grave problema di salute pubblica. Le potenzialità negative di questo tipo di resistenza agli antibiotici si sono solo parzialmente espresse: lo *spreading* delle carbapenemasi è circoscritto prevalentemente a *Klebsiella pneumoniae*. In particolare questo fenomeno sta assumendo sempre più rilievo in Italia, dove si registra negli ultimi anni un *trend* in crescita. Pertanto, di fronte ad un così preoccupante quadro epidemiologico si giustifica la necessità di utilizzare particolari sistemi che consentano il facile riconoscimento di tali microrganismi, avviando adeguati interventi di controllo.

A tale proposito, nella regione Emilia-Romagna l'Azienda Sanitaria predispone specifici comportamenti da adottare per la gestione terapeutica del paziente.

Più nel dettaglio, il laboratorio di Microbiologia di Pievesestina una volta individuate le farmaco - resistenze, compila una refertazione "allertata" ai

pazienti richiedenti, aggiungendo la presenza di una determinata nota o commento al referto “*ceppo produttore di carbapenemasi; la terapia con carbapenemi potrebbe risultare scarsamente efficace o inefficace. Si raccomanda consulenza infettivologica. Il microrganismo è un germe sentinella, potrebbero insorgere problemi di diffusione e terapia*”. A ciò segue un’eventuale segnalazione telefonica al reparto ospedaliero di provenienza del paziente, dunque, il suddetto avviso è comunicato via *mail* al Comitato Infezioni Ospedaliero (CIO). Ecco quindi, che si va ad instaurare un tempestivo flusso informativo aziendale, il quale prevede il coinvolgimento di tre settori: Microbiologia, Direzione Assistenziale e Medici Infettivologi.

Alla luce di quanto descritto precedentemente, diventa indispensabile implementare gli studi di farmaco - resistenza per valutare e ridurre il potenziale di crescita di tali microrganismi.

Dunque, il *test β Carba* si posiziona a livello diagnostico fra i *test* economici, riproducibili e al contempo rapidi. Infatti, esso è in grado di evidenziare la presenza di germi produttori di carbapenemasi in soli 30 minuti e la cui possibile positività indica che si è di fronte ad uno stipite batterico che idrolizza i farmaci antibiotici carbapenemi. A questo punto, la conseguenza primaria sarà la netta esclusione del loro impiego nella pratica terapeutica effettuata sul paziente.

Nel caso di infezione da ceppo produttore di carbapenemasi, solitamente, le scelte terapeutiche sono poche e talvolta difficili da compiere.

Generalmente, sono due le strategie adottate dal reparto ospedaliero: si impiega un farmaco di classe differente (a volte in associazione con altri) che abbia mostrato una certa attività *in vitro*, di frequente utilizzo ad esempio è il farmaco Colistina. Oppure, si aumenta il dosaggio del carbapenemico (in quei casi in cui Colistina non sia usabile o inefficace).

Spesso il paziente ha prognosi infausta, specie nei casi in cui non esistono alternative terapeutiche o quando le condizioni del paziente non le consentano (insufficienza renale *etc*).

Pertanto, il percorso di tesi che è stato sviluppato ha permesso di indagare diversi obiettivi. Le prove sperimentali effettuate e la raccolta dati hanno consentito di avvalorare la funzionalità del metodo e comparare la sua *performance* con quella relativa alle classiche metodiche di analisi microbiologiche per il rilevamento di enterobatteri produttori di carbapenemasi.

In conclusione, i risultati sperimentali ottenuti con questo studio a partire da 412 campioni appartenenti a materiali biologici diversi (50 emocolture, 250 urine e 112 tamponi rettali) dimostrano che il β *Carba test* è altamente affidabile. Infatti in nessun caso è stata riscontrata discrepanza tra il metodo di riferimento e il test oggetto dello studio sia per quanto riguarda i campioni positivi, ma anche per quelli negativi, ottenendo una sensibilità e specificità del metodo pari al 100%. Inoltre il test si è rivelato affidabile non solo a partire dalle colonie isolate dai diversi materiali, ma anche a partire direttamente dai pellet batterici di emocolture o urine positive.

Esso rappresenta un test semplice, economico (approssimativamente 1 euro a test) e nella maggior parte dei casi di facile lettura e interpretazione grazie anche all'utilizzo dei controlli negativi.

Qualsiasi *equipe* di laboratorio opportunamente formata e addestrata è in grado di mettere in pratica i diversi protocolli, in quanto essi non richiedono particolari strumentazioni.

Chiaramente, a favore del *test* β *Carba* si inserisce il parametro fondamentale della rapidità, consentendo quindi una celere rilevazione di enterobatteri produttori di carbapenemasi direttamente su campioni clinici con un tempo di risposta piuttosto veloce e affidabile pari a 15-30 minuti. Durante la

sperimentazione, la validità del *test* è stata confrontata con le comuni metodiche che consentono l'identificazione di enterobatteri produttori di carbapenemasi, quali i *test* di conferma genotipica (basati sulla PCR – *Polymerase Chain Reaction*) e quelli di conferma fenotipica. Sebbene i *test* molecolari siano ora fortemente impiegati non sempre permettono di identificare tutti i possibili enzimi carbapenemasi. Ciò si verifica poiché frequentemente insorgono nuovi genotipi che talvolta non sono identificabili attraverso l'utilizzo di *primer* a largo spettro. Inoltre, si è notato come il grado di sensibilità dei *test* molecolari sia influenzato negativamente dal fenomeno di deriva genetica (*drift*). Al contrario, le principali criticità che si evidenziano adottando le tecniche fenotipiche, sono legate alla necessità di ingenti quantitativi di colonie batteriche e lunghi tempi di incubazione per giungere a risultati affidabili (allegato 1).

In sostanza, essendo la resistenza ai carbapenemi una realtà purtroppo ormai molto diffusa, il β Carba si colloca come *test* di grande importanza mirato a identificare in maniera celere i casi di infezioni clinicamente manifestati ed i soggetti colonizzati, consentendo pertanto l'adozione tempestiva di misure stringenti volte al contenimento della diffusione, quali isolamento, igiene delle mani *etc ...*

In definitiva, grazie alla *performance* dimostrata *in vitro*, il *test* può rappresentare un valido strumento per arginare e limitare lo *spreading* di CPE, svolgendo un buon ruolo nella gestione dei pazienti infetti.

6. BIBLIOGRAFIA

- Amicosante G., Menichetti F., Venditti M. (1999), Infezioni nosocomiali ed antibiotico resistenza. Editore, Il pensiero scientifico pag. 3-9.
- Az. Bio-Rad (2016), Protocollo β Carba Test pag. 3-8.
- Bellotti V., Stoppini M. (2012), Biochimica applicata. Società editrice Edises pag. 102-105, 213-218.
- Bergey's Manual (1994), *Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. pag. 178-179.
- Calfee D., Jenkins S.G. (2008), *Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant Klebsiella pneumonia in intensive care unit patients*, 29: 966-8.

- Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H.S., Wood W. B., Mc Carty M. (1981), Trattato di microbiologia. Editore, Piccini pag. 884-885.
- Istruzioni operative, Conferma resistenze KPC, rev. 4 pag. 11-12. (schede tecniche)
- Istruzioni operative, Urinocoltura, rev. 3 pag. 1-11. (schede tecniche)
- Istruzioni operative, Emocoltura, rev. 6 pag. 1-18. (schede tecniche)
- Istruzioni operative, Vitek MS, rev. 1 pag. 1-19. (schede tecniche)
- Koneman's (2009), *Color Atlas and text book of diagnostic microbiology*, 6th ed. Delfino pag. 211-215.
- Kucers A., Bennett N. McK (1982), *The use of Antibiotics*, 3th ed. FACMA pag. 3, 199.
- La Placa M. (2005), *Principi di microbiologia medica*. Società editrice, Esculapio pag.173-177, 184-185, 271.
- Livermore DM. (1995), *Betalactamases in laboratory and clinical resistance*, rev. 8 pag.557-584.

- Livermore DM. (2004), *Detections of betalactamases mediated resistance*. Ed. In-Chief pag.112-138.
- Martins IS., Pessoa-Silva CL., Nouer SA., Pessoa de Araujo EG., Ferreira AL., Riley LW., Moreira BM. (2006), *Endemic extended-spectrum beta-lactamase producing Klebsiella pneumoniae at an intensive care unit: risk factors for colonization and infection*, rev. 12 pag. 50-58.
- Paradisi F. (1996), *Terapia delle infezioni*. Ed. Minerva Medica pag. 34-37, 40-56.
- Paterson LD., Bonomo RA. (2005), *Extended spectrum beta lactamase: a clinical update*, pag. 657-686.
- Romanzi C.A. (1973), *Microbiologia medica*. Ed. Torinese pag. 7, 70, 180-193.
- Scand J. (2000), *European Urinanalysis Guidelines*, 60: 1-96.
- Stuart J.C., Leverstein-Van Hall M.A. (2010), *Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae*, 36: 205-210.
- Tascini C. (2010), *La gestione delle resistenze microbiche. Approccio clinico alla lettura dell'Antibiogramma*.

- Topley and Wilson's (1975), *Principles of Bacteriology, Virology and immunity*. Ed. Arnold pag. 839-854.
- UNI EN ISO 21528 – 2 : 2010 – Metodi orizzontali per la ricerca e la conta di *Enterobacteriaceae* – Parte 2: Metodo della conta delle colonie.

7. SITOGRAFIA

- Bioenciclopedia.altervista.org
- content.elearning_unicam.it/repository/microbiologia/modulo_2/
- http://assr.regione.emilia-romagna.it/it/servizi/Indice_A...Z/A/AntibioticoResistenza
- http://assr.regione.emilia-romagna.it/it/servizi/Indice_A...Z/C/Carbapenemasi
- http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance

_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_V1.0_20131211.
pdf

- https://www.google.it/search?q=tecniche+microbiologiche+per+identificazione+di+cpe&ie=utf-8&oe=utf-8&gevs_rd=cr&ei=5
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=resistance+cpe>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=antibiogram+interpretation>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=enterobatteri>
- medicinapertutti.altervista.org/argomento/parete-batterica-o-sacculo
- www.agenziafarmaco.gov.it
- www.aochiari.it/risorse/allegati/GliAntibiogrammisecondoLineeGuidaEUCAST_585-6984445.pdf
- www.ausl.mo.it/flex/cm/pages/ServeBLOB.php/L/IT/IDPagina/5845

- www.amcli.it/ultime-notizie/enterobatteri-produttori-di-carbapenemasi-cpe-la-situazione-in-europa/
- www.bioenciclopedia.altervista.org/mirobiologia.html
- www.biolifeitaliana.it
- www.biomerieux.it
- www.biomerieux-diagnostics.com/antimicrobial-resistance-management
- www.biomerieux-diagnostics.com/rapidec-carba-np
- www.epicentro.iss.it/focus_resistenza_antibiotici/DocumentazioneRegioni.asp
- www.iss.it/binary/mipi/cont/Presentazione_Pompa.pdf
- www.mednat.org/cure_natur/antibiotico_resistenza.htm

- www.microbiologia.unige.it/dpb/Appunti/M-genero5.htm
- wwnc.cdc.gov/eid/article/18/9/12-0355_article
- www.newmicro.it/doc/archivio/trento2014/Paternoster_Impattodella_diffusione_delle_carbapenemasi_nell_antibioticoterapia.pdf
- www.pubmed.gov
- www.sanfilipponeri.roma.it/ciapdf/Comunicazioni/Circ.MinSorveglianzaCPE-02-2013.pdf
- web.unicam.it/farmacia/ripa/antibiotici.pdf

Allegato 1 - The Bio-Rad β CARBA Assay Detects a Diverse Range of Carbapenemase-Producing Organisms (CPO)

EP0237

The Bio-Rad β CARBA Assay Detects a Diverse Range of Carbapenemase-Producing Organisms (CPO)

BM Willey, X Trimi, R Iaboni, S Rajadurai, DN Grohn, DA Boyd, L Matsaje, G Ricci, A Mazzulli, D Terenzi, P Lo, M. Mulvey, T Mazzulli, SM Poutanen
Mount Sinai Hospital/UHN, University of Toronto, Toronto, Ontario; William Osler Health Sciences Centre, Brampton, Ontario; and the National Microbiology Laboratory, Winnipeg, Manitoba; CANADA

ECCMID
Amsterdam 2016

ABSTRACT

Background: Although PCR-based confirmatory tests are now available, they typically do not detect all possible carbapenemases and are generally too costly for use on every suspected CPO. Phenotypic tests that rely on visualization of pH changes resulting from impenen hydrolysis have been suggested in standards but have proven unreliable for detecting class D CPO in many clinical microbiology laboratories. This study determined the performance of Bio-Rad's β CARBA assay, which detects CPO via a pH independent colour-change, as it is the chromogenic substrate itself (a proprietary carbapenem) that changes colour.

Methods: 259 species-diverse isolates, highly characterized by PCR/sequencing, were blinded to present bias. They included 221 CPO (108 class A; 59 KPC; 4 SML; 2 IMI; 2 GES; 1 NMC; 80 class B; 73 NDM; 6 VIM; 1 IMP7; 26 class D; OXA48; OXA51; OXA21; OXA48-like; class B; NDM; OXA48-like; NDM-OXA48-like) and 38 non-CPO (Derepresived/antimicrobial-mediated, ampC, ESBL, ompC/ompX-mutants, ompK35/ompK36-mutants, cPA, OXA51). On-plate recovery from 80°C, erapenem discs were added to all plates for selective pressure. For β CARBA testing, 293/299 isolates were plated to Oxoid Columbia Sheep Blood agar (CSBA) while 26/29 were plated to Mueller-Hinton agar (MHA). These comprised 58 CPO (1 KPC, 3 SML, 2 GES, 1 IMI, 1 NMC, 12 NDM, 6 VIM, 1 IMP7; 7 OXA48-like, 4 NDM-OXA48-like) and 18 non-CPO. All 335 β CARBA tests were inoculated from growth surrounding erapenem discs. Incubation, as per Bio-Rad, was at 37°C. Each tube was read independently at 30min by 5 readers for colour-changes from yellow (negative) to orange, red or purple (positive). Consensus reads were analyzed for sensitivity/specificity, and 95% confidence intervals were calculated in www.graphpad.com.

Results: Overall, β CARBA was 98.2% sensitive (95%CI: 95.8-99.3) and 100% specific (95%CI: 92-100) detecting 274/279 CPO in 335 tests from both agars combined. β CARBA performed equally well from CSBA and MHA detecting 281/281 (98.6%) and 26/26 (96.0%) of the CPO, respectively. Detection notably included 100% of the troublesome OXA48-like CPO (CSBA: 33/33; MHA: 21/21). False-negatives from both agars included the unique *mecA*-positive Enterobacter cloacae and 5% GES *Klebsiella oxytoca* - β CARBA tests remained yellow <45min and again on repeat. The only β CARBA false-positive result was from an *Aeromonas hydrophila* (intrinsic carbapenem resistance due to *cpbA*). This species would be excluded from testing based on its identity, and this was not included in specificity calculations.

Conclusions: β CARBA is a low-complexity assay that is quick and easy to set-up and simple to interpret. When faced with a possible CPO, β CARBA provides a highly sensitive/specific result in 30min from a 1ul loop of organism, unlike similar tests that require larger inoculum and lengthier incubations.

METHODS

Table 1 describes the isolate characteristics and distribution by agar type used in the study. On and after recovery from -80°C, erapenem discs were added to all subculture plates to maintain selective pressure. In preparation for blinded testing, all 259 isolates were plated to Oxoid's Columbia-based 5% Sheep Blood agar (Blood agar), of which 76 were also plated to Oxoid's Mueller-Hinton Plus agar (MHA), plates as before had an erapenem disc placed on the inoculated area to maintain antibiotic pressure. Using fresh cultures of the total 335 isolates, Bio-Rad β CARBA tests were performed as per package inserts. Briefly, all liquid from Reagent 1 was transferred to dissolve the dehydrated contents of Reagent 2. Then 40ul ea. Reagents 2 and 3 were pipetted into a micro-tube (provided in kit), a heavy 3 ml. loop of colonies derived from growth closest to erapenem discs on each plate was inoculated into each tube and mixed thoroughly. At 30 min incubation at 37°C (water-bath), tubes were read independently by 5 readers for colour-changes: Yellow = CPO-negative; Orange, Red or Purple = CPO-positive. Consensus reads were analyzed for sensitivity and specificity, 95% confidence intervals were calculated in www.graphpad.com.

RESULTS

Table 2 (bottom left) summarizes β CARBA results obtained from blood and Mueller-Hinton agars, while Table 3 (below) displays overall β CARBA sensitivity and specificity with (95%CI) for detecting 274/279 98.2% CPO in 335 tests from both agars combined.

β CARBA performed well from Blood/MHA, from which CPO detection was 281/281 (98.6%)/26/26 (96.6%) overall, and for OXA48-types, it was 33/33 (100%)/21/21 (100%), respectively.

False-negatives from both agars were rarely encountered in unusual class A genotypes only, namely in *K. oxytoca* with bla_{GES5} and *E. cloacae* with bla_{NMC}, which were not or only poorly detected by β CARBA from either agar (Table 3). In these isolates, the β CARBA tests reproducibly were not detected by β CARBA. Sequencing confirmed their alleles to be bla_{GES5} - a genotype with recognized carbapenemase activity. Similarly, sequences were determined for the 5 *E. cloacae* with closely related bla_{NMC} genes. Although only represented by a few isolates in this study, it appeared that bla_{IMI} readily hydrolyzed the proprietary carbapenem utilized in the β CARBA assay while bla_{NMC} encountered difficulties. In all cases, the β -lactamases produced by these isolates failed to hydrolyze the particular carbapenem used in the assay regardless of evidence of growth to erapenem on both test agars, and phenotypic meropenem resistance as demonstrated by MHA using the screen breakpoint of >25mm to indicate a suspect CPO.

The only β CARBA "false-negative" result was from an *Aeromonas hydrophila*. Since this species is intrinsically carbapenem-resistant due to chromosomal *cpbA*, it is not considered a true CPO in the epidemiological sense. If encountered, this species should be excluded from further CPO testing based on its identity. For this reason, it was excluded from β CARBA specificity calculations. But as it mounted a reliably strong β CARBA-positive reaction, this species could be retained as a safe quality control isolate for this and equivalent tests, so to be readily discernible from potentially cross-contaminating CPO in clinical laboratories.

Table 1. Characteristics of 259 bacteria and agars used to evaluate Bio-Rad's β CARBA assay

Class	CPO Genotypes (No.)	Species Identification	Blood agar (No.)	MHA Subst (No.)
Class A CPO (108)	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaKPC (90)	Enterobacteriaceae	2	0
Class B CPO (80)	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM (71)	Enterobacteriaceae	1	1
Class D CPO (26)	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaOXA48 (21)	Enterobacteriaceae	1	1
Class E CPO (17)	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
	blaNDM-blaNDM (12)	Enterobacteriaceae	1	1
Class F CPO (44)	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
	blaIMP7 (3)	Enterobacteriaceae	2	0
Non-CPO (38)	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1
	ompC/ompX (2)	Enterobacteriaceae	1	1

Table 2. Summary of CPO detection results obtained using Bio-Rad's β CARBA assay when challenged by 159 distinct isolates cultivated on two common laboratory agars

CPO Genotypes	No. (1) Blood agar	No. (2) Mueller-Hinton agar	Tot. (3) Tested
blaKPC	99 (84.3%) (100)	11 (9.3%) (100)	110 (82.3%) (100)
blaNDM	71 (87.5%) (100)	8 (9.7%) (100)	79 (84.1%) (100)
blaOXA48-like	28 (93%) (100)	0 (0%) (100)	28 (93%) (100)
blaNDM-blaNDM-like	7 (42%) (100)	10 (58%) (100)	17 (100%) (100)
blaNDM	6 (50%) (100)	6 (50%) (100)	12 (100%) (100)
blaGES5	1 (10%) (100) (weak)	1 (10%) (100)	2 (20%) (100)
blaNDM-c	2 (60%) (100)	1 (30%) (100)	3 (90%) (100)
blaNDM	1 (60%) (100)	1 (60%) (100)	2 (100%) (100)
blaIMP7	1 (33%) (100)	1 (33%) (100)	2 (100%) (100)
Non-CPO	37 (100%) (100)	1 (2.6%) (100)	38 (100%) (100)
Non-CPO (intrinsic cpbA)	1 (100%) (100)	ND	1 (100%) (100)
Total CPO tested	331 (99.3%) (100)	58 (17.4%) (100)	379 (99.3%) (100)
Total non-CPO tested	38 (14.7%) (1.6)	18 (6.9%) (0.8)	56 (18.3%) (1.8)
Total isolates tested	359	76	435

Table 3. Overall Bio-Rad β CARBA test CPO detection performance from two common agars

β CARBA Sensitivity for any CPO	98.2% (95% CI: 95.8-99.3)
β CARBA Specificity (excluding intrinsic mechanisms)	100% (95% CI: 92-100)

DISCUSSION & CONCLUSION

Bio-Rad's β CARBA phenotypic CPO detection assay

- ✓ Simple to use and very easy to interpret (<1 minute hands-on time)
- ✓ Clear results available within 30 minutes
- ✓ Only 1ul loop of bacterial colonies required to set up test
- ✓ Accurate results from most common agars - Mueller-Hinton agar, Columbia-based sheep blood agar (insert precludes use of β CARBA from colonies on MacConkey-based agars citing unreliable results)
- ✓ Highly specific (100%) - no false-positive at 30min with the exception of genera with intrinsic resistance (exclude these based on identity)
- ✓ Highly sensitive (98.2%) for overall CPO detection, with 100% detection in the most common CPO such as bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, and very notably in the troublesome bla_{OXA48}-like genotypes
- ✗ Unreliable for detecting the rare bla_{NMC} (1/9) and bla_{GES5} (0/2) CPO

In conclusion, β CARBA is a cost-effective, low-complexity assay as it is relatively inexpensive, quick and easy to use, extremely simple to interpret, thus improves laboratory workflow. When faced with a possible CPO, β CARBA provides highly sensitive/specific results in 30min from only 1ul loop of organism, unlike similar phenotypic tests that require more colonies and lengthier incubations.

Acknowledgements

β CARBA test kits sufficient to complete this study were kindly provided by Bio-Rad

Allegato 2 - Evaluation of the novel β CARBA test (Bio-Rad) for rapid identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in different samples

Introduction and purpose

Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE) are now emerging at an alarming rate worldwide and are so of concern that the World Health Organisation (WHO) has classified CPE as one of the three greatest threats to human health.^[1]

Infections caused by CPE are associated with significant mortality and are difficult to treat.^[2] Besides, CPE can easily spread, with intestinal carriage known to be as an important source of transmission.^[3] Therefore, there is an urgent need for accurate and fast detection of CPE in diagnostic laboratories.

In this study, we evaluated the ability of the novel β CARBA test (Bio-Rad) to rapid detection (within 15-30 minutes) of CPE directly on clinical samples including positive blood cultures and urines, but also on *Enterobacteriaceae* colonies recovered from rectal swabs.

Methods

Samples tested

412 specimens were investigated including: 50 blood cultures positive for Gram negative rods; 200 unselected urines and 50 selected urines on the basis of the prescribing ward (hemorrhagic urines or urines with too much precipitates were excluded); 112 rectal swabs.

β CARBA test

The β CARBA test is based on the use of a chromogenic substrate that turns the original yellow colour in a frank orange/red/purple when a carbapenemase is produced by the isolate tested (positive test) [Table 1].

Table 1. Operating procedures of β CARBA test according to the sample tested.

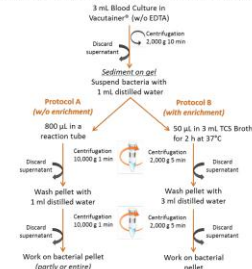
	Positive blood cultures*	Urines*	Colonies recovered from rectal swabs
Bacterial inoculum	Bacterial pellet obtained with or w/o enrichment	Bacterial pellet obtained after centrifugation of 1.5 ml urine for 5 min at 3,000 g	1 μ l loop (full and rounded)
Inoculation	In one single-microtube 40 μ l, each R1 and R2 + inoculum homogenisation		
Incubation/reading	At 37°C up to 30 minutes (readings at 15 min and 30 min)		
Reading and Interpretation	> Color turns to clear orange, red or purple = positive reaction (presence of CPE) > No change in color to clear orange, red or purple at 30 min = negative reaction (absence of CPE)		

*A confirmation of the results found with the β CARBA test was realized on colonies obtained from the same samples.

Testing Methodology

The β CARBA was performed on: i) freshly isolated colonies recovered from rectal swabs by using the screening medium chromID[®] CARBA (bioMérieux), ii) freshly collected urines (primary sample), iii) positive blood cultures [Table 1]. The performances of blood cultures were evaluated using two different protocols (Figure 1). All results were compared to routine methods used in the laboratory workflow (reference methods).

Figure 1. Sample preparation of pellet starting from positive blood culture.



Results

Positive blood cultures

- Among 50 positive blood cultures, 6 were found positive and 44 negative with the β CARBA test whatever the protocol used [Table 2].
- Results agreed at 100% with reference (ref) method [Table 2], and to those obtained from colonies.
- All results were already positive within 15 min with Protocol B (50% with protocol A).
- The 6 EPC identified were all KPC producers (4 *K. pneumoniae* and 2 *E. coli*).
- Among negative results, 4 isolates were found to produce an ESBL.

Table 2. Results of the β CARBA test directly performed on positive blood cultures.

β CARBA test protocol A or B	Reference method	
	CPE +	CPE -
Positive	6	0
Negative	0	44

Table 3. Results of the β CARBA test directly performed on selected urines.

β CARBA test	Reference method	
	CPE +	CPE -
Positive	4	0
Negative	0	46

Urines

- Among 200 unselected urines tested, 81 were infected (mostly by *E. coli*, 62%); all were negative with the β CARBA test: no interference with the sample-type has been observed.
- Among 50 selected urines, 4 were positive (KPC-producing *K. pneumoniae*) and 46 were negative with the β CARBA test [Table 3].
- For both (selected and unselected urines), results agreed at 100% with ref method, and to those obtained from colonies.
- Colors of reaction were yellow to slight orange for negative β CARBA test results, and dark orange to red for positive β CARBA test results.

Rectal swabs

- Among 112 isolates recovered from rectal swabs, 108 were found positive and 4 negative with the β CARBA test.
- 100% agreement was found between β CARBA test and ref method.
- Among EPC, KPC was predominant (86.1%) followed by metallo- β -lactamases and OXA-48.
- The 4 negatives produced ESBL (n=2) or AmpC with porin defects (n=2).

Conclusions

100% agreement vs. ref methods was found with results obtained with β CARBA test whatever the protocol used. With a CPE detection that can be performed directly on clinical samples, with a fast turnaround time, and with no technical expertise and additional equipment required, we suggest that the β CARBA test can play a role i) in the management of infected patients, ii) in the strategy to limit the spread of CPE.

References

1. World Health Organization, 2018. Antimicrobial resistance global report on surveillance. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
2. J. Heblak, O. Chudiková and C. Papagiannidis. Detection of carbapenemase in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 839-851.
3. V. Van R, Frank RM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye E, Donnelly CJ, Perez F, Enlimali A, Bonomo RA. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods. Clin Microbiol Rev. 2016; 29:1-27.



RINGRAZIAMENTI

Dopo il primo traguardo di Laurea Triennale mi trovo a scrivere una seconda tesi, questa volta però, di Laurea Magistrale.

Il primo pensiero va egoisticamente a me stessa, al mio percorso universitario, alla tenacia e alla volontà che mi hanno accompagnato e che mi sono state impartite dalla mia famiglia nei confronti dello studio. Mi hanno educato nel non demordere, a stringere i denti di fronte alle difficoltà, ma soprattutto mi hanno sempre insegnato a cogliere ciò che la vita mi offre di nuovo e all'importanza di sapermi meravigliare.

Così, un secondo pensiero va alle “nuove” cose che ho imparato in questi due anni di Laurea Magistrale.

Grazi ai professori che ho incontrato in questo percorso, grazie a chi ha saputo trasmettermi quel di più che già non avevo conosciuto con la laurea precedente. Grazie per le competenze maggiori che ho acquisito, per avere allargato i miei orizzonti e per non avere mai pensato di avere fatto una scelta sbagliata a decidere per questo corso di studi.

Voglio inoltre ringraziare la mia relatrice, riferimento fondamentale per la stesura della tesi.

Un ringraziamento speciale va anche al Dott. che mi ha dato la possibilità di svolgere il periodo di tirocinio e di prova finale presso l'Unità Operativa Microbiologia Laboratorio Unico del Centro Servizi AUSL della Romagna, per avermi fatto conoscere una realtà piuttosto ampia e complessa.

Infine, ringrazio tutti coloro che ho incontrato in questo cammino, a chi è entrato e uscito dalla mia vita ma ha saputo regalarmi qualcosa di importante e che ho archiviato nel mio bagaglio culturale.

Grazie a chi ha saputo “arricchirmi” di sapere.

Un grosso e grande grazie anche alle persone che non ho citato, ma che hanno saputo fornirmi sostegno e supporto morale e che sono stati in grado di condividere con me gli istanti più intensi di questo traguardo.

Tra di loro, un piccolo - grande grazie al mio cuginetto Federico per l'essersi sempre interessato a me, in un modo o nell'altro.

Grazie a tutti voi ...

Erika

