



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA

Uso della gentamicina orale per l'eradicazione dello stato di portatore
di *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi (KPC-Kp) nei
pazienti pediatrici immunocompromessi: esperienza
dell'U.O. di Oncoematologia Pediatrica di Pisa

RELATORE:

Dott.ssa Mariacristina Menconi

CANDIDATO:

Beatrice Masini

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

INDICE

ELENCO DELLE FIGURE	4
ELENCO DELLE TABELLE.....	5
ABBREVIAZIONI E ACRONIMI	6
RIASSUNTO	9
INTRODUZIONE	12
CAPITOLO 1: INQUADRAMENTO GENERALE	12
1.1 L'ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA	12
1.2 EPIDEMIOLOGIA DEI TUMORI PEDIATRICI.....	12
CAPITOLO 2: KLEBSIELLA PNEUMONIAE-KPC.....	17
2.1 KLEBSIELLA PNEUMONIAE-KPC E CARATTERISTICHE CLINICHE DELLE INFEZIONI.....	17
2.2 ASPETTI EPIDEMIOLOGICI.....	22
2.2.1 DIFFUSIONE DI KLEBSIELLA PNEUMONIAE KPC IN ITALIA	23
2.2.2 K. PNEUMONIAE MULTIRESISTENTE NELLA REGIONE TOSCANA	24
2.3 RILEVAMENTO DI ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI CARBAPENEMASI	27
2.4 INFEZIONI DA KPC-Kp IN PAZIENTI ONCOLOGICI ED EMATOLOGICI IMMUNOCOMPROMESSI	35
2.5 INFEZIONI DA KPC-Kp NEI PAZIENTI PEDIATRICI	37
2.6 INCIDENZA DELLA COLONIZZAZIONE E DELLE INFEZIONI DA ENTEROBATTERI RESISTENTI AI CARBAPENEMI NEI BAMBINI SOTTOPOSTI A TRATTAMENTI DI CHEMIOTERAPIA ANTINEOPLASTICA IN ITALIA.....	38
2.7 TRATTAMENTO TERAPEUTICO DELLE INFEZIONI.....	39
2.8 DECONTAMINAZIONE INTESTINALE E SCELTA DELLA GENTAMICINA	42
STUDIO SPERIMENTALE... ..	47
CAPITOLO 3: SCOPO DELLA TESI	47

CAPITOLO 4: PAZIENTI E METODI	48
4.1 SOGGETTI INCLUSI NELLO STUDIO	48
4.2 CONSENSO INFORMATO E COMITATO ETICO.....	49
4.3 DEFINIZIONI.....	49
4.4 MANAGEMENT DEI PORTATORI IN DEGENZA ORDINARIA E IN DAY HOSPITAL	50
4.5 RICERCA MICROBIOLOGICA.....	52
4.6 SOMMINISTRAZIONE DI GENTAMICINA ORALE	54
4.7 FOLLOW UP.....	55
4.8 ELABORAZIONE DATI	55
CAPITOLO 5: RISULTATI	56
CAPITOLO 6: DISCUSSIONE	65
CAPITOLO 7: CONCLUSIONI	68
BIBLIOGRAFIA	69
RINGRAZIAMENTI	75

ELENCO DELLE FIGURE

1.1	Tassi standardizzati per età e per genere nella popolazione europea per i principali gruppi di neoplasie maligne. Fascia d'età: 0-14 anni. AIRTUM, 2003-2008.....	13
1.2	Tassi annuali di incidenza per milione e frequenze dei principali tumori maligni diagnosticati negli adolescenti (15-19 anni) per genere. Banca dati AIRTUM, 2003-2008.....	14
1.3a	Trend di sopravvivenza a 5, 10 e 15 anni dalla diagnosi di tumore maligno nei bambini.....	15
1.3b	Trend di sopravvivenza a 5, 10 e 15 anni dalla diagnosi di tumore maligno negli adolescenti.....	16
2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> al microscopio elettronico a scansione (SEM).....	17
2.2	Immagine di <i>Klebsiella pneumoniae</i> al SEM con falsi colori.....	18
2.3	Possibili siti di contaminazione in UTI.....	18
2.4	Classificazione di Ambler.....	20
2.5	Fattori epidemiologici e diffusione della KCP-Kp attraverso i continenti.....	22
2.6	Profili di sensibilità agli antibiotici saggiati su isolati di <i>K. pneumoniae</i> . Toscana 2014.....	25
2.7	<i>K. pneumoniae</i> : percentuale di isolati resistenti ai carbapenemi nei territori delle aziende sanitarie toscane (Toscana, 2014) e nei paesi europei (2014).....	26
2.8	Test di diffusione su agar-KPC-Kp.....	28
2.9	Tecnica della microdiluzione in brodo.....	28
2.10	Metodo E-test® su Mueller-Hinton agar.....	29
2.11	Test di Hodge modificato (MHT).....	31
2.12	Test di inibizione con acido boronico.....	31
2.13	Carba NP test.....	33
2.14	PCR del gene <i>bla_{KPC}</i>	34
2.15	Incidenza delle infezioni da CRKp nei pazienti sottoposti a trapianto autologo e allogenico.....	36
5.1	Grafico a dispersione o “Line plot” dei quattro pazienti trattati con decontaminazione intestinale selettiva di KPC-Kp con gentamicina orale.....	60

ELENCO DELLE TABELLE

2.1	Profili di sensibilità agli antibiotici saggiati su isolati di <i>K. pneumoniae</i>	25
2.2	Strategie di identificazione dei ceppi produttori di carbapenemasi	27
2.3	Breakpoints degli enterobatteri secondo le linee guida statunitensi (CLSI) ed europee (EUCAST)	29
2.4	Studi clinici sulla decontaminazione orale di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nella popolazione generale e nei pazienti con patologie ematologiche maligne	46
2.5	Regimi di decolonizzazione utilizzati negli studi clinici	46
4.1	Variabili valutate nella popolazione inclusa nello studio	49
4.2	Breakpoints delle linee guida EUCAST (versione 3.1) relative ai carbapenemi	53
4.3	Breakpoints EUCAST degli aminoglicosidi	53
4.4	Breakpoints EUCAST di colistina e fosfomicina	54
5.1	Caratteristiche dei pazienti, diagnosi e trattamento	57
5.2	Riassunto delle caratteristiche dei pazienti in studio sottoposti a decontaminazione con gentamicina orale	58
5.3	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) verso i principali antibiotici efficaci nel trattamento delle infezioni da KPC-Kp. Antibiogramma del primo campione positivo per ogni paziente.....	63

ABBREVIAZIONI E ACRONIMI

AIC	Autorizzazione all'Immissione in Commercio
AIEOP	Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica
AIRTUM	Associazione Italiana Registri Tumori
AOUP	Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana
API	Analytical Profile Index (Indice di Profilo Analitico)
BMT	Bone Marrow Transplantation (Trapianto di Midollo Osseo)
BSI	Blood Stream Infections (Infezione batteriemia)
CCI	Charlson Comorbidity index
CFU	Colony Forming Unit (Unità Formanti Colonia)
CHOP-AVP	(C) Ciclofosfamide, (H) Idrossidaunorubicina (Doxorubicina o Adriamicina), (O) Oncovin (Vincristina) e (P) Prednisone - (A) Adriamicina, (V) Vincristina, (P) Procarbazine
CHOP-VP16	CHOP-Etoposide
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute (Istituto per gli Standard Clinici e di Laboratorio)
CPE	Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (Enterobatteri produttori di carbapenemasi)
CRKp	Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae resistente ai carbapenemici)
CSAT	Terapia Antibiotica Sistemica Concomitante
CVC	Catetere Venoso Centrale
DPI	Dispositivi di Protezione Individuale
EARS-Net	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Rete Europea di Sorveglianza della Resistenza Antimicrobica)
ECDC	European Center for Disease Prevention and Control (Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie)

ECIL	European Conference on Infections in Leukemia (Conferenza Europea sulle Infezioni nei Pazienti Leucemici)
ESBL	Beta-lattamasi a Spettro Esteso
ETP	Early-T cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia (Leucemia Linfoblastica Acuta da precursori delle cellule T)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Commissione europea per test di suscettibilità agli antibiotici)
GITMO	Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo
GVHD	Graft Versus Host Disease (Malattia del trapianto contro l'ospite)
ICARE	Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (Epidemiologia della Resistenze Antimicrobiche nelle Terapie Intensive)
ICCC	International Classification for Childhood Cancer (Classificazione Internazionale dei Tumori Infantili)
KPC-KP	Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (Desorbimento/ionizzazione Laser Assistito da Matrice accoppiato a spettrometria di massa con analizzatore a tempo di volo)
MDR	Multidrug Resistance (Multifarmaco Resistenza)
MUD	Mismatched Unrelated Donor (Donatore Non Familiare Parzialmente Compatibile)
NICU	Neonatal Intensive Care Unit (Unità di Terapia Intensiva Neonatale)
OSS	Operatore Socio-sanitario
PICU	Pediatric Intensive Care Unit (Unità di Terapia Intensiva Pediatrica)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reazione a Catena Polimerasica)
QID	Quater in die
R	Resistente
S	Sensibile
SART	Rete di sorveglianza dell'antibiotico resistenza in Toscana
SCT	Stem Cell Transplantation (Trapianto di Cellule Staminali)

SDD	Selective Digestive Decontamination (Decontaminazione Intestinale Selettiva)
SEM	Scanning Electron Microscope (Microscopio Elettronico a Scansione)
SNC	Sistema Nervoso Centrale
TCSE	Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche
UO	Unità Operativa
UTI	Unità terapia intensiva
UV	Ultravioletti

RIASSUNTO

Introduzione. *Klebsiella pneumoniae* produttore di carbapenemasi di tipo KPC è un microrganismo multifarmaco resistente (MDR) responsabile di infezioni, associate ad alto rischio di mortalità, verso le quali si hanno scarse possibilità terapeutiche. Questo germe colonizza il tratto gastrointestinale dell'uomo favorendo lo sviluppo dello stato di portatore e la disseminazione epidemica, tanto da richiedere una sorveglianza attiva e la messa in atto di strategie per prevenire la diffusione intra ed extra-ospedaliera. I trattamenti intensivi per patologie neoplastiche ed ematologiche e il trapianto di cellule staminali sono fattori predisponenti lo sviluppo di infezioni da parte di KPC-Kp, che a loro volta rappresentano una controindicazione all'esecuzione di alcune procedure come interventi chirurgici, trapianti d'organo o altri trattamenti.

Scopo. Lo scopo di questo studio è quello di valutare la capacità di ottenere la decontaminazione intestinale di *Klebsiella pneumoniae* KPC in pazienti pediatrici immunocompromessi mediante l'uso off-label di gentamicina fiale (4 mg/kg/die in 3 somministrazioni per via orale) al fine di prevenire la persistenza dello stato di portatore ed eliminare il rischio di infezione sistemica, particolarmente elevato nelle fasi di neutropenia indotte dalla chemioterapia, così da rendere possibili protocolli di terapia intensiva e di TCSE (Trapianto di Cellule Staminali Ematopoietiche).

Pazienti e metodi. Sono stati inclusi nel nostro studio pazienti pediatrici ammessi, tra il settembre 2014 e l'agosto 2016, presso il dipartimento di Oncoematologia Pediatrica di Pisa identificati come portatori di KPC-Kp dalla sorveglianza di colture su tamponi rettali. È stata somministrata gentamicina orale, alla dose di 4 mg/Kg/die in tre somministrazioni, ai pazienti con tampone positivo fino ad ottenere l'eradicazione dello stato di portatore e prolungata, fintanto sia risultato necessario, nei pazienti ad alto rischio, ovvero pazienti con neutropenia o che dovevano essere sottoposti successivamente a chemioterapia intensiva o TCSE. I pazienti che hanno sviluppato una sepsi da KPC-Kp sono stati trattati con una terapia antibiotica empirica basata su una combinazione di farmaci somministrati per via endovenosa (meropenem, gentamicina, colistina e rifampicina) indicata dall'ECIL-4 e definita CTAT (CRKp-Targeted Antibiotic Therapy).

Risultati. Durante un periodo di circa 24 mesi, 5 pazienti pediatrici sono stati identificati come portatori di KPC-Kp. L'età media dei bambini era di 8.4 (± 5.3) anni. Una ragazza di 17 anni, la paziente zero, è morta in seguito al trasferimento in UTI per shock settico da KPC-Kp pertanto non è stata inclusa nello studio e non è stato possibile iniziare il trattamento con gentamicina orale in fiale. Nello stesso periodo altri quattro pazienti sono stati identificati come portatori. La gentamicina orale è stata somministrata a tutti i pazienti per una durata media di 229.25 gg (range: 123-372 gg). I livelli ematici di gentamicina sono stati misurati in tutti e quattro i pazienti ed è stata rilevata una concentrazione media di 0.24 mg/L (range: 0.0 e 0.4 mg/L). Tre pazienti sono stati decontaminati dopo una media di 105 giorni (range: 20-200 gg), mentre un paziente non è stato decontaminato; aveva due test fenotipici negativi ma test molecolare positivo per *K. pneumoniae*-KPC ed è stato colonizzato da un ceppo resistente alla gentamicina scoperto durante il trattamento orale. Il bambino nel corso di un episodio di neutropenia ha inoltre sviluppato una severa sepsi, causata da un ceppo di KPC-Kp sensibile alla gentamicina, che è stata trattata con successo con una terapia antibiotica di combinazione basata sull'uso di colistina, gentamicina, meropenem e rifampicina. Durante il periodo di decontaminazione è stato selezionato un ceppo resistente alla gentamicina in 1 su 4 dei bambini trattati. Tutti i ceppi di KPC-Kp isolati sono risultati sensibili alla colistina e alla tigeciclina, per alcuni è stata documentata sensibilità anche alla fosfomicina mentre, per quanto riguarda le altre molecole antibiotiche testate, tutti i ceppi avevano sviluppato resistenza verso questi antimicrobici. La concentrazione di KPC-Kp nei campioni di feci, prelevati in seguito alla positivizzazione dei tamponi rettali, è stata in media di 3×10^8 CFU/g (range: 1×10^8 - 6×10^8 CFU/g). Non sono stati osservati significativi effetti collaterali al trattamento orale con gentamicina e durante il follow up nessuno dei pazienti ha sviluppato infezioni da parte di KPC-Kp. Nessun'altro bambino ammesso in seguito presso l'U.O. di Oncoematologia Pediatrica è stato individuato come portatore.

Discussione. L'espansione dei ceppi di KPC-Kp nei centri di Oncoematologia Pediatrica in Italia è ben documentata dai dati disponibili in letteratura, che mostrano un aumento dell'incidenza delle infezioni da parte di questo microrganismo MDR e una mortalità del 15.9% nei bambini KPC-Kp positivi. Nel nostro studio si propone di utilizzare gentamicina orale per eradicare lo stato di portatore con l'obiettivo di procedere con chemioterapie e trapianto di cellule staminali ematopoietiche in pazienti pediatrici immunocompromessi, che non potrebbero altrimenti essere sottoposti a questo tipo di trattamenti. La decontaminazione potrebbe permettere ai clinici di eseguire TCSE nei pazienti colonizzati anche se finora non

tutti gli esperti erano concordi nell'eseguire queste procedure terapeutiche, soprattutto allo-TCSE, quantomeno in soggetti adulti ematologici. Durante la decontaminazione con gentamicina non sono state osservate nefrotossicità, ototossicità né altre reazioni avverse in nessuno dei quattro pazienti studiati. Anche il paziente al quale il farmaco è stato somministrato per un periodo più lungo (372 gg) non ha manifestato effetti avversi, non è stato individuato infatti assorbimento gastrointestinale. Questo risultato potrebbe pertanto fornire una maggiore garanzia per quanto riguarda la sicurezza della somministrazione orale di gentamicina.

Conclusioni. Nonostante il numero di pazienti sia piccolo questo studio suggerisce che, qualora si sviluppino episodi epidemici da KPC-Kp in reparti di terapia intensiva e di Oncoematologia Pediatrica, una strategia possibile risulta essere quella di utilizzare gentamicina orale. La pesante e prolungata colonizzazione intestinale rappresenta infatti il più importante fattore di rischio per lo sviluppo di successive infezioni oltre che il pericoloso *reservoir* per la disseminazione del batterio. La decolonizzazione intestinale inoltre risulta rilevante in una popolazione di pazienti come quella composta dai bambini ricoverati presso l'unità operativa di Oncoematologia Pediatrica. Questi soggetti durante il ricovero e/o il day hospital sono infatti sottoposti a procedure terapeutiche che inducono immunodepressione e neutropenia, entrambe condizioni che potrebbero favorire, in pazienti positivi per *K. pneumoniae* KPC, lo sviluppo di infezioni batteriemiche, le quali sono associate ad elevata mortalità dal momento che le terapie antibiotiche a disposizione contro questi patogeni multiresistenti sono sempre più limitate.

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1

INQUADRAMENTO GENERALE

1.1 L'ONCOEMATOLOGIA PEDIATRICA

L'Oncoematologia Pediatrica è un ramo della medicina che si occupa delle patologie ematologiche (anemie congenite e acquisite, aplasie ed ipoplasie midollari, talassemie, emoglobinopatie, coagulopatie, etc.) e oncologiche (leucemie, linfomi, tumori del SNC, tumori ossei, neuroblastomi, sarcomi dei tessuti molli, tumori rari etc.) dell'infanzia oltre che del trapianto autologo e allogenico di midollo osseo e cellule staminali. Ha come obiettivo la diagnosi, il trattamento e il follow-up, per la precoce identificazione di recidive ed effetti collaterali a determinate terapie, di tutte le patologie oncoematologiche dell'età pediatrica. Oltre all'attività clinica e ai trattamenti polichemio-radioterapici, applicati seguendo protocolli multicentrici nazionali ed internazionali, nei centri di Oncoematologia vengono fornite terapie di supporto e sostegno psicologico sia al bambino che alla sua famiglia con lo scopo non solo di curare il paziente, ma anche di migliorare la sua qualità di vita e garantire un'assistenza globale.

1.2 EPIDEMIOLOGIA DEI TUMORI PEDIATRICI

Dalla collaborazione tra l'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTUM) e l'Associazione Italiana di Ematologia e Oncologia Pediatrica (AIEOP), che forniscono una sorveglianza epidemiologica sui tumori dell'infanzia e dell'adolescenza, è nato uno studio (AIRTUM 2012) dedicato ai tumori infantili in Italia che aggiorna il precedente rapporto del 2008. Nei sei anni di registrazione (2003-2008), che si aggiungono all'analisi dei dati del rapporto AIRTUM precedente, sono stati identificati 2.855 nuovi casi di tumore maligno. Ci sono stati 164 casi di tumore per milione di bambini di età compresa tra 0 e 14 anni con un rapporto maschi/femmine pari a 1.2.

Il rischio fra 0 e 14 anni è di 2.4‰, cioè 1 su 413 nuovi nati svilupperà un tumore prima di compiere 15 anni. In Europa i tumori sono la prima causa di morte per malattia nella fascia di età 0-14 anni e la seconda dopo cause violente come incidenti stradali, avvelenamenti e traumi.¹

In Italia, escluse le complicanze del parto e del periodo perinatale, i tumori hanno rappresentato la prima causa di morte infantile nel 2008 (27% di decessi per tumore, 22% per cause esterne).²

La distribuzione per tipo di neoplasia, secondo la classificazione ICC-3 (International Classification for Childhood Cancer), in Italia è in linea con quella dei paesi occidentali (**Fig.1.1**): le leucemie sono le neoplasie più frequenti (33%), seguite da linfomi (16%), tumori maligni del SNC (13%) che arrivano al 18% se si includono i tumori non maligni del sistema nervoso centrale, i tumori del sistema nervoso simpatico (8%) e dei tessuti molli (7%). Gli altri tipi (tumori renali, ossei, tumori a cellule germinali, retinoblastomi ecc.) rappresentano ognuno non più del 5%.

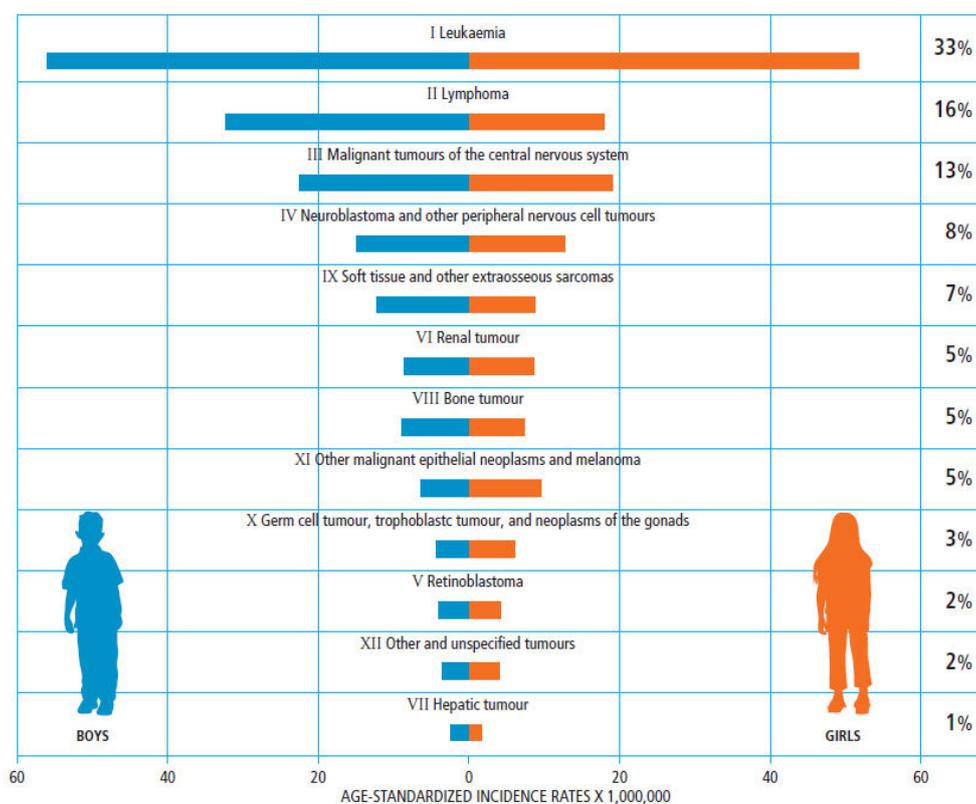


Fig. 1.1 Tassi standardizzati per età e per genere nella popolazione europea per i principali gruppi di neoplasie maligne. Fascia d'età: 0-14 anni. AIRTUM, 2003-2008.³

Il tasso di incidenza per tutti i tumori maligni negli adolescenti per il periodo 2003-2008 è di 269 casi per milione ed è invariato rispetto a quello osservato nel periodo 1998-2002, (270 casi per milione).

L'incidenza dei tumori negli adolescenti (15-19 anni) è maggiore di quella registrata nei bambini di 0-14 anni; è del 30% in più rispetto a quella dei bambini con meno di 5 anni e quasi il doppio rispetto ai bambini di età 5-9 e 10-14 anni.

I tumori più frequenti negli adolescenti sono i linfomi di Hodgkin (65/1.000.000/anno), seguiti da tumori della tiroide (31/1.000.000/anno), leucemie (30/1.000.000/anno), tumori delle cellule germinali (27/1.000.000/anno) e linfomi non-Hodgkin (20/1.000.000/anno). (Fig. 1.2) Vediamo inoltre come negli adolescenti cominciano a comparire tumori di origine epiteliale e non tipici dell'età adulta come i carcinomi della tiroide (più frequenti nel sesso femminile), i melanomi, i carcinomi della pelle e del nasofaringe.

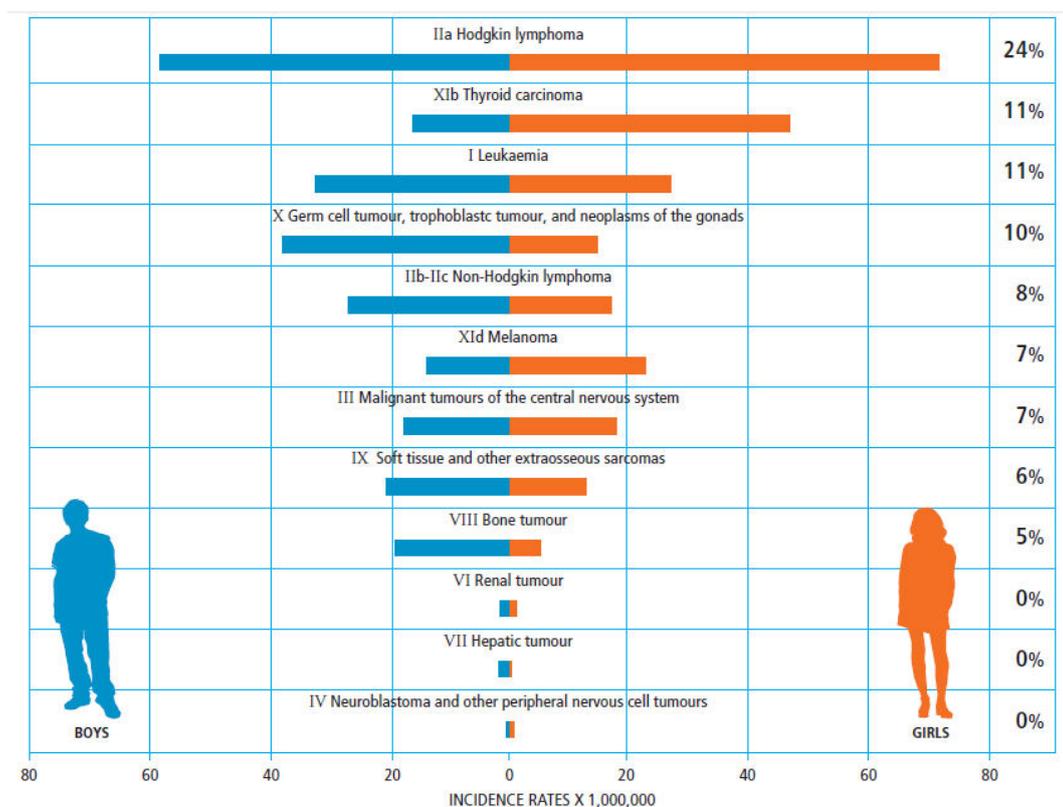


Fig. 1.2 Tassi annuali di incidenza per milione e frequenze dei principali tumori maligni diagnosticati negli adolescenti (15-19 anni) per genere. Banca dati AIRTUM, 2003-2008.³

Per quanto riguarda i tassi di sopravvivenza, nella fascia di età 0-14 la sopravvivenza a 5 anni da una diagnosi di tumore maligno è del 12%, si è avuto pertanto un miglioramento passando dal 70% del periodo 1988-1993 all'82% del periodo 2003-2008. (Fig. 1.3a)

La sopravvivenza a 15 anni è superiore al 75% e vicina al valore stimato a 5 anni. Questo indica che i bambini in remissione dopo 5 anni dalla diagnosi hanno un'aspettativa di vita paragonabile a quella dei loro coetanei a cui non è stato diagnosticato un tumore.

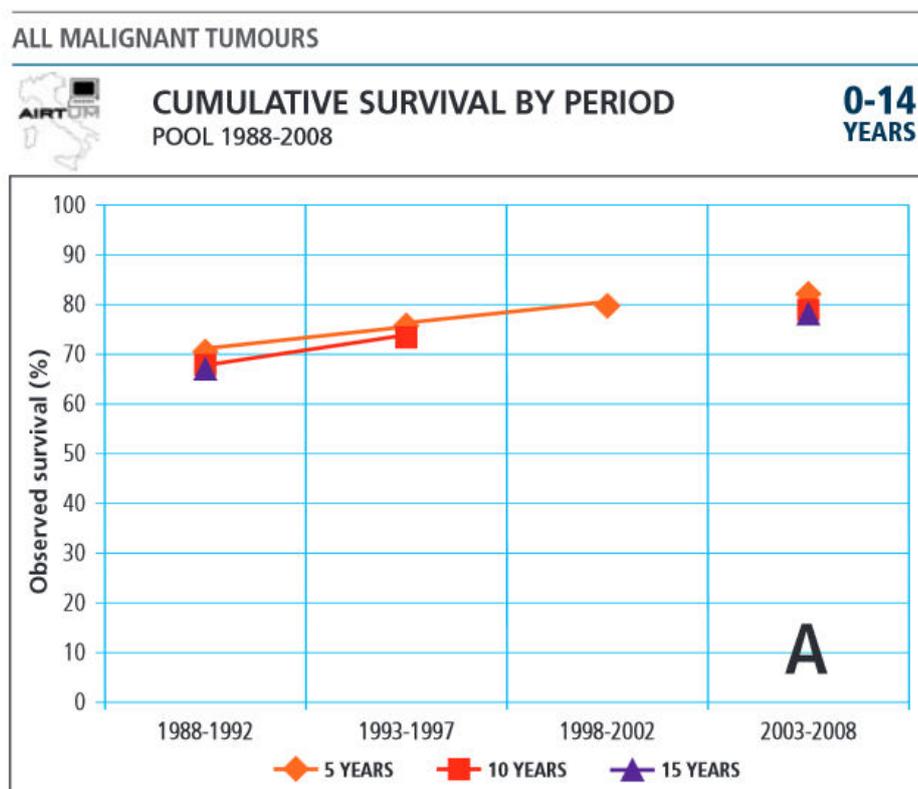


Fig. 1.3a Trend di sopravvivenza a 5, 10 e 15 anni dalla diagnosi di tumore maligno nei bambini. AIRTUM, 1988-2008.³

A differenza dei bambini, per i quali sono stati sviluppati centri di Oncoematologia Pediatrica in cui si forniscono protocolli di diagnosi e trattamento evidence-based, per molto tempo e in parte ancora oggi, per gli adolescenti non ci sono centri dedicati. Non avendo centri di riferimento gli adolescenti possono ricevere protocolli terapeutici diversi a seconda della struttura in cui vengono curati. In Italia la sopravvivenza a 5 anni di pazienti adolescenti affetti da patologie tumorali è dell'86% mentre quella a 15 anni è più dell'80%. Il tasso di sopravvivenza è migliorato negli ultimi anni, con un incremento del 17% nell'ultimo periodo (2003-2008) rispetto al primo (1998-2002). (Fig. 1.3b)

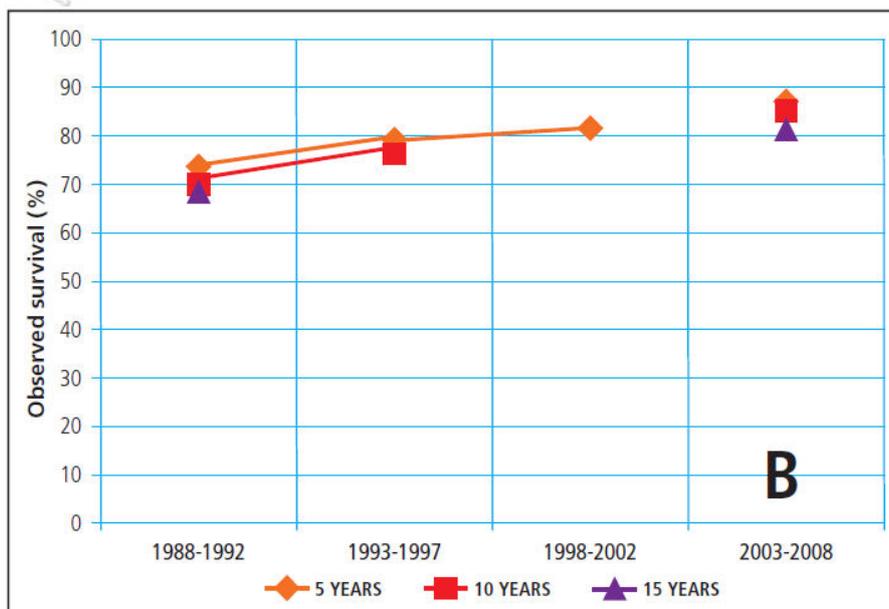


Fig. 1.3b Trend di sopravvivenza a 5, 10 e 15 anni dalla diagnosi di tumore maligno negli adolescenti. AIRTUM, 1988-2008.³

In generale possiamo dire che la sopravvivenza oncologica osservata in età pediatrica e adolescenziale è superiore a quella in età adulta; nei bambini e negli adolescenti infatti la sopravvivenza a 15 anni dalla diagnosi è simile a quella osservata a breve termine (a 5 anni). Questo aspetto è correlabile alla disponibilità e all'utilizzo di protocolli di trattamento maggiormente efficaci e standardizzati oltre che all'assenza di comorbidità nei bambini rispetto ai pazienti adulti. L'elevato numero di pazienti pediatrici guariti e le caratteristiche biologiche di un organismo in evoluzione come quello di un bambino rendono comunque necessaria un'attenta osservazione nel tempo con il fine di rilevare possibili conseguenze a distanza secondarie ai trattamenti, come l'insorgenza di secondi tumori, di patologie cardiache o respiratorie, ma anche lo sviluppo di difficoltà di inserimento sociale dei pazienti. Risulta importante approfondire lo studio dei tumori in età adolescenziale in quanto spesso questa categoria di pazienti viene esclusa dagli studi clinici controllati e inoltre, non esistendo protocolli specifici, non è chiaro se debbano venire trattati come pazienti pediatrici o adulti.^{4,3}

CAPITOLO 2

KLEBSIELLA PNEUMONIAE-KPC

2.1 KLEBSIELLA PNEUMONIAE-KPC E CARATTERISTICHE CLINICHE DELLE INFEZIONI

Klebsiella è un bacillo gram negativo, asporigeno, non mobile, capsulato, anaerobio facoltativo, appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae⁵. Tra le specie patogene la più rilevante e clinicamente importante è rappresentata da *Klebsiella pneumoniae* (Fig. 2.1, 2.2). Questo microorganismo è localizzato in alcune nicchie ambientali (come il suolo e l'acqua) oltre ad essere un abituale commensale dell'intestino, delle prime vie aeree e dell'apparato urogenitale. *K. pneumoniae* colonizza infatti il tratto gastroenterico dell'uomo, che rappresenta la principale riserva di tale germe, soprattutto a livello del tenue e del colon (5-38% dei campioni fecali raccolti nella popolazione generale è positivo al batterio) ma anche il nasofaringe (1-6% dei campioni nasofaringei è positivo) e la cute.⁶ Il principale fattore di virulenza descritto per *K. pneumoniae* è rappresentato dalla capsula polisaccaridica: sono noti circa 70 antigeni capsulari (K) e 11 somatici (O) che consentono la differenziazione in sierotipi. Alcuni di essi, come il K1 e K2, mostrano una maggiore invasività rispetto ad altri e il meccanismo con il quale la capsula conferisce virulenza sembra essere rappresentato dalla capacità di inibire la fagocitosi. Tutti i ceppi di *K. pneumoniae* sono resistenti alle penicilline per la presenza di un gene che codifica per l'enzima beta-lattamasi; quelli isolati in ambito nosocomiale risultano inoltre resistenti a numerosi altri antibiotici a causa dell'acquisizione di un plasmide che conferisce multifarmacoresistenza.⁷

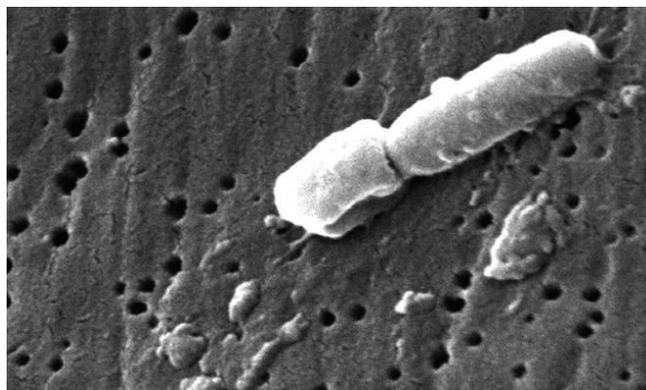


Fig. 2.1 *Klebsiella pneumoniae* al microscopio elettronico a scansione (SEM).

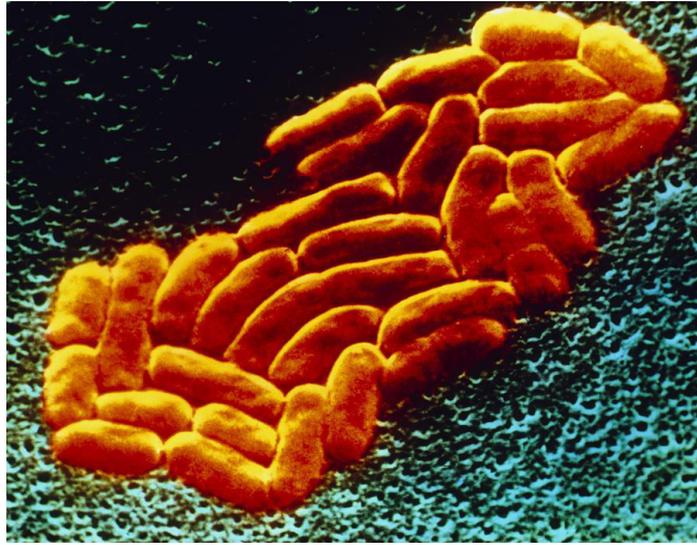


Fig. 2.2 Immagine di *Klebsiella pneumoniae* al SEM con falsi colori.

K. pneumoniae era prevalentemente responsabile di infezioni del tratto respiratorio (in etilisti e diabetici) e del tratto urogenitale (in presenza di fattori predisponenti come urolitiasi, ristagno urinario o manovre strumentali invasive). A partire dagli anni '70 l'epidemiologia e lo spettro delle infezioni da *K. pneumoniae* sono cambiati; sono divenute tra le più frequenti infezioni acquisite in ambito ospedaliero⁸ dove il batterio diffonde non per via aerea ma tramite contatto diretto attraverso le mani contaminate dei pazienti o del personale sanitario oppure per contaminazione dell'ambiente (superfici ospedaliere come sponde del letto, maniglie delle porte, comodini ecc.). (Fig. 2.3)

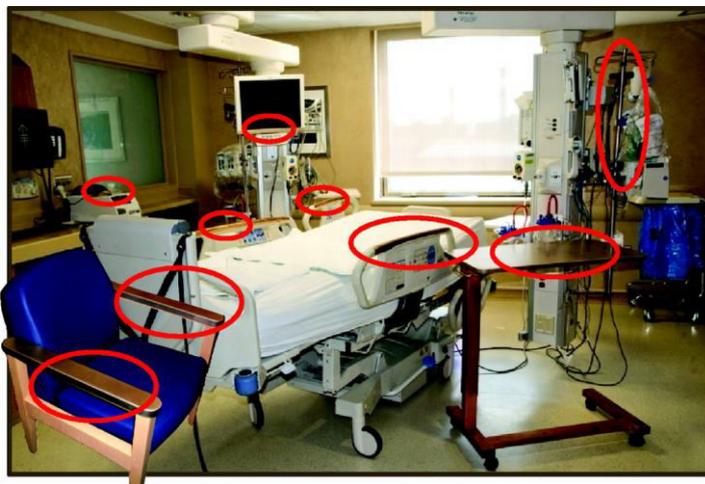


Fig. 2.3 Possibili siti di contaminazione in UTI.

Le infezioni più frequenti oggi includono polmoniti nosocomiali e acquisite in comunità, infezioni secondarie in pazienti con BPCO, ascessi, empiemi polmonari ma anche infezioni del tratto urinario e batteriemie in pazienti suscettibili. I fattori di rischio, per cui possiamo definire un paziente suscettibile di infezione, sono rappresentati dall'età avanzata, da stati di immunocompromissione, da precedenti trattamenti antibiotici, dal trapianto di organi solidi, di midollo osseo o di cellule staminali, dalla ventilazione meccanica e da lunghi periodi di ospedalizzazione.⁹ Vi sono inoltre infezioni più rare associate alla *Klebsiella* come colangiti, meningiti, endocarditi ed endoftalmiti le quali si manifestano soprattutto nei pazienti con ascessi epatici e diabete.¹⁰

L'uso diffuso di antibiotici è responsabile dello sviluppo di un fenomeno definito multifarmaco resistenza che interessa i microrganismi batterici tra i quali gli enterobatteri e nello specifico *Klebsiella pneumoniae*. L'utilizzo di cefalosporine ad ampio spettro e/o di carbapenemi è infatti un'importante condizione di rischio per la colonizzazione o l'infezione da parte di patogeni MDR tra i quali i ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem).^{11,12} Tali ceppi producono un enzima, la β -lattamasi di tipo KPC, capace di idrolizzare i carbapenemici e conferire resistenza verso un ampio spettro di antibiotici tra cui le penicilline, le cefalosporine e i monobattami¹³. Alcuni ceppi KPC-positivi hanno in realtà bassi livelli di resistenza ai carbapenemi, ma se, oltre all'enzima carbapenemasi, sviluppano altri meccanismi di resistenza, come ad esempio la perdita delle porine, la MIC (Minimal Inhibitory Concentration) verso i carbapenemi aumenta¹⁴. Il trattamento delle infezioni causate da questi patogeni multiresistenti è pertanto un'importante sfida per i clinici poiché, data la ridotta sensibilità verso la gran parte degli antibiotici, rimangono ben poche alternative terapeutiche.

I principali fattori di rischio per le infezioni da KPC-Kp sono rappresentati da precedenti trattamenti antibiotici, dall'uso di procedure invasive che facilitano l'ingresso del batterio nelle cavità corporee (cateteri vescicali, tubi endotracheali, cateteri endovenosi), da ferite chirurgiche, dal ricovero in UTI (Unità di Terapia Intensiva), dall'utilizzo della ventilazione meccanica, dalla vicinanza di letto a pazienti colonizzati e dalla permanenza al momento della dimissione in case di cura e strutture per lungodegenza.^{6,15,16} Tumbarello *et al.*, mediante uno studio retrospettivo caso-controllo condotto in 5 ospedali italiani su una popolazione di pazienti adulti, hanno identificato tra i fattori di rischio, oltre a quelli già citati, anche malattie ematologiche, recenti trattamenti con fluorochinolonici e/o carbapenemici e un Charlson

Comorbidity index ≥ 3 .¹⁷ Il CCI è uno score (da 0 a 37) che consente di misurare le comorbidità e calcolare la sopravvivenza a 10 anni di pazienti in cui coesistono più patologie.

Gli enzimi β lattamasi vengono raggruppati nella classificazione di Ambler (**Fig. 2.4**) in quattro classi principali (A-D) in base alla loro struttura primaria. Le classi A, C e D sono β -lattamasi che presentano una serina nel loro sito attivo, mentre gli enzimi di classe B hanno un atomo di zinco nel proprio sito attivo. Gli enzimi carbapenemasi appartengono alle classi A, B e D che sono le più importanti classi enzimatiche riscontrate nei patogeni responsabili di infezioni nosocomiali.

TABLE 18-2 Ambler Classification of β -Lactamases				
CLASS	ACTIVE SITE	ENZYME TYPE	SUBSTRATES	EXAMPLE
A	Serine	Penicillinases:		
		Broad-spectrum	Benzylpenicillin, aminopenicillins, carboxypenicillins, ureidopenicillins, narrow-spectrum cephalosporins	PC1 in <i>Staphylococcus aureus</i> TEM-1, SHV-1 in <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , other gram-negative bacteria
		Extended-spectrum (β -lactamase)	Substrates of broad-spectrum plus oxymino- β -lactams (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) and aztreonam	In Enterobacteriaceae: TEM-derived, SHV-derived, CTX-M-derived; PER-1, VEB-1, VEB-2, GES-1, GES-2, IBC-2 in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Carbapenemases	Substrates of extended-spectrum plus cephamycins and carbapenems	KPC-1, KPC-2, KPC-3 in <i>K. pneumoniae</i> ; NMC/IMI, SME family	
B	Metallo- β -lactamases (Zn ²⁺)	Carbapenemases	Substrates of extended-spectrum plus cephamycins and carbapenems	NDM-1 in Enterobacteriaceae, IMP, VIM, GIM, SPM, SIM lineages in <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.
C	Serine	Cephalosporinases	Substrates of extended-spectrum plus cephamycins	AmpC-type enzymes in Enterobacteriaceae, <i>Acinetobacter</i> spp.
D	Serine	Oxacillinases:		
		Broad-spectrum	Aminopenicillins, ureidopenicillin, cloxacillin, methicillin, oxacillin, and some narrow-spectrum cephalosporins	OXA-family in <i>P. aeruginosa</i>
		Extended-spectrum	Substrates of broad-spectrum plus oxymino- β -lactams and monobactams	OXA-derived in <i>P. aeruginosa</i>
	Carbapenemases	Substrates of extended-spectrum plus cephamycins and carbapenems	OXA-derived in <i>Acinetobacter</i> spp.	

Fig. 2.4 Classificazione di Ambler adattata da “Mandell, Douglas, and Bennett's, Principles and Practice of Infectious Diseases”²⁷

Classe A: gli enzimi clinicamente più importanti che rientrano nella classe A sono le carbapenemasi *Klebsiella pneumoniae* o KPC, che sono capaci di idrolizzare tutti i beta-lattamici e hanno un'attività inibita dall'acido boronico e solo in parte dall'acido clavulanico e da tazobactam.¹⁸ Sono state identificate 13 varianti genotipiche di KPC e le principali sono rappresentate KPC-2 e KPC-3. Gli enzimi KPC si ritrovano soprattutto in *K. pneumoniae* ma anche in altre Enterobacteriaceae tra cui *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* e *Citrobacter freundii*.¹⁹

Classe B: le β -lattamasi di classe B vengono chiamate metallo- β -lattamasi (MBLs) per la presenza di un atomo di zinco nel loro sito attivo, responsabile dell'idrolizzazione. Sono la classe di enzimi a maggior attività carbapenemasi e hanno capacità di idrolizzare tutte le penicilline, le cefalosporine e i carbapenemi. A questo gruppo appartengono la NDM-1 (New Delhi metallo- β -lattamasi), VIM (Verona integron-encoded metallo beta-lattamasi) e IMP (Imipenemasi).¹⁸

Classe D: le β -lattamasi di classe D invece sono dette OXA perché capaci di idrolizzare l'oxacillina più che le penicilline.¹³ Tra le carbapenemasi di classe D troviamo in particolare OXA-48.

Molte carbapenemasi risiedono in elementi genetici mobili, come trasposoni o plasmidi, spesso co-portatori di altri meccanismi di resistenza. Il gene che conferisce resistenza, *bla*_{KPC-1}, è collocato infatti su un largo plasmide¹³, molecola di DNA circolare extracromosomiale che trasportano geni accessori e ne consentono la trasmissione orizzontale ad altre specie batteriche; i ceppi principalmente responsabili degli eventi epidemici di tutto il mondo appartengono al *multi locus sequence type* (ST) 258.²⁰

Le infezioni sostenute da *Klebsiella Pneumoniae*-KPC possono essere asintomatiche o manifestarsi in maniera simile a quelle dei ceppi *wilde-type* ma con differenze sia cliniche che di mortalità. I primi studi condotti nel 2005 negli Stati Uniti su pazienti con batteriemia da KPC-Kp hanno riportato tassi di mortalità dal 47% al 66%, risultati simili sono stati ottenuti anche da altri studi condotti in Israele (Borer et al. 2009), in Grecia (Zarkotou et al. 2011), in Usa (Qureshi et al.2012) e in Italia (Tumbarello et al. 2012).^{21,22,23} Questi ultimi studi hanno inoltre analizzato gli alti tassi di mortalità cercando di individuare i “predittori di mortalità” ovvero le variabili che possono influenzare il tasso di mortalità come ad esempio le caratteristiche generali del paziente e dell'infezione ma anche quelle legate al trattamento antibiotico.

Le variabili correlate alle condizioni del paziente che sono state considerate sono rappresentate da: età, sesso, tasso di comorbidità (Charlson Comorbidity Index), terapie immunosoppressive, durata dell'ospedalizzazione e precedenti ricoveri in particolare in ICU, precedenti interventi chirurgici, precedenti procedure invasive (inserimento di CVC, sondino naso gastrico, catetere di Foley, procedure endoscopiche), nutrizione parenterale e ventilazione meccanica.

2.2 ASPETTI EPIDEMIOLOGICI

Il primo ceppo produttore di enzimi KPC è stato scoperto in North Carolina nel 1996 durante la sorveglianza ICARE (Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology) e nominato KPC-1, di questo enzima fu dimostrata l'origine plasmidica, l'analogia di sequenza con altre carbapenemasi di classe A e la capacità di idrolizzare carbapenemici oltre a cefalosporine a spettro espanso e aztreonam.²⁴

Successivamente i ceppi di *Klebsiella pneumoniae* KPC si sono diffusi attraverso vari paesi e continenti anche se l'esatta epidemiologia della loro espansione varia in base alla localizzazione geografica. In alcuni paesi vi sono state delle endemie ad esempio in Colombia, a Israele, in Grecia e anche in Italia (paesi rappresentati in bordeaux nella cartina) mentre altri hanno avuto solo alcuni casi importati di infezioni da *Klebsiella* KPC come l'Australia, la Nuova Zelanda e il Canada (paesi rappresentati in verde acqua). (Fig. 2.5)

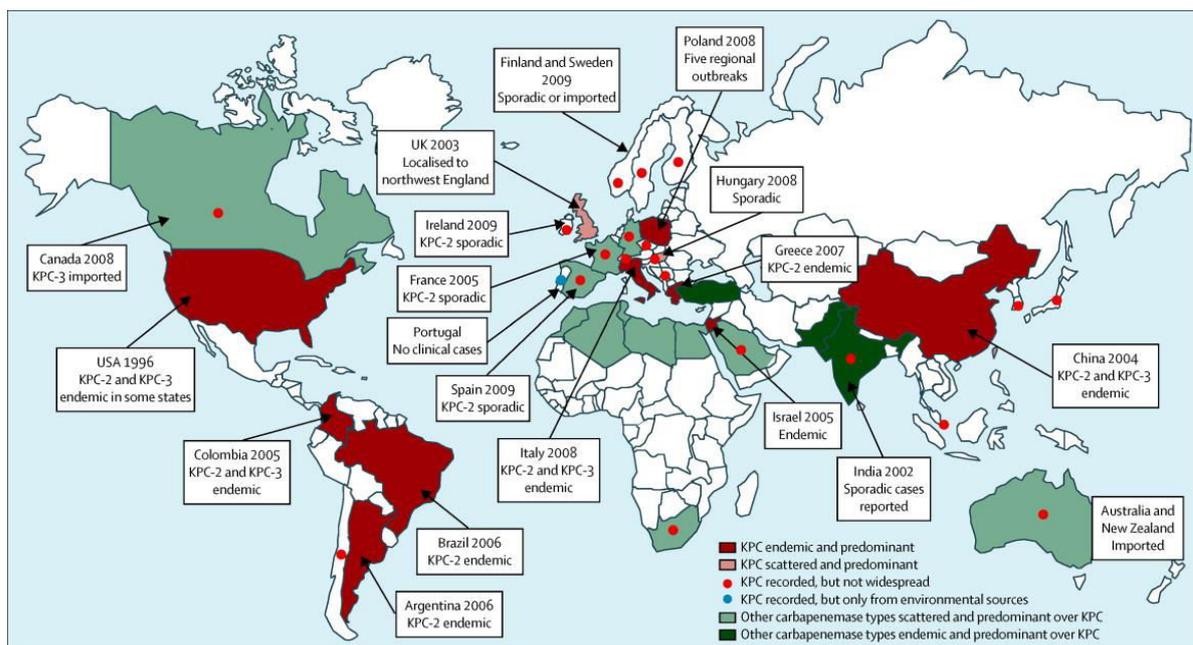


Fig. 2.5 Fattori epidemiologici e diffusione della KCP-Kp attraverso i continenti.²⁵

Le ragioni della bassa prevalenza in questi ultimi paesi sono riconducibili ad una maggiore attenzione al controllo delle infezioni da *K. pneumoniae* con la precoce istituzione di procedure di sorveglianza per CRE su pazienti provenienti da altri paesi e alla maggiore prevalenza di

trasferimenti, per ragioni geografiche, dal continente asiatico anziché dagli USA o dal Sud Europa o da Israele dove la KPC è endemica. Sembra infatti che i viaggi intercontinentali siano strettamente associati alla diffusione di ceppi produttori di KPC²⁵, la prima evidenza epidemiologica della diffusione intercontinentale di tali ceppi è stata infatti descritta in Francia ed Israele, dove sono stati documentati casi di importazione da parte di pazienti provenienti dagli Stati Uniti d'America.

2.2.1 DIFFUSIONE DI KLEBSIELLA PNEUMONIAE KPC IN ITALIA

In Italia il primo ceppo di *K. pneumoniae* KPC-positivo è stato isolato nel 2008 da un paziente con infezione intraddominale ricoverato nell'ospedale universitario di Firenze, dall'analisi genetica è stato individuato il gene *blaKPC-3* appartenente a ST258, ceppo dominante in USA e Israele.²⁶ Un secondo report ha descritto due casi di *Klebsiella pneumoniae* KPC-2-positivi isolati a Roma nel 2009²⁷, mentre in uno studio di sorveglianza, condotto a Padova nel periodo 2009-2011, sono stati identificati almeno 200 casi di infezione da KPC-Kp. È stato visto inoltre che questi ceppi, prevalentemente confinati alle ICU, si iniziavano a diffondere anche nei reparti medici, chirurgici e nelle strutture per lungodegenza dimostrando la rapida capacità di mobilitazione dei geni KPC, favorita sia dalla intrinseca struttura genica sia dalla mobilitazione e dal trasferimento dei pazienti e del personale sanitario all'interno e fuori dai reparti ospedalieri²⁸. Nello stesso periodo (2009-2011) sono stati isolati 7 ceppi di *K. pneumoniae* KPC-3-positivi ST258 anche in un reparto di terapia intensiva a Verona²⁹ e in seguito, nel 2011, è stata documentata la trasmissione orizzontale di un ceppo KPC-3 resistente alla colistina tra pazienti ricoverati in un ospedale di Palermo.³⁰

I ceppi KPC-positivi si sono successivamente diffusi in tutta Italia, con un chiaro incremento riportato dal sistema di sorveglianza EARS-Net del 2015³¹. È stato riportato un aumento della resistenza combinata a fluorochinoloni, cefalosporine di terza generazione e aminoglicosidi, si è passati infatti dal 16.7% del 2011 al 19.6% del 2014. Inoltre, anche se la percentuale di resistenza ai carbapenemi nel 2014 è rimasta per lo più invariata nella maggior parte dei paesi, in Europa si è notato un significativo incremento negli ultimi anni, passando da una media del 6.0% nel 2011 al 7.3% nel 2014. La resistenza ai carbapenemi nel corso di infezioni da *K. pneumoniae* è stata riscontrata soprattutto nei paesi del sud e sud-est dell'Europa più che in altre parti dell'EU. I paesi che hanno riportato una più alta percentuale di resistenza ai carbapenemi

sono gli stessi in cui è stata riportata un'elevata resistenza verso fluorochinoloni, cefalosporine di terza generazione, aminoglicosidi e anche verso la polimixina B; questi paesi sono la Grecia, l'Italia e la Romania dove la percentuale di resistenza ai carbapenemi è rispettivamente del 62.3%, 32.9% e 31.5%.

Nel febbraio 2013 il Ministero della Salute ha emesso una circolare: “Sorveglianza e controllo delle infezioni da batteri produttori di carbapenemasi (CPE)”, con la quale si ribadiva l'importanza di mettere in atto misure di controllo a livello locale e regionale per limitare il rischio di trasmissione di CPE, già sottolineata dalle linee guida pubblicate dal centro europeo per il controllo delle malattie ECDC (European Center for Disease Prevention and Control) di Stoccolma.

2.2.2 K. PNEUMONIAE MULTIRESISTENTE NELLA REGIONE TOSCANA

Nell'ottobre 2015 è stato pubblicato il secondo report della rete di sorveglianza dell'antibiotico resistenza in Toscana (SART)³², che raccoglie dati provenienti dai laboratori di microbiologia delle aziende sanitarie della regione. Sono stati riportati dati riguardanti le resistenze antibiotiche da parte delle specie batteriche clinicamente più significative: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp e *Klebsiella pneumoniae*; questi microrganismi patogeni sono valutati anche dal sistema di sorveglianza europeo EARS-NET pertanto i dati ottenuti da SART possono essere utilizzati per confrontare la situazione Toscana con quella nazionale ed europea. Il sistema di sorveglianza toscano ha raccolto l'adesione di tutti i 14 laboratori di microbiologia clinica, raggiungendo così la copertura dell'intero territorio regionale e ampliando i dati raccolti nel precedente report del 2013.

Nel 2014 in Toscana gli isolati di *K. pneumoniae* sono stati il 13% del totale (N=588) ed erano caratterizzati dallo sviluppo di elevate resistenze verso gli antibiotici saggiati, in particolare verso le penicilline protette (Amoxicillina-Acido Clavulanico, 64.9%), le cefalosporine di terza generazione (Cefotaxime, 63.9%; Ceftazidime, 61.6%) e i fluorochinoloni (Ciprofloxacina 61.5%). (Tabella 2.1, Fig. 2.6)

PRINCIPIO ATTIVO	SIR						TOTALE n
	S		I		R		
	n	%	n	%	n	%	
Amikacina	338	58,2%	55	9,5%	188	32,4%	581
Amoxicillina/Clavulanato	192	35,1%	0	0,0%	355	64,9%	547
Cefotaxime	210	36,1%	0	0,0%	372	63,9%	582
Ceftazidime	205	35,2%	19	3,3%	359	61,6%	583
Ciprofloxacina	210	36,1%	14	2,4%	358	61,5%	582
Colistina	487	84,0%	0	0,0%	93	16,0%	580
Ertapenem	250	52,7%	5	1,1%	219	46,2%	474
Gentamicina	407	69,9%	64	11,0%	111	19,1%	582
Imipenem	297	54,5%	19	3,5%	229	42,0%	545
Meropenem	317	54,4%	3	0,5%	263	45,1%	583
Piperacillina/Tazobactam	202	35,2%	44	7,7%	328	57,1%	574
Tigeciclina	368	70,5%	91	17,4%	63	12,1%	522

Tabella 2.1 Profili di sensibilità agli antibiotici saggiati su isolati di *K. pneumoniae* in Toscana nel 2014 (S: sensibile; I: intermedio; R: resistente).³²

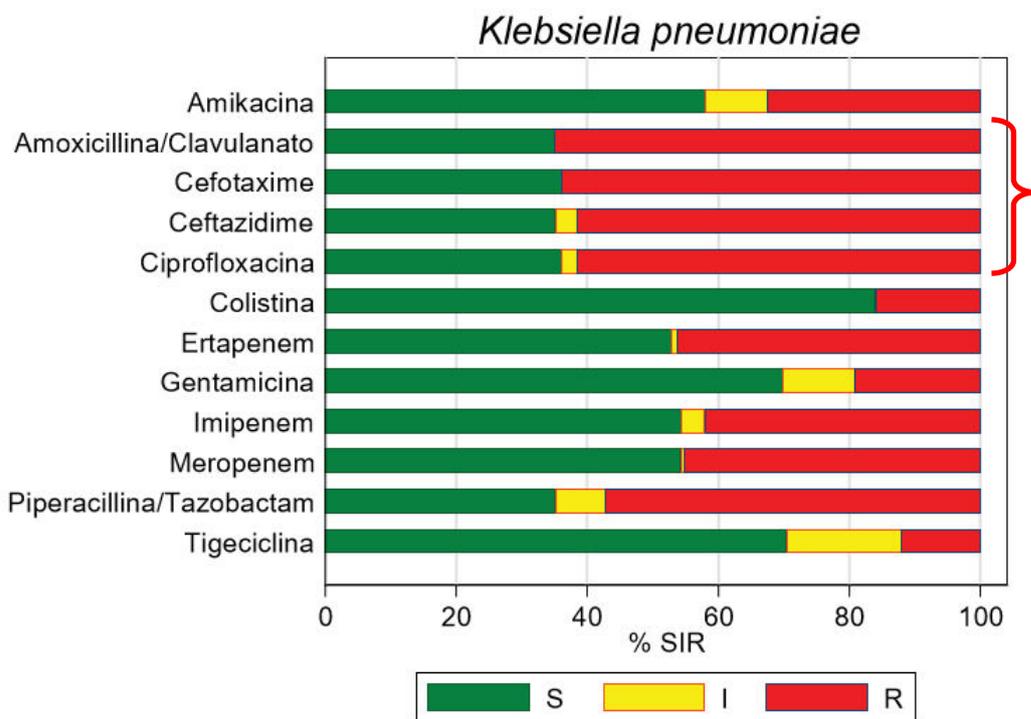


Fig. 2.6 Profili di sensibilità agli antibiotici saggiati su isolati di *K. pneumoniae*. Toscana 2014 (S: sensibile; I: intermedio; R: resistente).³²

La resistenza verso fluorochinoloni e cefalosporine di terza generazione ha una distribuzione omogenea in Toscana che rispecchia complessivamente quella italiana, la quale ha una media di resistenze tra le più alte in Europa.

La percentuale media di *K. pneumoniae* resistente a fluorochinoloni in Toscana è risultata pari a 61.5%, a livello nazionale è del 55.7%, mentre la media europea è più bassa (27.4%); per quanto riguarda i ceppi di *K. pneumoniae* resistenti alle cefalosporine di terza generazione si è visto che in Toscana nel 2014 erano pari al 63.9% degli isolati.

Di particolare importanza risulta inoltre la resistenza di *K. pneumoniae* verso i carbapenemi: in Toscana è stata osservata una percentuale media di ceppi resistenti pari al 46.2%, la situazione toscana risulta quindi peggiore rispetto alla media italiana riportata per il 2014 che è del 32.9% e che a sua volta, dopo la Grecia, rappresenta il più alto valore in Europa. (Fig. 2.7)

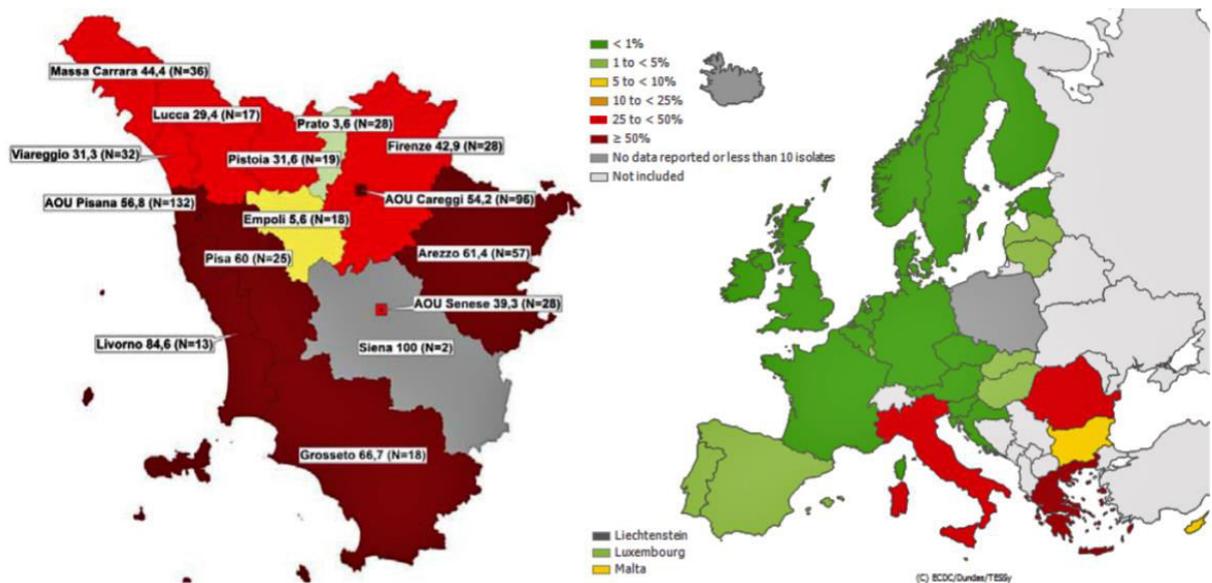


Fig. 2.7 *K. pneumoniae*: percentuale (%) di isolati resistenti ai carbapenemi nei territori delle aziende sanitarie toscane (Toscana, 2014) e nei paesi europei (2014).³²

Per quanto riguarda la multiresistenza, nel 2014 sono stati identificati in Toscana ceppi di *K. pneumoniae* multiresistenti, in particolare verso cefalosporine di III generazione, fluorochinoloni e aminoglicosidi, nel 37.5% degli isolati; a livello nazionale, nel 2014, la percentuale media è risultata pari al 44% ed anche in Europa sono stati identificati molti altri paesi, localizzati

principalmente nel centro-sud, in una situazione di allarme simile. Infine un problema emergente è la resistenza alla colistina da parte di *K. pneumoniae* KPC-positivo, dal momento che compromette l'efficacia di uno dei pochissimi farmaci attivi contro questi patogeni. In Toscana, nel 2014, la media regionale di resistenza alla colistina in *K. pneumoniae* è risultata pari al 16%.

Dal report SART comprendiamo come si abbiano a disposizione poche opzioni terapeutiche per trattare i pazienti che sviluppano infezioni da *K. pneumoniae* multifarmaco resistente. Le infezioni causate da questi batteri rappresentano infatti un importante e crescente problema a livello mondiale sia per i frequenti fallimenti terapeutici sia perché le infezioni sono associate ad un incremento dei costi, della durata dei ricoveri e ad un'elevata mortalità.³³

2.3 RILEVAMENTO DI ENTEROBATTERI PRODUTTORI DI CARBAPENEMASI

Le procedure utilizzate per identificare ceppi di enterobatteri produttori di carbapenemasi sono rappresentate nella **Tabella 2.2**

Test di screening	Test non molecolari	Test molecolari
Test di diffusione su piastra (Kirby-Bauer)	Test di Hodge modificato	PCR
E-test o test di microdiluzione in brodo per determinazione della MIC	Test di inibizione con EDTA o acido dipicolinico per le MBL	Sequenziamento
Sistemi di suscettibilità antimicrobica automatizzati (Vitek2®, Microscan, Phoenix)	Test di inibizione con acido boronico per le KPC	
	Spettrometria a UV	
	MALDI-TOF MS	

Tabella 2.2 Strategie di identificazione dei ceppi produttori di carbapenemasi^{34,35}

Test di screening. Le metodiche di prima linea o di screening usate per testare la produzione di carbapenemasi sono rappresentate da metodiche di diffusione su agar con la tecnica di Kirby Bauer (**Fig. 2.8**), dall'analisi dei test di suscettibilità ai carbapenemici tramite sistemi automatizzati (Vitek2®, Mini API, Microscan, Phoenix), oppure dalla misura dell'attività antimicrobica in vitro tramite la determinazione della MIC (Concentrazione Minima Inibente).

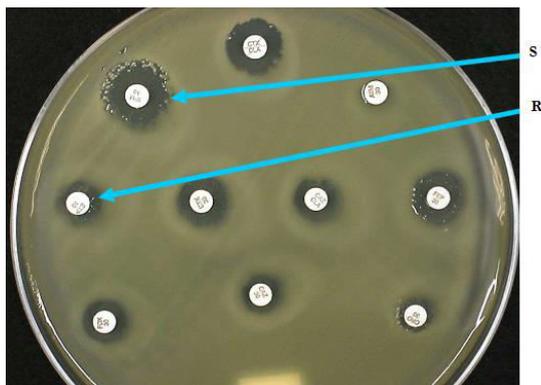


Fig. 2.8 Test di diffusione su agar-KPC-Kp. La lettura del risultato consiste nella misurazione del diametro dell'alone di inibizione formatosi attorno al dischetto imbevuto di un antibiotico (es. carbapenemico). Il gradiente di concentrazione diminuisce in direzione centrifuga pertanto la sensibilità del ceppo è in funzione del diametro misurato. Esempio di ceppo sensibile ad imipenem (S) e resistente ad ertapenem (R).

La MIC corrisponde alla concentrazione minima di un certo antibiotico in grado di inibire la crescita batterica dopo 18-24 ore d'incubazione. La quantità di batteri utilizzata nell'inoculo del test è di 5×10^5 CFU/mL. Per determinare la MIC si può utilizzare la diluizione in brodo (preparata in casa o usando pannelli preformati presenti in commercio) o il metodo E-test® che si basa sull'uso di strisce di carta con concentrazioni scalari di antibiotico disposte su agar. (Fig. 2.9-2.10)

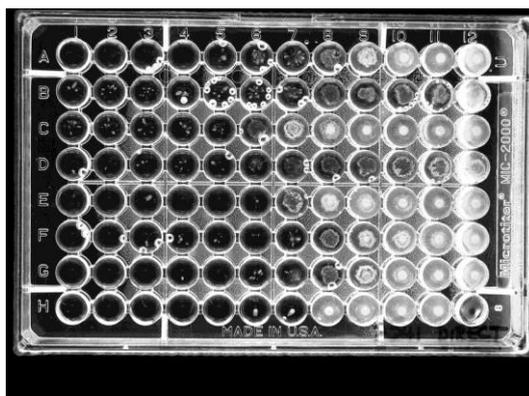


Fig. 2.9 Tecnica della microdiluizione in brodo. L'antibiotico viene solubilizzato in brodo di crescita a concentrazioni scalari, in seguito all'inoculo il sistema viene incubato a 37° per 16-20 h. Viene controllata la presenza di crescita batterica visibile (provette torbide), l'assenza di torbidità del terreno di coltura denota un'inibizione completa della crescita microbica. La MIC è la minima concentrazione di antibiotico che inibisce la replicazione.



Fig. 2.10 Metodo E-test® su Mueller-Hinton agar. MIC per Imipenem.

Esistono delle concentrazioni per le MIC che consentono di categorizzare le molecole per quella determinata specie batterica come sensibile (S), intermedia (I) o resistente (R). Per ogni coppia antibiotico/specie batterica vengono definiti dei breakpoints da parte di enti preposti come il CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) o l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).³⁶ I valori di breakpoints per gli enterobatteri sono rappresentati nella **Tabella 2.3**.

ANTIBIOTICO	CLSI		EUCAST	
	S ≤	R ≥	S ≤	R ≥
IMIPENEM	1	4	2	8
MEROPENEM	1	4	2	8
ERTAPENEM	0.5	2	0.5	1

Tabella 2.3 Breakpoints degli enterobatteri secondo le linee guida statunitensi (CLSI) ed europee (EUCAST)^{37,38}

I valori EUCAST sono più alti di quelli di CLSI; nel 2008 infatti è stato deciso di modificare i breakpoints EUCAST per scopi clinici, ovvero di offrire una guida per ottimizzare le strategie terapeutiche e non per rilevare in maniera ottimale la produzione di carbapenemasi.³⁹ Tra i carbapenemici inoltre l'ertapenem sembra il miglior candidato per l'identificazione dei produttori di carbapenemasi dato che i valori di MIC sono di solito minori di quelli di altri carbapenemici.³⁷

Secondo le linee guida sarebbe sufficiente, per identificare ceppi produttori di carbapenemasi, basarsi solo sui valori di MIC e riportarli così come trovati (“*Reported as found*”) senza eseguire ulteriori test di ricerca fenotipica del meccanismo di resistenza, se non per studi epidemiologici o per scopi di controllo delle infezioni.⁴⁰ Queste indicazioni sono però state messe in discussione da vari autori, tra cui Nordmann (J Antimicrob Chemother, 2013)³⁴, che afferma che può essere poco sensibile identificare ceppi produttori di carbapenemasi basandosi solo sui valori di MIC in quanto bassi livelli di resistenza ai carbapenemici sono stati osservati in modo variabile in *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter* per tutte le classi di carbapenemasi (KPC, MBL, OXA 48). Risulta pertanto importante identificare il tipo di enzima mediante ulteriori test, anche se non è stato stabilito il valore cut-off di MIC a cui riferirsi per avviare i test fenotipici per l'identificazione dell'attività carbapenemasica. Nello studio di Nordmann viene proposto di effettuare tali test su tutti gli isolati di *Enterobacteriaceae* con valori di MIC per ertapenem $\geq 0,5$ mg/L oppure con valori MIC per imipenem e meropenem ≥ 1 mg/L o su qualsiasi isolato che mostri anche una lieve riduzione di suscettibilità ai carbapenemici.

Test fenotipici. Sono stati sviluppati diversi test fenotipici, non molecolari, per l'identificazione di *K. pneumoniae* KPC, che hanno buona sensibilità e specificità ma che non arrivano al 100%.⁴⁰ Uno dei test che è stato maggiormente usato negli anni è il test di Hodge modificato, in tale test viene seminato un ceppo di *E.coli* su una piastra, il Müller-Hinton agar, al cui centro viene posto un dischetto meropenem o imipenem. Il ceppo sensibile da testare viene strisciato in prossimità del dischetto di antibiotico e in linea retta verso la parte periferica della piastra. Viene evidenziata la presenza di attività carbapenemasica, quindi la riduzione dell'attività dell'antibiotico saggiato nei confronti del ceppo in esame, qualora il ceppo di *E.coli* cresca vicino al disco di antibiotico o lungo la striscia. (**Fig. 2.11**) Questa metodica ha buona sensibilità e specificità nell'individuare ceppi produttori di carbapenemasi ma non è il test fenotipico ideale per confermare la presenza di ceppi KPC, l'interpretazione infatti può essere difficile per alcuni isolati e inoltre sono riportati falsi positivi.¹⁵

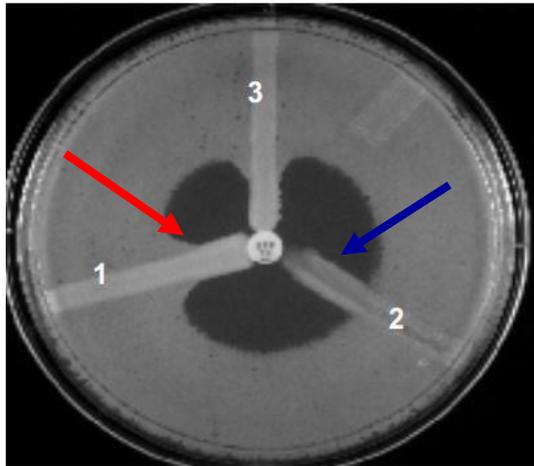


Fig. 2.11 Test di Hodge Modificato (MHT). La freccia rossa indica un ceppo di *K. pneumoniae* KPC-positivo, quella blu un ceppo KPC-negativo.

Per superare i problemi di specificità di tale test è stato proposto un altro test fenotipico di inibizione, basato sull'utilizzo di dischetti contenenti carbapenemici combinati con composti derivati dall'acido boronico, unici inibitori delle serino β -lattamasi. L'alone di inibizione attorno al dischetto di carbapenemico viene confrontato con l'alone di inibizione attorno al dischetto contenente carbapenemico+acido boronico, se il diametro del secondo alone è almeno 5mm maggiore del diametro del primo alone il test è considerato positivo per produzione di KPCs.⁴¹(**Fig. 2.12**)

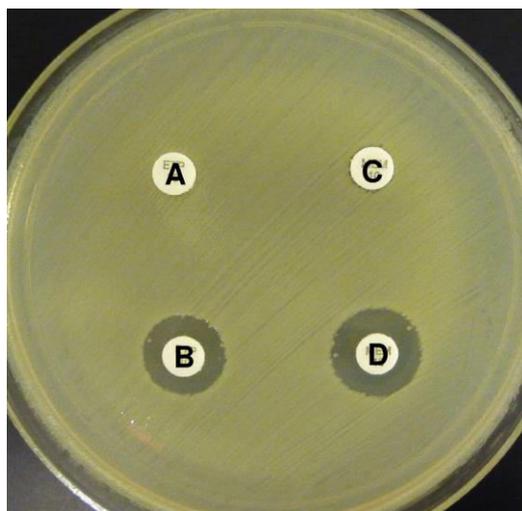


Fig. 2.12 Test di inibizione con acido boronico. (A) Ertapenem (10 μ g); (B) ertapenem +derivato dell'acido boronico (300 μ g) con aumento dell'alone di inibizione ≥ 5 mm ; (C) meropenem (10 μ g); (D) meropenem+derivato dell'acido boronico (300 μ g) con alone di inibizione ≥ 5 mm rispetto al solo meropenem.

Alcuni studi hanno valutato l'utilità della spettrometria a UV e del MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) non solo come metodiche di identificazione e classificazione epidemiologica dei *clusters* di ceppi batterici, ma anche come test di conferma della presenza di carbapenemasi.

La spettrometria UV è una metodica che si basa su diversi passaggi: 18 ore (in alcuni casi 8) di coltura su brodo del campione prelevato, estrazione della proteina batterica e misurazione dello spettro di idrolisi dell'imipenem mediante l'uso di uno spettrometro UV (lunghezza d'onda 297nm), se il batterio produce carbapenemasi si avrà l'idrolisi di imipenem. Tale metodica ha dimostrato 100% sensibilità e 98.5% di specificità.⁴⁰ Risulta una tecnica di facile eseguibilità, che fornisce risultati rapidi (nell'arco di 1-2.5 ore) e con costi minori rispetto alle metodiche PCR, aspetti che la rendono utile soprattutto in contesti di epidemia.⁴² Un altro vantaggio è la diffusione di strumentazioni e software di elaborazione di dati nei laboratori di microbiologia per l'identificazione dei ceppi batterici con questa metodica. Il limite principale è l'incapacità di discriminare i diversi tipi di carbapenemasi e il fatto di essere una metodica *time consuming* in quanto richiede uno step preliminare di almeno 8 ore di coltura in brodo.⁴⁰

Il MALDI-TOF MS è una metodica sempre più utilizzata in microbiologia per identificare i microrganismi e gli enzimi che conferiscono resistenza antibiotica; è una metodica rapida che consente di analizzare in un solo giorno centinaia di campioni e che prevede diversi passaggi. Il campione da analizzare viene dapprima miscelato su una matrice e applicato su una piastra metallica; successivamente la miscela viene sottoposta a ionizzazione e desorbimento, ovvero la matrice irradiata assorbe la luce ultravioletta e vaporizza insieme al campione.⁴³ Gli ioni ottenuti vengono accelerati da un campo elettrico all'interno di un tubo di volo che termina con un rivelatore. La particella impiega un tempo diverso per raggiungere il detector in base a due proprietà, la massa e la carica, pertanto misurando la velocità di volo si ottiene il rapporto massa/carica dello ione. Da questo rapporto viene prodotto un grafico di analisi, specifico per ogni microrganismo analizzato, che viene comparato con altri grafici raccolti in un database, consentendo in questo modo di identificare la specie batterica in esame. Attualmente si usano due database: MALDI Biotyper (Bruker Corporation) e il Vitek® MS System (bioMérieux).^{38,42}

La più importante e recente scoperta per identificare ceppi di enterobatteri produttori di carbapenemasi è però rappresentata dal Carba NP test, basato sull'idrolisi di imipenem in vitro identificata dal viraggio di colore di un indicatore di pH (dal rosso al giallo/arancio). (Fig. 2.13)

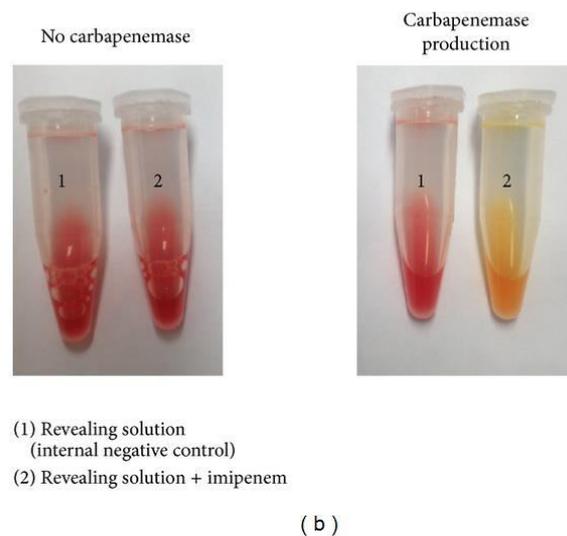
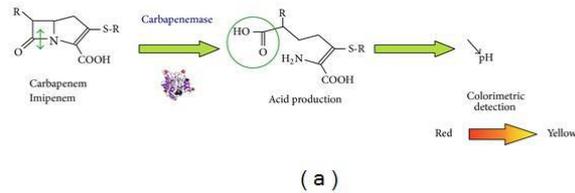


Fig. 2.13 Carba NP test. (a) Reazione di idrolisi dell'imipenem da parte dell'enzima carbapenemasi. (b) La produzione di carbapenemasi viene individuata dal viraggio di colore che si osserva nella provetta in cui è stato aggiunto imipenem che risulta gialla (2) rispetto alla provetta di controllo che rimane rossa (1).

Questo test ha una specificità e sensibilità del 100%, come le tecniche molecolari e consente di individuare, non solo tutti gli enzimi carbapenemasi prodotti dagli enterobatteri ma anche tutte le nuove carbapenemasi, a differenza delle tecniche genetiche che permettono di identificare solo gli enzimi noti. È un test rapido (2h), facile (non richiede una particolare strumentazione) e poco costoso che potrebbe diffondersi tra i vari laboratori di microbiologia per ricercare ceppi produttori di carbapenemasi in modo rapido ed economico.⁴⁴

Test molecolari. Il gold standard per l'identificazione di KPC-Kp e delle diverse classi di carbapenemasi è comunque rappresentato dalle metodiche PCR (Polymerase Chain Reaction) che si basano sull'amplificazione del gene *bla*_{KPC} e che consentono di applicare tecniche di sequenziamento sull'amplificato in modo da individuare l'esatto tipo di carbapenemasi. (Fig. 2.14) Sono state sviluppate molteplici tecniche PCR, dotate di elevata sensibilità e specificità, che consentono di avere risultati in tempi rapidi, entro 4-6 ore con metodiche di PCR convenzionale e in meno di 3 ore con metodiche *PCR real-time*.⁴⁰

In particolare sono stati condotti vari studi che mostrano che le metodiche *PCR real time* multiple consentono di identificare i vari alleli dei geni KPC in modo rapido e con elevata sensibilità-specificità, evitando in questo modo il sequenziamento post-amplificazione, consentendo così un risparmio di tempo e di carico di lavoro.⁴⁵ Il limite principale di queste metodiche genetiche è rappresentato dal costo elevato e dall'incapacità di individuare nuovi geni non conosciuti⁴⁰.

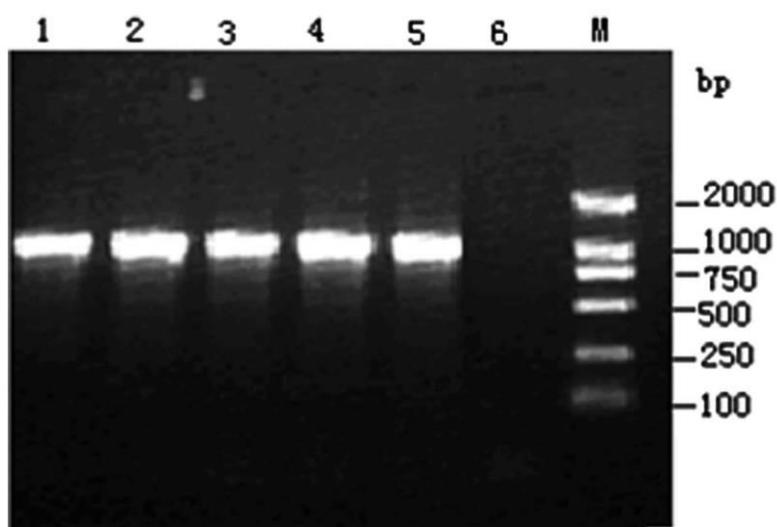


Fig. 2.14 PCR del gene *bla*_{KPC}. Bande 1-4: ceppi di KPC-Kp; banda 5: controllo positivo; banda 6: controllo negativo; banda7: marker.

2.4 INFEZIONE DA KPC IN PAZIENTI ONCOLOGICI ED EMATOLOGICI IMMUNOCOMPROMESSI

I pazienti ematologici sottoposti ad intensi regimi di cura per leucemie o sottoposti a SCT (Steam Cell Transplantation) sono particolarmente predisposti allo sviluppo di infezioni da CRKp a causa di una combinazione di fattori come la prolungata neutropenia, la protratta ospedalizzazione in unità di terapia intensiva (UTI), l'uso frequente di antibiotici ad ampio spettro e lo sviluppo di complicanze in seguito a trattamenti chemioterapici come le mucositi, tutti fattori che contribuiscono alla riduzione delle normali difese immunitarie e allo sviluppo di episodi di batteriemia che portano alla selezione di batteri resistenti.⁴⁶ L'infezione e la colonizzazione da parte dei batteri *Klebsiella pneumoniae* MDR rappresenta un importante problema nei pazienti sottoposti a SCT sia per la gestione delle complicanze post-trapianto sia perché il trapianto è controindicato nei pazienti che sono stati colonizzati prima della procedura.³³ Sappiamo poco riguardo l'impatto epidemiologico e prognostico di queste infezioni nei soggetti sottoposti ad auto e allo trapianto di cellule staminali emopoietiche. Per quanto riguarda l'Italia uno studio retrospettivo condotto dal GITMO (Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo) tra il gennaio 2010 e il luglio 2013 in 52 centri SCT dimostra come a partire dal 2010 è stato osservato un incremento del trend delle infezioni da KPC-Kp nei pazienti auto ed allo-trapiantati, mentre fin da prima degli anni 2000 venivano riportati solo pochi casi sporadici di infezione da CRKp. L'impatto epidemiologico delle infezioni nei pazienti sottoposti ad auto-trapianto sembra essere più favorevole rispetto agli allo-trapiantati sia per quanto riguarda la diffusione geografica (25.8% dei centri SCT di sei regioni italiane riportano almeno un caso di infezione dopo auto-SCT contro il 39.2% dei centri che registrano un'infezione da KPC-Kp in seguito ad allo-trapianto), sia per il basso tasso di incidenza (0.4% di infezioni negli auto-trapiantati contro il 2% negli allo-trapiantati)(**Fig 2.15**) che per il basso tasso di mortalità che è comparabile a quello di infezioni sostenute da altri enterobatteri (16% di mortalità dopo auto-trapianto contro il 64.4% in seguito ad allo-trapianto).^{33,47} Il tipo di patologia, principalmente rappresentato da forme maligne linfoproliferative, il trattamento chemioterapico meno intenso somministrato prima del trapianto e il breve periodo di neutropenia post-trapianto rappresentano il motivo della migliore prognosi dell'infezione da KPC-Kp nei pazienti sottoposti ad auto-trapianto rispetto agli allo-trapiantati.³³

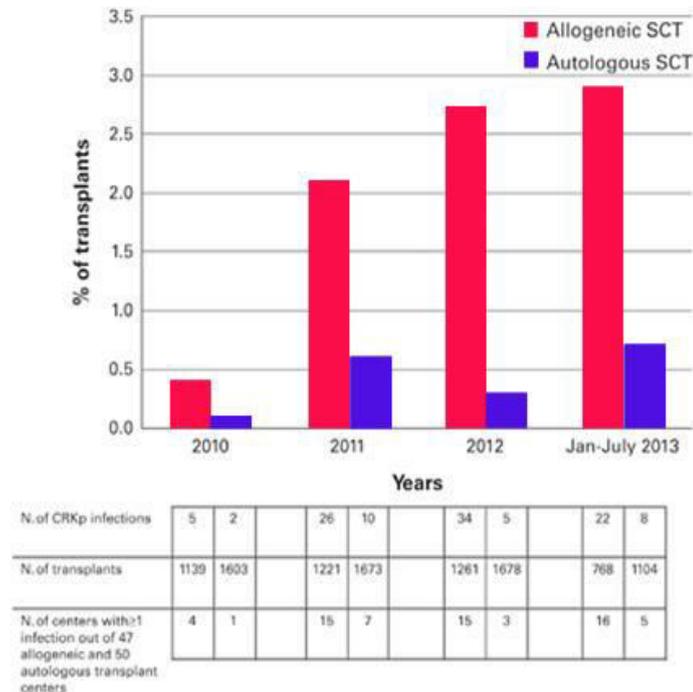


Fig. 2.15 Incidenza delle infezioni da CRKp nei pazienti sottoposti a trapianto autologo e allogenico.

In linea con i dati riportati dal sistema di sorveglianza europeo EARS-Net⁴⁸ è stato osservato in Italia negli ultimi anni un significativo incremento dei casi di infezione a seguito di SCT, si è passati dallo 0.4% nel 2010 al 2.9% nel 2013 ed è stato documentato almeno un caso di infezione dopo trapianto allogenico nel 59.6% dei centri di 14 delle 20 regioni italiane. Il dato più rilevante è rappresentato dalla mortalità correlata all'infezione osservata nei pazienti allo-trapiantati, che risulta pari al 64.4 % ed è comparabile o superiore alla mortalità in seguito ad infezione riscontrata nei pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva (32-41%), sottoposti a trapianto di organi solidi (40%) e a quella di pazienti con patologie ematologiche maligne (65%). La maggior parte dei pazienti presenta una severa neutropenia e/o una reazione GVHD (Graft-versus-host disease) acuta o cronica al momento dell'infezione; nei pazienti con GVHD, nel 44% dei casi, la reazione contro l'ospite coinvolge il tratto intestinale. Si potrebbe ipotizzare che il danno a livello della superficie mucosa e il severo stato di immunocompromissione associato al GVHD a livello intestinale aumenti il rischio di questa infezione nei pazienti colonizzati.³³ Risulta importante individuare la colonizzazione da parte di questi microrganismi multiresistenti non solo per definire le misure di isolamento volte a contrastare la trasmissione orizzontale del patogeno, ma anche per la scelta di una terapia

antibiotica precoce e mirata. Questo è un punto cruciale per il controllo delle infezioni da CRKp in aggiunta ad un prudente uso della terapia antibiotica allo scopo di limitare lo sviluppo delle resistenze; inoltre è stato osservato uno scarso outcome clinico nei pazienti trattati con terapia antibiotica di prima linea contro la CRKp che rende necessario prevenire l'infezione con misure di controllo. L'individuazione dei portatori e lo screening sui pazienti per valutare la presenza di colonizzazione intestinale prima e dopo il trapianto, impedisce la trasmissione nosocomiale e definisce una rapida strategia terapeutica personalizzata, rappresentando un aspetto fondamentale per la gestione delle infezioni da CRKp nella popolazione di pazienti sottoposti a SCT.³³

2.5 INFEZIONI DA KPC-KP NEI PAZIENTI PEDIATRICI

Per quanto riguarda la popolazione pediatrica sono molto limitati gli studi che valutano la frequenza e i fattori di rischio per le infezioni da KPC-Kp, inoltre il trattamento di queste infezioni è difficoltoso a causa delle limitate terapie antibiotiche approvate per questo gruppo di pazienti.⁵

È stato condotto uno studio retrospettivo caso-controllo, durato 5 anni (2010-2014), a Istanbul in Turchia per andare a valutare il rischio di sviluppare infezioni da KPC-Kp nei pazienti portatori ricoverati nelle unità di terapia intensiva di pediatria e neonatologia ed è stato visto che il rischio d'infezione è del 28.2% ed è maggiore nei reparti pediatrici rispetto a quelli di neonatologia (rispettivamente del 39% e del 18%). Questa differenza potrebbe essere dovuta ad una maggiore frequenza di pazienti complicati e con patologie severe nelle PICU rispetto alle NICU, inoltre la distribuzione annuale del tasso di colonizzazione/infezione sembra essere caratterizzata da un graduale incremento soprattutto nelle unità di cura intensiva di pediatria. Lo studio mostra inoltre che nei pazienti colonizzati da *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi-resistente lo sviluppo dell'infezione aumenta in presenza di fattori di rischio quali patologie neurologiche e metaboliche, neutropenia e precedenti procedure chirurgiche e terapie antibiotiche con carbapenemi. I pazienti colonizzati, soprattutto coloro che hanno tali condizioni di rischio, dovrebbero essere pertanto sottoposti a procedure volte a ridurre il rischio di sviluppare l'infezione.⁴⁹

Più in generale le infezioni da parte di KPC-Kp nei bambini sono state riportate in pazienti molto piccoli e seriamente malati con un range di mortalità tra il 4.6% e il 21%⁵⁰ e i fattori di rischio sono rappresentati dalla presenza di comorbidità, da devices invasivi, da pregressi interventi chirurgici e da terapie immunosoppressive e antibiotiche. Per quanto riguarda i pazienti con neutropenia febbrile si hanno pochi dati a disposizione ma è stato osservato che la percentuale di infezioni batteriche da patogeni multi-resistenti è intorno al 30-73%⁵¹ quindi nei bambini trattati per malattie ematologiche il tasso di resistenza sembra essere minore rispetto agli adulti ematologici.⁵²

2.6 INCIDENZA DELLA COLONIZZAZIONE E DELLE INFEZIONI DA ENTEROBATTERI RESISTENTI AI CARBAPENEMI NEI BAMBINI SOTTOPOSTI A TRATTAMENTI DI CHEMIOTERAPIA ANTINEOPLASTICA IN ITALIA

È stato condotto uno studio di sorveglianza da Caselli *et al.*⁵³ a cui hanno partecipato 15 dei 55 centri di Oncoematologia Pediatrica italiani facenti parte dell'AIEOP, volto a valutare il tasso di infezione e colonizzazione da parte di enterobatteri resistenti ai carbapenemi in pazienti pediatrici sottoposti a regimi di chemioterapia, è stato valutato inoltre il tasso di BSI (blood stream infections) o di colonizzazione in relazione al tempo di ricovero ospedaliero e la mortalità correlata alle infezioni. Durante un periodo di osservazione di due anni (gennaio 2012-dicembre 2013) sono stati arruolati 3248 bambini: 1610 trattati per tumori solidi (49%) e 1638 per leucemie/linfomi (51%). La media di pazienti seguiti da ogni centro è stata di 216 (range:44-426). Questo primo studio di sorveglianza condotto in alcuni centri pediatrici italiani dimostra come vi sia un'importante diffusione dei ceppi CPE (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae) nei reparti di Oncoematologia Pediatrica del nostro paese e documenta come il tasso di infezione sia cresciuto dallo 0.16/1000 pazienti/die del 2012 allo 0.67/1000 pazienti/die del 2013. Il tasso di mortalità, a 90 giorni dalla prima emocoltura positiva, per infezioni da CPE nei bambini è del 15.9% e se confrontato al 65% di mortalità riscontrato negli adulti, risulta notevolmente inferiore. Non sono stati chiariti i motivi di questa differenza che potrebbe però dipendere dallo stato di immunosoppressione del paziente, dalle eventuali comorbidità o dalla durata della neutropenia.

2.7 TRATTAMENTO TERAPEUTICO DELLE INFEZIONI

Attualmente non è ancora stato stabilito un trattamento ideale per le infezioni causate da ceppi di *K. pneumoniae* KPC sia perché i dati disponibili in letteratura riguardo le infezioni in vitro o i modelli animali sono limitati, sia perché i profili di resistenza lasciano poche alternative terapeutiche. Infatti oltre ad essere resistenti ai β -lattamici, spesso questi microrganismi possono sviluppare altri meccanismi di resistenza come l'espressione di enzimi multipli (ESBLs o altre carbapenemasi), l'iperproduzione di pompe di efflusso di membrana e/o alterazioni delle porine che conferiscono resistenza anche verso altre classi di antibiotici quali fluorochinoloni, tetracicline, aminoglicosidi e cotrimossazolo. Risulta pertanto necessario, al fine di individuare un trattamento ottimale, condurre studi osservazionali e raccogliere dati clinici relativi all'outcome. Una recente analisi condotta su 55 pazienti ha riscontrato che il trattamento con tigeciclina o con un aminoglicoside è solitamente associato ad un buon outcome clinico¹³ inoltre è stato riportato che per le infezioni causate da ceppi KPC produttori è più efficace un trattamento combinato rispetto alla monoterapia.^{22,21} Risulta quindi che la terapia più indicata nelle infezioni da KPC-Kp è un trattamento combinato con colistina/polimixina B insieme altri agenti farmacologici nei confronti dei quali il batterio abbia mostrato suscettibilità in vitro, come gli aminoglicosidi e/o la tigeciclina.¹³ Dobbiamo però ricordare che per quanto riguarda la sensibilità alla tigeciclina, questa risulta nel range di sensibilità o intermedio a seconda dei riferimenti MIC utilizzati, infatti EUCAST pone $S \leq 1$ e $R > 2$ mg/L mentre la FDA definisce $R > 2$ mg/l, nel caso di utilizzo del sistema EUCAST quindi la maggior parte degli isolati risultano a sensibilità intermedia.³⁸

Per quanto riguarda i carbapenemici è stato osservato nello studio di Tumbarello *et al.* che gli schemi terapeutici che includono questa categoria di farmaci sono associati ad una maggiore riduzione della mortalità rispetto ai trattamenti che non includono carbapenemi. Questi antibiotici, contrariamente a quanto si possa pensare, risultano infatti essere ancora una ragionevole opzione terapeutica contro KPC-Kp soprattutto se somministrati a dosaggio elevato; la MIC infatti si mantiene solitamente ≤ 4 mg/L (nel range di sensibilità o poco al di sopra) e lo schema terapeutico si basa sull'infusione prolungata di elevate dosi di farmaco al fine di rendere i profili farmacocinetico e farmacodinamico adeguati.²³ La molecola utilizzata in genere è meropenem, che anche a dosi di 6-9 g/die non determina particolari effetti collaterali, a differenza di imipenem, che in vitro mostrerebbe un'attività antimicrobica maggiore, ma che è responsabile di reazioni avverse importanti soprattutto quando si superano

dosi ≥ 4 g/die³⁶; meropenem viene somministrato di solito in combinazione con altri agenti farmacologici attivi come tigeciclina e colistina (o polimixina E). La tigeciclina è una tetraciclina di nuova generazione messa a punto contro germi, che per la presenza di specifiche pompe di efflusso, hanno sviluppato resistenze verso altre tetracicline. E' un antibiotico ad ampio spettro, che agisce contro patogeni sia gram positivi che gram negativi, utilizzato spesso in terapie di combinazione contro CRE perché *in vitro*, utilizzando i *breakpoints* FDA con MIC <2 mg/ml, ha dimostrato buona attività contro molte *Enterobacteriaceae* MDR. Tra i farmaci più utilizzati nelle terapie di combinazione contro gram negativi troviamo inoltre le polimixine. L'assenza di nuovi antibiotici ha infatti riportato in uso vecchi farmaci come le polimixine scoperte negli anni '40 e cadute in disuso negli anni '70 perché responsabili di reazioni avverse (nefrotossicità e neurotossicità) se somministrate per via endovenosa. Le due polimixine usate in clinica sono la colistina (o polimixina E) e la polimixina B.

La colistina è una molecola anfipatica, con un'estremità idrofoba e una idrofila, questa struttura consente di alterare la permeabilità della membrana esterna dei batteri gram negativi, provocando dei "fori" attraverso i quali il farmaco di associazione, somministrato contestualmente alla colistina, può penetrare e svolgere la sua azione a livello del proprio target. L'estremità idrofila policationica della colistina infatti interagisce con le molecole di LPS della membrana esterna dei gram negativi, spostando gli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} che normalmente stabilizzano la struttura dell'LPS, consentendo l'ingresso del farmaco e quindi la lisi batterica.⁵⁴ Questo spiega il motivo per cui la colistina ha un'azione più spiccata verso i germi gram negativi e giustifica le terapie di combinazione visto il sinergismo con altre molecole antibiotiche. Con il tempo si sono però sviluppati, con meccanismi non ancora ben noti, fenomeni di resistenza verso la colistina da parte di KPC-Kp, limitando ancor di più le opzioni terapeutiche; pertanto data la crescente presenza di ceppi colistino-resistenti, data l'elevata mortalità e la maggiore efficacia di regimi terapeutici di combinazione, sono stati condotti studi sul potenziale effetto sinergico di varie associazioni di antibiotici, tra cui categorie di farmaci relativamente meno usate contro infezioni da gram negativi quali la rifampicina e la fosfomicina.

Alcuni studi hanno suggerito infatti che *in vitro* vi può essere sinergia tra due farmaci, contro le infezioni da KPC-Kp, anche se il patogeno è resistente ad una di queste due molecole antibiotiche. È stata dimostrata infatti sinergia sia tra polimixina B e rifampicina che tra polimixina B e doxiciclina, inoltre è stata osservata una sinergia, se pur meno pronunciata, tra

polimixina B e tigeciclina. Questi risultati suggeriscono quindi che la rifampicina, la doxiciclina e la tigeciclina possono essere utilizzati nel trattamento delle infezioni causate da KPC-Kp, anche in presenza di ceppi resistenti verso uno di questi agenti farmacologici, nei casi in cui si dimostri che in vitro la combinazione funziona.⁵⁵

Anche le linee guida della 4^o European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-4) che trattano della terapia contro batteri multiresistenti nei pazienti leucemici e sottoposti a SCT, sottolineano la necessità di usare agenti antibatterici non convenzionali come colistina/polimixina B, tigeciclina e fosfomicina. Un elemento aggiuntivo è rappresentato dal fatto che i pazienti oncoematologici, specialmente coloro che vengono sottoposti a trapianto di cellule staminali allogeniche, assumono molti farmaci (es. ciclosporine, micofenolato mofetil, antivirali ecc.) e sono maggiormente predisposti allo sviluppo di interazioni farmacologiche rispetto alla popolazione generale. Risulta pertanto necessario essere cauti nella somministrazione di questi antibiotici.⁵⁶

Da quanto detto precedentemente non è stato ancora individuato il regime di combinazione ottimale per le infezioni da KPC-Kp, le conoscenze attuali infatti sono ancora empiriche in quanto si basano sui risultati di studi retrospettivi e case reports osservazionali piuttosto che su studi randomizzati prospettici. Emerge però un dato importante, ovvero che nel trattamento delle infezioni da KPC-Kp devono essere escluse le monoterapie e utilizzati schemi di combinazione contenenti carbapenemici, che risultano essere associati ad una minore mortalità (18% vs 49% secondo *Qureshi*²¹, 34% vs 54% secondo *Tumbarello*²³). Le prospettive future devono tenere in considerazione che non si hanno nuovi antibiotici da poter utilizzare contro questo tipo di infezioni e che pertanto deve essere ottimizzato il più possibile l'utilizzo dei farmaci attuali con lo scopo di migliorare l'outcome clinico-microbiologico e prevenire o rallentare lo sviluppo di resistenze.

2.8 DECONTAMINAZIONE INTESTINALE E SCELTA DELLA GENTAMICINA

Il tratto gastrointestinale rappresenta la principale riserva umana di *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi produttrice. La colonizzazione dell'intestino sembra essere associata ad un rischio considerevole, circa il 10%, di sviluppare successivamente infezioni da parte di KPC-Kp^{57,58} e potrebbe essere una controindicazione ad alcune procedure chirurgiche, al trapianto d'organi e ad altri interventi maggiori.⁵⁹ La presenza del batterio a livello intestinale favorisce inoltre la disseminazione epidemica negli ospedali determinando la necessità di una sorveglianza attiva per l'identificazione immediata dello stato di portatore (mediante ricerca su campioni ottenuti con tamponi rettali) e la messa in atto di misure di controllo come l'isolamento o il cohorting con uno staff dedicato.^{60,61}

La decisione di eradicare il tratto gastrointestinale dei portatori deriva dall'osservazione che, nonostante un'appropriata terapia antibiotica parenterale basata su una combinazione di agenti farmacologici, in numerosi pazienti *K. pneumoniae* KPC positivi continua a persistere uno stato di batteriemia. Il meccanismo con cui *K. pneumoniae* induce batteriemia sembra essere il passaggio nel circolo ematico attraverso la mucosa intestinale favorito dal danneggiamento dell'epitelio intestinale durante gli episodi di mucosite. Dal momento che la maggior parte dei pazienti sottoposti a trattamenti intensivi di chemioterapia o a trapianto di cellule staminali sviluppa severe mucositi, questo può spiegare l'elevata frequenza di batteriemia in questo gruppo di pazienti. L'eradicazione della KPC-Kp dall'intestino potrebbe quindi determinare la rimozione del focolaio infettivo e risolvere la batteriemia. Inoltre l'eradicazione dello stato di portatore potrebbe determinare la cessazione della trasmissione tra i pazienti e la diffusione nosocomiale nelle unità di SCT.

Sono stati usati antibiotici orali non assorbibili per ottenere la decontaminazione del tratto digestivo dei portatori e tra questi in particolare è stata impiegata la gentamicina. La gentamicina è un antibiotico aminoglicosidico isolato dalla *Micromonospora purpurea* attivo contro gram positivi e gram negativi. Il suo meccanismo d'azione è simile a quello di altri aminoglicosidi, che agiscono inibendo in maniera irreversibile la sintesi proteica. Questi farmaci diffondono passivamente attraverso la membrana esterna della cellula batterica per mezzo dei canali delle porine e vengono trasportati nel citoplasma con un processo ossigeno-dipendente. L'energia per questo processo è fornita dal gradiente di membrana, il trasporto è accoppiato da una pompa protonica e inibito da un basso pH extracellulare e dall'anaerobiosi. All'interno della cellula il farmaco si lega alla subunità ribosomiale 30S inibendo la sintesi

proteica. La gentamicina somministrata per via intramuscolo o endovenosa è utilizzata nel trattamento di osteomieliti, infezioni della cute e dei tessuti molli, infezioni del tratto urinario, endocarditi ma soprattutto in caso di infezioni gravi, come sepsi e polmoniti, causate da batteri gram negativi (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Proteus*, *Acinetobacter* e *Klebsiella*) resistenti ad altri antibiotici, dove viene usata in combinazione con altri farmaci. La gentamicina può essere utilizzata anche per via topica, il solfato di gentamicina in creme, pomate o soluzioni allo 0.1-0.3% viene usato per il trattamento di ustioni infette, ferite o lesioni cutanee ma esistono anche preparati da somministrare per via sottocongiuntivale nel caso di affezioni oculari e per via intratecale per il trattamento di meningiti sostenute da batteri gram negativi.⁶² La gentamicina e in generale gli aminoglicosidi, nonostante l'ampio spettro d'azione, hanno un uso clinico limitato; sono infatti farmaci di seconda scelta usati per il trattamento di gravi infezioni sostenute da bacilli gram negativi e questo sembra essere dovuto alla notevole tossicità di questo gruppo di farmaci. Le principali reazioni avverse sono rappresentate dalla nefrotossicità e l'ototossicità. La nefrotossicità si sviluppa nel 10-20% dei pazienti, si manifesta con proteinuria e insufficienza renale e anche se di solito è reversibile e lieve rende comunque necessario il dosaggio delle concentrazioni sieriche del farmaco e il controllo della funzione renale, soprattutto se la somministrazione è prolungata o se la funzionalità renale del paziente è ridotta (es. nella sepsi ci può essere insufficienza renale acuta). L'ototossicità si sviluppa nell'1-5% dei pazienti che assumono gentamicina per più di 5 giorni, talvolta è irreversibile e si manifesta come disfunzione vestibolare o nel peggiore dei casi con perdita dell'udito. Altri effetti avversi sono rappresentati da disturbi neurologici (convulsioni, stati confusionali, cefalea, vertigini, disturbi sovrapponibili a quelli della miastenia gravis) e psichiatrici oltre che disturbi gastrointestinali e reazioni allergiche o idiosincrasiche.⁶²

L'utilizzo di gentamicina per via orale potrebbe essere efficace nell'ottenere la decontaminazione intestinale da KPC-Kp nei pazienti portatori; l'impiego di questo farmaco però ha ricevuto l'autorizzazione dal Ministero della Salute all'immissione in commercio in Italia per un'indicazione terapeutica, una posologia e una via e/o modalità di somministrazione differente da quella proposta. L'uso di gentamicina per os è pertanto definito come "off-label" o "fuori indicazione". [Si definisce off-label un farmaco prescritto al di fuori delle condizioni di Autorizzazione all'Immissione in Commercio (AIC), ossia per un'indicazione terapeutica, una posologia, una via di somministrazione e/o altro non espressamente riportati nella scheda tecnica ministeriale autorizzata dal Ministero della Salute. (Legge 296/06 all'articolo 1, comma 796, lettera Z)].

Per quanto riguarda la decontaminazione intestinale vi sono alcune problematiche da prendere in considerazione; deve essere stabilito infatti quali farmaci utilizzare (gentamicina da sola o associata alla colistina), qual è la percentuale di efficacia della decolonizzazione e qual è il rischio di insorgenza di ceppi resistenti durante la decontaminazione orale.

Sono stati condotti diversi studi volti ad esaminare la storia naturale della colonizzazione da parte di enterobatteri resistenti ai carbapenemi e a valutare l'efficacia e la sicurezza della decontaminazione intestinale selettiva o SDD (Selective Digestive Decontamination) mediante la somministrazione orale di antibiotici non assorbibili per via sistemica.

Come mostrano le **Tabelle 2.4-2.5** Zucherman e collaboratori hanno condotto uno studio in cui venivano trattati 15 pazienti adulti ematologici con gentamicina orale (80 mg per quattro volte al giorno o QID) con lo scopo di eradicare lo stato di portatore, prevenire lo sviluppo di patologie associate e controllare la diffusione dell'infezione. Lo studio ha rilevato che il 66% dei pazienti trattati è stato decontaminato, nel 62.5% dei casi l'eradicazione è stata accompagnata alla risoluzione della batteriemia e nessun ceppo resistente è stato isolato.⁴⁶ Un altro studio controllato prospettico, condotto a Israele da Oren e collaboratori, ha analizzato l'efficacia di gentamicina e colistina orale nella decolonizzazione di KPC. Nel gruppo controllo la decolonizzazione spontanea si è avuta nel 7% dei casi contro il 42% ($p < 0.01$) del gruppo al quale è stata somministrata gentamicina orale 80 mg QID. Inoltre nei pazienti in cui si era avuta l'eradicazione, sia dovuta al trattamento che spontanea, la mortalità era ridotta rispetto ai portatori persistenti di KPC (17% *vs* 49% $p = 0.002$).⁶³

In uno studio randomizzato controllato doppio cieco portato avanti da Saidel-Odes e collaboratori su una popolazione di soggetti adulti non ematologici, è stato visto che l'efficacia della combinazione di gentamicina più colistina orale era del 60% rispetto al 15% dei casi controllo ($p < 0.016$), inoltre non sono state identificate resistenze verso nessuno dei due farmaci.⁶⁴ Un altro studio condotto nell'ospedale di Lipsia da Lübbert *et al.* ha valutato 90 pazienti adulti non ematologici colonizzati da KPC: 14 pazienti sono stati decontaminati con colistina e gentamicina per os e comparati con 76 pazienti colonizzati non trattati. Nel gruppo sottoposto a trattamento l'eradicazione si è ottenuta nel 43% dei casi rispetto al 30% dei controlli ($p = 0.102$); nel gruppo dei decontaminati è stato osservato un tasso del 19% di resistenza alla colistina e del 45% alla gentamicina.⁶⁵ Risultati simili a quelli ottenuti da Zucherman sono stati riscontrati in uno studio prospettico condotto in tre ospedali italiani tra cui quello di Cisanello a Pisa (Tascini *et al.*), nel quale in un periodo di 8 mesi sono stati

somministrati 80 mg di gentamicina orale QID a 50 pazienti adulti, con campioni rettali positivi alla *K. Pneumoniae* KPC sensibile alla gentamicina e che dovevano essere sottoposti ad intervento chirurgico, intervento medico maggiore (chemioterapia o terapia immunosoppressiva) o che dovevano essere trasferiti in sedi extra-ospedaliere. La decontaminazione intestinale, in seguito al trattamento con gentamicina orale, è stata ottenuta nel 68% dei pazienti (34/50). La durata media del trattamento è stata di 9 giorni (range: 7-15 giorni) nei pazienti decontaminati e di 24 giorni (range: 20-30 giorni) nel caso di persistente colonizzazione. Durante i sei mesi di follow up sono state documentate infezioni da *K. pneumoniae* carbapenemasi produttrici nel 15% (5/34) dei pazienti successivamente decontaminati e nel 73% (12/16) dei pazienti in cui persisteva lo stato di portatore (25%). Non è stato documentato un diverso tasso di mortalità nei pazienti decontaminati e in quelli con persistente colonizzazione. Sono stati isolati dai campioni fecali ceppi resistenti alla gentamicina in 4/16 pazienti portatori.⁵⁹

È stato condotto da Bar-Yoseph H. et al. un recente studio di metanalisi che ha permesso di esaminare le varie strategie di decontaminazione intestinale di Enterobatteri ESBL positivi e carbapenemasi positivi.⁶⁶ Come ha si evince dalla **Tabella 2.4**, dove sono stati riuniti i 5 studi riguardo la decontaminazione intestinale da KPC, l'efficacia del trattamento è stata del 56% rispetto alla decontaminazione spontanea che si è avuta nel 16% dei casi e sono stati isolati ceppi resistenti alla gentamicina nel 30% dei casi.^{46,59,63-65}

La gentamicina somministrata per via orale risulta un agente ideale per la decontaminazione intestinale di *Klebsiella pneumoniae* per vari motivi, inclusi i seguenti: è rapidamente battericida in vitro contro ceppi di KPC-Kp gentamicina-suscettibili; la formulazione orale è virtualmente non assorbibile, non ha pertanto attività sistemica e conseguentemente non determina tossicità; ha spettro limitato e non ha attività contro gli anaerobi essendo quindi meno distruttiva sulla flora gastrointestinale; infine non è un farmaco tipicamente somministrato nel trattamento combinato contro infezioni severe da KPC-Kp.^{46,59} La gentamicina non si usa spesso per le seguenti motivazioni: in alcuni casi si comporta da antagonista nei confronti delle polimixine (colistina) nel trattamento combinato contro KPC e ne può potenziare la tossicità renale, inoltre, il sinergismo della gentamicina con i carbapenemici è dovuto al fatto che questi ultimi dovrebbero aumentare la permeabilità della parete esterna dei batteri alla gentamicina, fenomeno che però può non verificarsi nelle KPC.³⁶

Author (Reference)	Drugs	Study	N° patients included	N° (%) pts decontaminated	Pts with HM±SCT	N (%) G resistant strai	Follow-up
Zuckerman <i>et al.</i> ⁵	GO	Observational	15	10/15 (66%)	15	0	30-300 days
Tascini <i>et al.</i> ⁶	GO	Prospective	50	34/50 (68%)	2	4/16 (25%) persisters	180 days
Saidel-Odes <i>et al.</i> ¹⁰	GCO1	Randomized Double Blind	20 GCO1 20 controls	12/20 (60%) GCO1; 3/20 (15%) controls	0	0	45 days
Oren <i>et al.</i> ¹⁵	GO; CO2; GCO2	Semirandomized prospective plus controls	26 GO; 16 CO2; 8 GCO2 102 controls	11/26 (42%) GO; 8/16 (50%) CO2; 3/8 (37%) GCO2; 7/102 (7%) controls	15 GO 15 CO2 4 GCO2 12 controls	6/15 (40%) persisters	31-140 days
Lubbert <i>et al.</i> ¹⁴	GCO1	Observational plus controls	14 GCO1; 76 controls	6/14 (43%) GCO1; 23/76 (30%) controls	0	5/11 (45%)	48-53 days
Total	–	–	149 treated; 198 controls	84/149 (56%) treated; 33/198 (16%) controls	51 treated 12 controls	13/42 (30%)	–

CRE: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; G: gentamicin; GO: oral gentamicin (80 mg q.i.d.); CO2: oral colistin 2MU q.i.d.; GCO2: oral gentamicin (80 mg q.i.d.) plus oral colistin 2MU q.i.d.; GCO1: oral gentamicin (80 mg q.i.d.) plus oral colistin 1 MU q.i.d.; HM±SCT: hematologic malignancies ± stem cell transplantation.

Tabella 2.4 Studi clinici sulla decontaminazione orale di Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi nella popolazione generale e nei pazienti con patologie ematologiche maligne.

Study	Decolonization regimen (route, type, dose and duration of antibiotic treatment)	Percentage of patients with bacteria resistant to eradication therapy
CRE		
Tascini ²⁷ 2014	oral, 80 mg of gentamicin, 4 times daily for at least 8 days (median=16 days)	0%
Lübbert ²⁶ 2013	oral solutions (1 MIU of colistin sulphate and 80 mg of gentamicin sulphate) and topical oropharyngeal application of a gel [gentamicin sulphate (1.6 mg/g) and colistin sulphate (1 MIU/g)], 4 times daily for 7 days	0% gentamicin and 45% colistin resistance
Oren ²⁹ 2013	oral, 2 MIU of colistin sulphate OR 80 mg of gentamicin, 4 times daily OR both, up to eradication (median=33 days)	0% resistance by treatment groups
Saidel-Odes ³⁰ 2012	oral, 80 mg of gentamicin sulphate and 1 MIU of colistin sulphate, 4 times daily and topical oropharyngeal application of 0.05 MIU of colistin sulphate and 0.8 mg of gentamicin sulphate, 4 times daily for 7 days	0%
Zuckerman ³¹ 2011	oral, 80 mg of gentamicin, 4 times daily for a median of 27 days	NS
ESBL		
Rieg ³⁴ 2015	oral, 1 or 2 MIU of colistin 4 times daily for 4 weeks OR 400 mg of rifaximin twice daily for 2–3 weeks; for urinary colonization—3 g of fosfomicin (single dose) OR 100 mg of nitrofurantoin twice daily for 5 days OR 100 mg of cefpodoxime twice daily plus 875/125 mg of amoxicillin/clavulanic acid twice daily OR renal function adjusted dose carbapenem, for 3–7 days	10% colistin resistance
Gutiérrez-Urbón ⁴⁰ 2014	oral solution [3.2% amikacin sulphate and 1% colistin sulphate (1 mL/kg)], 4 times daily for 5 days	0%

Tabella 2.5 Regimi di decolonizzazione utilizzati negli studi clinici citati.⁶⁶

STUDIO SPERIMENTALE

CAPITOLO 3

SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questo studio è quello di valutare la possibilità di decontaminare pazienti portatori di KPC-Kp mediante la somministrazione di gentamicina orale, senza produrre effetti avversi, per impedire lo sviluppo di un processo infettivo che potrebbe in pazienti immunocompromessi, come i bambini ricoverati nell'U.O. di Oncoematologia Pediatrica, essere molto severo sia per l'elevato tasso di mortalità associato a questa infezione sia per l'impossibilità di mettere in atto schemi terapeutici che prevedano la somministrazione di chemioterapie intensive o il trapianto di cellule staminali ematopoietiche. I protocolli terapeutici messi in atto per trattare patologie oncologiche ed ematologiche prevedono la combinazione di diversi farmaci citostatici, si parla infatti di chemioterapia di combinazione o polichemioterapia. Il meccanismo farmacodinamico si basa sull'inibizione della duplicazione e della proliferazione cellulare che ha come target non solo le cellule tumorali ma anche le cellule sane che hanno elevata attività proliferativa, come le cellule emopoietiche del midollo osseo, pertanto tra gli effetti collaterali dei trattamenti chemioterapici avremo la ridotta produzione degli elementi maturi del sangue con sviluppo di anemia, piastrinopenia e leucopenia. Tra i leucociti in particolare si riduce il numero dei neutrofili con aumento del rischio di infezioni, come quelle da *K. pneumoniae* KPC. La decontaminazione di germi potenzialmente patogeni localizzati a livello intestinale, mediante l'uso di un farmaco antibiotico non assorbibile, potrebbe essere pertanto una strategia efficace per impedire lo sviluppo di infezioni severe durante gli episodi di immunodepressione e neutropenia che sono frequenti nei pazienti ricoverati presso le unità di Oncoematologia.

CAPITOLO 4

PAZIENTI E METODI

4.1 SOGGETTI INCLUSI NELLO STUDIO

Sono stati inclusi, in questo studio di coorte prospettivo, pazienti ammessi tra il settembre 2014 e l'agosto 2016 al dipartimento di Oncoematologia Pediatrica e BMT di Pisa per trattamenti chemioterapici e trapianto di cellule staminali ematopoietiche, identificati come portatori di KPC-Kp dalla sorveglianza di colture su tamponi rettali. Durante questo periodo di circa 24 mesi sono stati individuati 5 pazienti con tamponi rettali positivi. In ogni paziente arruolato nello studio sono state valutate alcune caratteristiche anamnestiche, cliniche e terapeutiche, tra le quali:

- ❖ sesso;
- ❖ età;
- ❖ patologia di base diagnosticata;
- ❖ presenza di fattori di rischio per l'infezione da KPC-Kp;
- ❖ durata dello stato di portatore calcolata in giorni;
- ❖ durata del trattamento orale con gentamicina in giorni;
- ❖ eventuale isolamento di ceppi GEN^R;
- ❖ durata della eventuale batteriemia da KPC-Kp e terapia antibiotica impostata durante la sepsi;
- ❖ risoluzione della batteriemia;
- ❖ eventuali reazioni avverse al farmaco;
- ❖ outcome;
- ❖ terapia in corso;
- ❖ eventuali infezioni da KPC-Kp durante il follow-up.

Per questi pazienti si sono raccolte informazioni dettagliate ed è stato creato un database. La **Tabella 4.1** elenca le variabili che sono state valutate in ogni paziente.

VARIABILI RELATIVE AL PAZIENTE	VARIABILI RELATIVE ALLA PATOLOGIA DIAGNOSTICATA E ALLA TERAPIA	VARIABILI RELATIVE ALLO STATO DI PORTATORE DI KPC-K _p E ALLA DECONTAMINAZIONE
Nome	Diagnosi	Fattori di rischio
Genere	Presenza di traslocazioni cromosomiche	Durata dello stato di portatore
Data di nascita	Protocollo terapeutico	Durata della somministrazione di gentamicina
Outcome	Gruppo di rischio	Dose di gentamicina somministrata
	Inclusione in uno studio randomizzato	Eventuale isolamento di ceppi GEN ^R
	Terapia attuale	Sviluppo di batteriemia e trattamento della sepsi
		Reazioni avverse al farmaco
		Follow up

Tabella 4.1 Variabili valutate nella popolazione inclusa nello studio

4.2 CONSENSO INFORMATO E COMITATO ETICO

I genitori, essendo i soggetti in studio di età inferiore ai 18 anni, sono stati informati sulla procedura a cui dovevano essere sottoposti i pazienti ed è stato fatto firmare un modulo di consenso per l'impiego off-label della gentamicina. L'intero studio è stato approvato dal Comitato Etico locale dell'AOUP.

4.3 DEFINIZIONI

La colonizzazione o stato di portatore è definita come la presenza di almeno un campione rettale positivo alla KPC-K_p. Si parla invece di eradicazione dello stato di portatore quando almeno tre campioni rettali consecutivi, ottenuti separatamente durante un periodo di almeno 3 settimane, risultano negativi per la KPC-K_p e viene confermata mediante test biologici molecolari. Si definisce batteriemia la presenza di emocolture positive per *K. pneumoniae* KPC.

4.4 MANAGEMENT DEI PORTATORI IN DEGENZA ORDINARIA E IN DAY HOSPITAL

Metodo di identificazione e sorveglianza dello stato di portatore in Day Hospital:

Identificazione e sorveglianza dello stato di portatore. È stato effettuato un tampone rettale per KPC e inviato alla U.O. di Microbiologia specificando sull'apposita richiesta "tampone rettale per KPC". Il tampone è stato eseguito al primo accesso in DH/ambulatorio a tutti i pazienti oncologici in trattamento chemioterapico e successivamente ripetuto: una volta a settimana in caso di terapie aplastizzanti, una volta al mese durante terapie non aplastizzanti. Per i pazienti sottoposti a trapianto di cellule staminali ematopoietiche il tampone è stato effettuato al primo accesso e ripetuto con frequenza settimanale, per tutte le altre categorie di pazienti (es. pazienti ematologici, oncologici fuori terapia etc.) il tampone rettale per KPC è stato effettuato al primo accesso e ripetuto solo su indicazione medica. Una volta venuti a conoscenza della positività del tampone rettale, ripetuto una volta a settimana, è stato inviato un campione di feci c/o l'unità operativa di Malattie Infettive specificando nella richiesta "Esame colturale quantitativo per KPC". La colonizzazione (stato di portatore) è stata definita come la presenza di almeno un campione rettale positivo alla KPC-Kp. In presenza di tamponi positivi sono state messe in atto delle misure di isolamento interrotte solamente su indicazione medica, dopo almeno tre settimane consecutive in cui i tamponi siano risultati negativi.

Isolamento dei pazienti KPC positivi. I pazienti positivi ed il loro accompagnatore, durante tutto il periodo di permanenza in DH, sono rimasti all'interno della stanza appositamente adibita e hanno avuto accesso esclusivamente al servizio igienico dedicato e ricevuto assistenza da parte di personale infermieristico ed OSS in servizio.

Accesso alla camera di isolamento da parte del personale. L'accesso alla camera di isolamento è avvenuto rispettando le "Precauzioni da contatto":

- Igiene delle mani prima e dopo l'uso dei DPI e dopo contatto con il paziente o con le superfici ambientali.
- Uso di guanti e camice monouso
- Uso di strumenti dedicati (fonendoscopi, monitor, laccio emostatico, etc.) presenti all'interno della stanza. Pulizia e disinfezione di ogni materiale venuto a contatto con il paziente quando portato fuori dalla stanza.

- Rimozione dei DPI all'uscita dalla stanza e deposito nell'apposito contenitore all'interno della zona filtro.

Misure di igiene ambientale. Sono state fornite specifiche direttive riguardo la pulizia e la sanificazione delle stanze di DH e degli spazi comuni. Il personale infermieristico e OSS responsabile della pulizia dei dispositivi medici (monitor, pompe da infusione, stetoscopi etc.) ha effettuato tale pulizia a frequenza giornaliera con salviette monouso imbevute di Antisapril detergente disinfettante.

Frequenza negli spazi comuni (cucina, corridoi, sala giochi, scuola) durante le attività educative e ricreative. I pazienti KPC positivi e l'accompagnatore durante tutta la permanenza in DH sono rimasti all'interno della camera di isolamento e non è stata consentita la frequenza in nessuno degli spazi comuni. Le figure di supporto (psicologa, insegnanti, clown dottori) hanno avuto accesso alla stanza di isolamento solo dopo aver visitato tutte le altre camere e adottato le "Precauzioni da contatto".

Ai pazienti KPC negativi, compatibilmente con lo specifico stato di immunodepressione, è stato invece consentito l'accesso agli spazi comuni (scuola, sala giochi etc.).

Trasferimenti del paziente e consulenze esterne. I trasferimenti di tutti i pazienti al di fuori della U.O. sono stati limitati alle sole procedure indispensabili privilegiando, ove possibile, la consulenza diretta al letto del paziente. In caso di invio o trasferimento al di fuori del reparto di un paziente KPC positivo, la struttura ricevente e il servizio ambulanze sono stati messi al corrente. In caso di consulenza a letto del paziente, l'accesso alla degenza è avvenuto quanto richiesto dallo specifico stato di isolamento del paziente.

Profilassi e terapia antibiotica. Per tutti i pazienti è stato limitato il più possibile l'utilizzo degli antibiotici in profilassi e terapia. Per i pazienti KPC positivi candidati a terapie aplastizzanti, è stata effettuata la decontaminazione del tratto digestivo con Gentamicina orale alla dose di 4 mg/Kg/die in tre somministrazioni con dosaggio del livello plasmatico del farmaco almeno 2 volte a settimana.

Metodo di identificazione e sorveglianza dello stato di portatore in degenza ordinaria:

Al momento del ricovero è stato eseguito un tampone rettale per KPC a tutti i pazienti. Il tampone è stato inviato c/o la U.O. di Microbiologia specificando nella richiesta "Tampone rettale per KPC". La camera di degenza è stata assegnata in base alla conoscenza dello stato di

portatore. Se lo stato di portatore KPC del paziente era noto (da esito dei tamponi KPC effettuati in DH/ambulatorio nei 15 giorni precedenti) il paziente veniva ricoverato in una stanza di isolamento e adottate le “*Precauzioni da contatto*”, se il paziente era negativo veniva consentito il ricovero anche in camera doppia. Se non era noto lo stato di portatore il paziente veniva ricoverato in camera singola e adottate le “*Precauzioni da contatto*” fino a nuova disposizione medica (basata sulla definizione dello stato di portatore).

Durante il ricovero è stato proseguito lo screening per KPC, effettuando il tampone rettale a tutti i pazienti ricoverati, 2 volte a settimana e dopo ogni trasferimento che avesse implicato il pernottamento al di fuori del reparto, al momento del rientro in U.O. Per i pazienti KPC positivi è stato inviato un campione di feci c/o U.O. Malattie Infettive specificando nella richiesta “Esame colturale quantitativo per KPC” appena venuti a conoscenza della positività del tampone rettale e ripetuto una volta a settimana. Se il paziente, inizialmente negativo, è diventato positivo, è stato necessario trasferirlo quanto prima in camera di isolamento e adottate le “*Precauzioni da contatto*”.

L'accesso alla camera di isolamento da parte del personale è avvenuto sempre rispettando le “*Precauzioni da contatto*”, le misure di isolamento sono state interrotte solo su indicazione medica e dopo tre settimane consecutive in cui i tamponi siano risultati negativi.

Le misure di igiene ambientale, la frequenza degli spazi comuni e delle attività educative e ricreative, i trasferimenti del paziente, le consulenze esterne, la profilassi e la terapia antibiotica sono le medesime adottate per i pazienti in Day Hospital.

4.5 RICERCA MICROBIOLOGICA

Per identificare i pazienti colonizzati a livello intestinale da *K. pneumoniae* KPC abbiamo usato come metodo di screening diretto la PCR che consente di individuare, con elevata sensibilità, la presenza dei geni *bla*_{KPC} a partire da campioni di feci.⁶⁷

La K-PCR è stata eseguita usando opportuni primers, complementari alle estremità 5' e 3' dei due filamenti del segmento da riprodurre, il template. Sono stati usati come template 5 µL di un estratto di DNA, il quale viene preparato diluendo un campione rettale in 500 mL di soluzione salina sterile per 20 minuti a temperatura ambiente e riscaldando la sospensione diluita a 100°C per 15 minuti in una provetta con tappo a vite. Con il metodo K-PCR si

possono ottenere risultati in circa 3-4 h, con il vantaggio di essere un metodo più economico rispetto al real-time PCR.²⁶

I ceppi di *K. Pneumoniae* isolati nelle feci sono stati dapprima identificati con metodiche fenotipiche: mediante il sistema mini-API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) o mediante lo spettrometro di massa MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) (Vitek MS, bioMérieux).⁶⁷ Successivamente è stata confermata la presenza dei geni *bla_{KPC}* mediante la metodica PCR come descritto precedentemente.²⁶ Le colonie di KPC-Kp sono state quantificate in termini di CFU/g di feci mediante esami colturali effettuati sui campioni di feci positivi per KPC-Kp. Il campione di feci è stato pesato, risospeso in 1 mL di soluzione salina a temperatura ambiente e diluito in 10 diluizioni con l'obiettivo di quantificare il numero di CFU presenti. La suscettibilità agli antimicrobici è stata testata usando il metodo di diffusione su agar secondo la versione 3.1 delle linee guida dell'EUCAST⁶⁸ mentre la MIC di gentamicina, colistina e fosfomicina è stata determinata mediante il metodo E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden). L'interpretazione dei dati è stata effettuata sulla base dei valori di breakpoints dell'EUCAST (versione 3.1).⁶⁸ (Tabelle 4.2, 4.3, 4.4)

Carbapenems ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Doripenem	1	4	10	24	18
Ertapenem	0.5	1	10	25	22
Imipenem ²	2	8	10	22	18
Meropenem	2	8	10	22	18

Tabella 4.2 Breakpoints delle linee guida EUCAST (versione 3.1) relativi ai carbapenemi.⁶⁸

Aminoglycosides ¹	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Amikacin	8	16	30	16	13
Gentamicin	2	4	10	17	14
Netilmicin	2	4	10	15	12
Tobramycin	2	4	10	17	14

Tabella 4.3 Breakpoints degli aminoglicosidi, linee guida EUCAST (versione 3.1).⁶⁸

Miscellaneous agents	MIC breakpoint (mg/L)		Disk content (µg)	Zone diameter breakpoint (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Chloramphenicol	8	8	30	17	17
Colistin	2	2		Note ^A	Note ^A
Daptomycin	-	-		-	-
Fosfomicin iv	32	32		-	-
Fosfomicin oral (uncomplicated UTI only)	32	32		-	-

Tabella 4.4 Breakpoints di colistina e fosfomicina, linee guida EUCAST (versione 3.1).⁶⁸

4.6 SOMMINISTRAZIONE DI GENTAMICINA ORALE

È stata somministrata gentamicina orale alla dose di 4 mg/Kg/die in tre somministrazioni (alle ore 8, 15, 22) a tutti i pazienti identificati come portatori di KPC-Kp; è stato fatto firmare preventivamente ai genitori, in quanto si trattava di pazienti minorenni, un modulo di avvenuta informazione e consenso per l'impiego off-label della gentamicina. Il farmaco è stato somministrato fintanto che non è stata ottenuta l'eradicazione del batterio e la somministrazione prolungata quanto necessario nei pazienti clinicamente più a rischio di sviluppare l'infezione, ovvero soggetti con neutropenia o che avrebbero dovuto successivamente essere sottoposti a trattamenti chemioterapici intensi o ad allo-SCT. Questi soggetti hanno continuato a ricevere l'antibiotico per via orale nonostante l'eradicazione. I pazienti che avevano contestualmente sviluppato un'infezione da *K. pneumoniae* KPC sono stati ulteriormente trattati con una combinazione di farmaci antibiotici per via endovenosa ovvero impostando la terapia empirica di prima linea indicata dall'ECIL-4 e definita CTAT (CRKp-Targeted Antibiotic Therapy). Un'appropriata CTAT include colistina/polimixina B, tigeciclina, gentamicina preferibilmente associate a meropenem o eventualmente alla fosfomicina.⁴⁷ Sono stati misurati poi i livelli ematici del farmaco in tutti i pazienti che non facevano gentamicina per via parenterale. Per misurare la concentrazione plasmatica della gentamicina è stato utilizzato il dosaggio ad immunofluorescenza (Abbott, Abbott Park, IL). Il picco di concentrazione è stato misurato il terzo giorno di trattamento e successivamente ripetuto, almeno due volte a settimana, mediante prelievi effettuati 2 ore dopo la somministrazione del farmaco.⁵⁹

4.7 FOLLOW UP

È stato valutato l'outcome clinico di ogni paziente a cui è stata somministrata gentamicina orale; durante il periodo di follow up i soggetti sono stati seguiti nel loro decorso clinico per individuare eventuali manifestazioni cliniche o episodi infettivi causati da KPC-Kp. È stata proseguita la sorveglianza dello stato di portatore per ogni paziente ammesso al reparto e/o al day hospital di Oncoematologia Pediatrica mediante raccolta di tamponi rettali e perianali. I tamponi sono stati effettuati una volta a settimana in caso di pazienti sottoposti a terapie aplastizzanti (ad esempio terapie di induzione o reinduzione) e una volta al mese durante terapie non aplastizzanti (ad esempio terapie di mantenimento).

4.8 ELABORAZIONE DATI

I dati riguardanti il trattamento di decontaminazione intestinale selettiva sono stati raccolti, è stato creato un database e costruito un grafico a dispersione; il line plot (o time plot) è stato ottenuto mediante l'ausilio del programma Excel Microsoft Office 2013 consentendo di descrivere, con una rappresentazione grafica, l'andamento degli eventi studiati su una linea temporale.

CAPITOLO 5

RISULTATI

Durante un periodo di circa 24 mesi (settembre 2014-agosto 2016) sono stati identificati, tra i pazienti ricoverati nel reparto di Oncoematologia Pediatrica di Pisa, 5 soggetti positivi per KPC-Kp alla ricerca del germe mediante esecuzione di tamponi rettali e perianali. L'età media dei bambini al momento del rilevamento del primo tampone positivo era di 8.4 (± 5.3) anni (range: 2-17 anni).

Il paziente zero, ovvero il primo paziente identificato come portatore nella popolazione studiata, è stata una ragazza di 17 anni, con diagnosi di ETP-ALL (Early-T cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia) ricoverata presso l'U.O. di Oncoematologia Pediatrica nell'agosto 2014 per eseguire TCSE allogenico da donatore non familiare o MUD (Mismatched Unrelated Donor). Il tampone rettale per KPC raccolto nell'agosto 2014 durante la procedura di work-up del trapianto risultava negativo; successivamente la paziente ha eseguito, nel mese di settembre, prelievo di ovociti dopo stimolazione ormonale e TCSE. Durante la fase di aplasia post trapianto si è avuta positivizzazione delle emocolture e sviluppo di una sepsi da KPC-Kp per cui è stata impostata una terapia antibiotica endovenosa con meropenem, gentamicina, tigeciclina e colistina. La paziente è stata trasferita in UTI dove in seguito ad una rapida e progressiva compromissione delle condizioni generali è andata incontro ad exitus. Non è stato possibile pertanto iniziare il trattamento di decontaminazione con gentamicina orale in questa paziente, pur essendo essa risultata positiva per KPC-Kp, per il rapido deterioramento dello suo quadro clinico e l'esito infausto. Nello stesso periodo, settembre-ottobre 2014, altri quattro pazienti sono stati identificati come portatori di KPC-Kp e iniziata la somministrazione di gentamicina orale in fiale (4mg/Kg/die in tre somministrazioni alle ore 8, 15 e 22). Tutti i pazienti colonizzati sono stati isolati in stanze singole, gli spazi comuni del reparto (scuola e cucina) sono stati chiusi e adottate rigide misure di isolamento da contatto (igiene delle mani prima di indossare guanti e camici appositi, con nuovo lavaggio delle mani all'uscita dalla stanza) e di disinfezione ambientale.

Al momento del riscontro della positività del tampone rettale per *K. pneumoniae* KPC due pazienti inclusi nello studio erano sottoposti a trattamento chemioterapico secondo protocollo

AIEOP BFM 2009 per diagnosi di LLA (Leucemia Linfoblastica Acuta), un paziente veniva trattato secondo protocollo EsPhALL per diagnosi di LLA-Ph+ (Leucemia Linfoblastica Acuta positiva per il cromosoma Philadelphia), un altro paziente, già sottoposto a chemioterapia secondo protocollo AIEOP BFM-2009 per LLA-T, veniva posta diagnosi di 2° tumore (sarcoma istiocitico) e iniziata terapia CHOP-AVP. Le caratteristiche anamnestiche, la diagnosi e il trattamento terapeutico dei pazienti sono presentati nella **Tabella 5.1**.

CARATTERISTICHE	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3	PAZIENTE 4
Età (anni)	2	8	11	4
Genere	M	M	M	F
Patologia diagnosticata	Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA CALL)	Leucemia Linfoblastica Acuta T ⁺ - Sarcoma Istiocitico	Leucemia Linfoblastica Acuta (Ph+)	Leucemia Linfoblastica Acuta (LLA CALL)
Traslocazioni cromosomiche	/	/	t(9;22) o cromosoma Philadelphia, riarrangiamento BCR/ABL	t(12;21) riarrangiamento TEL/AML1
Gruppo di rischio	Rischio standard (SR)	Rischio elevato (HR)	/	Rischio intermedio (IR)
Trattamento	AIEOP-BFM 2009 gruppo LLA-SR	AIEOP BFM 2009 gruppo LLA-T HR/CHOP-AVP/SCT-MUD allo-BMT/CHOP-VP16/ICE ridotto	EsPhALL	AIEOP-BFM 2009 gruppo LLA-NO HR
Fattori di rischio per infezioni da KPC-Kp (precedenti ricoveri, profilassi antibiotica, devices endovascolari)	Sì	Sì	Sì	Sì

Tabella 5.1 Caratteristiche dei pazienti, diagnosi e trattamento

I dati relativi alla decontaminazione intestinale selettiva con gentamicina orale a cui è stata sottoposta la popolazione studiata sono riportati nelle pagine seguenti. La **Tabella 5.2** riassume le caratteristiche dei soggetti e i dati ricavati durante il trattamento, mentre la **Fig. 5.1** rappresenta graficamente, in ognuno dei 4 pazienti arruolati nel nostro studio, le fasi della decontaminazione in un determinato intervallo di tempo, compreso tra il momento in cui è stato rilevato il primo tampone rettale positivo fino al termine del periodo di follow up.

	PAZIENTE 1	PAZIENTE 2	PAZIENTE 3	PAZIENTE 4
Primo tampone rettale positivo per KPC-Kp (data)	29/09/2014	28/09/2014	25/09/2014	29/09/2014
Concentrazione di KPC-Kp nel primo campione di feci	6x10 ⁸ CFU/g di feci	1x10 ⁸ CFU/g di feci	3x10 ⁸ CFU/g di feci	1x10 ⁸ CFU/g di feci
GEN ^R prima della SDD	/	/	/	/
GEN ^R dopo la SDD	/	/	Si	/
Terapia antibiotica profilattica per neutropenia	Ciprofloxacina	Ciprofloxacina	Cotrimossazolo	Cotrimossazolo
Inizio della SDD	3/10/2014	09/10/2014	03/10/2014	03/10/2014
Dose di gentamicina somministrata (4 mg/Kg/die)	5 mg/die in tre somministrazioni	25 mg/die in tre somministrazioni	40 mg/die in tre somministrazioni	25 mg/die in tre somministrazioni
Terzo tampone negativo per KPC-Kp	02/01/2015	16/04/2015	/	19/10/2014
Termine della somministrazione della gentamicina (data)	02/03/2015	09/07/2015	02/10/2015	04/02/2015
Durata dello stato di portatore (gg)	95	200	/	20
Durata del trattamento orale (gg)	150	272	372	123
Risoluzione dello stato di portatore	Si	Si	No. Tamponi rettali falsamente negativi. Test molecolare positivo per <i>bla</i> _{KPC} .	Si
Batteriemia (durata in gg)	/	/	Si (8 gg) sostenuta da KPC-Kp gentamicina sensibile	/
Trattamento della sepsi da KPC-Kp	/	/	COL, GEN, MER, DIC, (sospesa per RA), TIG (sospesa per RA)	/
Neutropenia febbrile durante la SDD (n° di episodi)	1	/	4	/
Terapie antibiotiche ev concomitanti alla SDD	GEN, COL, MER		GEN, COL, MER	
[GEN] plasmatica media (mg/L)	0.4	0.0	0.3	0.25
Reazioni avverse	/	/	/	/
Outcome	Remissione completa di malattia	Remissione della LLA-T. Recidiva di sarcoma istiocitico	Remissione completa di malattia	Remissione completa di malattia
Terapia in corso	Fuori terapia	CHOP-VP16, RT su lesione neoplastica del cuoio capelluto per un totale di XII sedute	Fuori terapia	Fuori terapia
Follow-up (in gg)	607	503	345	682
Infezioni da KPC durante il follow up	/	/	/	/

Tabella 5.2 Riassunto delle caratteristiche dei pazienti in studio sottoposti a decontaminazione con gentamicina orale.

Abbreviazioni relative alle Tabelle 5.1 e 5.2:

AIEOP-BFM ALL 2009: Protocollo del gruppo tedesco di Oncoematologia Pediatrica BFM (Berlino-Francoforte-Monaco) per il trattamento delle LLA

CALL: Common Acute Lymphoblastic Leukemia

COL: Colistina

CHOP: (C) Ciclofosfamide, (**H**) Idrossidaunorubicina (Doxorubicina o Adriamicina), (O) Oncovin (Vincristina) e (P) Prednisone; **AVP:** (A) Adriamicina, (V) Vincristina, (P) Procarbazina

DIC: Rifampicina

EsPhALL: European Intergroup Study on post-induction treatment of Ph+ ALL. Protocollo di trattamento per la LLA Philadelphia positiva

F: Femmina

GEN^R: Gentamicina resistente

IR: Intermediate Risk

LLA: Leucemia Linfoblastica Acuta

M: Maschio

MER: Meropenem

NO-HR: No High Risk

RA: Reazione avversa

SCT MUD: Matched Unrelated Donor Stem Cell Transplantation

SR: Standard Risk

TIG: Tigeciclina

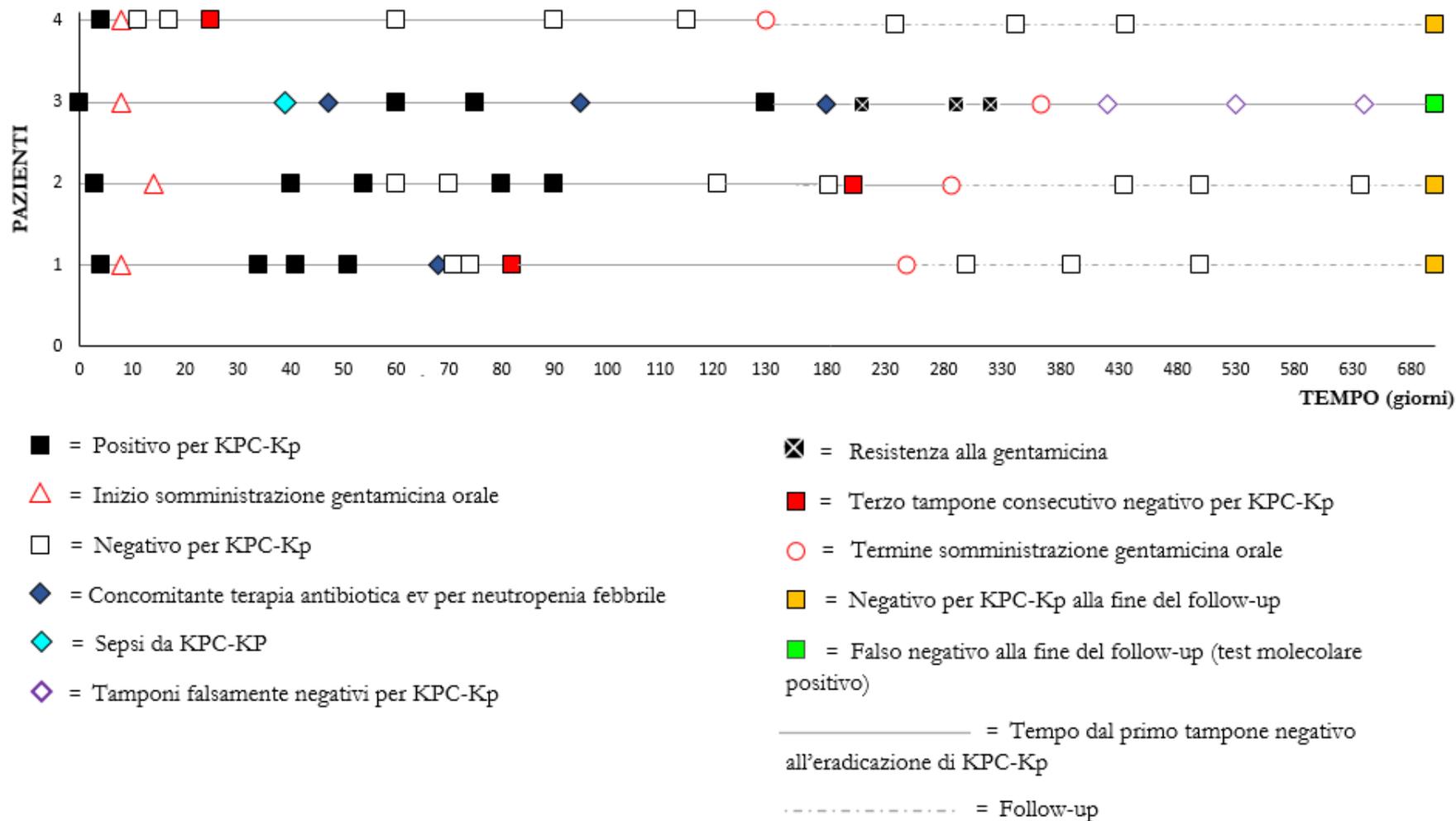


Fig. 5.1 Grafico a dispersione o “line plot” dei quattro pazienti trattati con decontaminazione intestinale selettiva di *K. pneumoniae* carbapenemasi produttrice mediante l’uso di gentamicina orale.

Di seguito sono riportati i risultati ottenuti nel nostro studio:

CFU/g di KPC-Kp. La concentrazione di KPC-Kp nelle feci è stata in media di 3×10^8 CFU/g (range: 1×10^8 - 6×10^8 /g).

Stato di portatore. La durata in media dello stato di portatore è stata di 105 gg (range: 20-200 gg) nei tre pazienti decontaminati.

Somministrazione di gentamicina. La gentamicina orale è stata somministrata a tutti i pazienti per una durata media di 229.25 gg (range: 123-372 gg). La dose media di gentamicina somministrata è stata di 23.75 mg (range: 5-40 mg). I livelli ematici di gentamicina sono stati misurati in tutti e quattro i pazienti ed è stata rilevata una concentrazione plasmatica media di 0.24 mg/L (range: 0.0 e 0.4 mg/L). La gentamicina orale è stata somministrata a questi pazienti con lo scopo di prevenire le ricadute e lo sviluppo di infezioni durante i trattamenti chemioterapici o TCSE a cui successivamente dovevano essere sottoposti.

Profilassi antibiotica. Tutti i pazienti erano stati sottoposti a profilassi antibiotica per neutropenia, due con cotrimossazolo e gli altri due con un chinolonico (ciprofloxacina).

Decontaminazione. Tre pazienti sono stati decontaminati dopo una media di 105 gg (range: 20-200 gg) senza sviluppare batteriemia; mentre in un soggetto, il "Paziente 3" della **Tabella 5.2**, non è stata ottenuta la decontaminazione. Questo soggetto, nel corso di un episodio di neutropenia, verificatosi nell'ottobre 2014, ha sviluppato una severa sepsi causata da un ceppo di KPC-Kp sensibile a gentamicina ed è stato trattato con successo con terapia antibiotica empirica indicata dall'ECIL-4 e definita CTAT (CRKp-Targeted Antibiotic Therapy). Inizialmente è stato impostato un trattamento con meropenem (250 mg x 3/die), colistina (600.000 U x 2), gentamicina (70 mg x 1/die) e rifampicina ev; in seguito, dopo la prima somministrazione, è stata sospesa la rifampicina per la comparsa di tossicità epatica. Per la persistenza della febbre e per la positivizzazione per KPC del tampone faringeo e della emocoltura da CVC, è stata aggiunta allo schema terapeutico la tigeciclina, sospesa poi successivamente per riscontro di iperamilasemia ingravescente; inoltre è stato chiuso il CVC ed è stato usato un accesso venoso periferico. Durante l'episodio febbrile in corso di sepsi da KPC la chemioterapia è stata sospesa per essere poi nuovamente intrapresa in seguito a risoluzione della febbre e della neutropenia.

Il bambino è stato colonizzato inizialmente da un ceppo di KPC-Kp, isolato dalle feci, che con il sequenziamento risultava sensibile alla gentamicina ma successivamente durante il trattamento di decontaminazione è diventato gentamicina resistente. Quello isolato nel campione di sangue durante la sepsi risultava invece gentamicina-sensibile e sequenziandolo era stato visto che apparteneva allo stesso ceppo isolato nelle feci all'inizio del trattamento. In questo paziente si è continuato a somministrare gentamicina orale alla dose di 40 mg x 3 volte/die per una durata totale di 372 gg fintanto che non è stato individuato il ceppo resistente, evento per il quale si è deciso di sospendere la terapia orale e di proseguire la sorveglianza continuando a raccogliere i tamponi rettali. Tali tamponi sono successivamente risultati negativi per KPC-Kp ai test fenotipici, si è pensato quindi che fosse avvenuta la decontaminazione in tale soggetto. I test genotipici di arricchimento, eseguiti a Firenze in un secondo momento, sono però risultati positivi alla ricerca del gene *bla*_{KPC} le metodiche fenotipiche avevano pertanto fornito falsi negativi. In questo paziente non si è risolto lo stato di portatore ma nonostante questo si è deciso di non trattare ulteriormente tale soggetto essendo fuori terapia per remissione di malattia e non avendo in programma ulteriori protocolli di chemioterapia.

Antibiotico-resistenza. Nella **Tabella 5.3** sono rappresentati i dati relativi all'antibiogramma eseguito sul primo campione raccolto in tutti i pazienti. I ceppi KPC-Kp, isolati nel primo tampone rettale di ognuno dei pazienti studiati, sono risultati resistenti ai carbapenemi e sensibili o intermedi alla gentamicina. Dall'osservazione dei successivi antibiogrammi, eseguiti finché non si è ottenuta la decontaminazione intestinale, si è ricavato che in tre dei quattro pazienti i ceppi di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi hanno mantenuto le sensibilità antibiotiche rilevate con il primo antibiogramma senza sviluppare resistenze. Uno dei pazienti ha presentato un ceppo di KPC-Kp con caratteristiche diverse. Il ceppo isolato in questo soggetto, indicato nella **Tabella 5.2** come "Paziente 3", al primo antibiogramma eseguito è risultato resistente oltre che ai carbapenemi anche alla colistina, inoltre ha successivamente sviluppato resistenza anche verso la gentamicina.

ANTIBIOTICO	Paziente 1	Paziente 2	Paziente 3	Paziente 4
Imipenem	>8 (R)	>12 (R)	>8 (R)	>8 (R)
Ertapenem	>1 (R)	/	>1 (R)	>1 (R)
Meropenem	>8 (R)	>32 (R)	>8 (R)	>8 (R)
Colistina	≤1 (S)	0.75 (S)	≤1 (S)	≤1 (S)
Fosfomicina	≤16 (S)	12 (S)	12 (S)	>64 (R)
Gentamicina	4 (I)	0.75 (S)	4 (I)	0.75 (S)
Tigeciclina	2 (I)	0.75 (S)	/	2(I)

Tabella 5.3 MIC ($\mu\text{g/ml}$) verso i principali antibiotici efficaci nel trattamento delle infezioni da KPC-Kp. Antibiogramma del primo campione positivo per ogni paziente.

Complicanze durante il trattamento. Nel periodo di trattamento con gentamicina per os due pazienti, indicati come “Paziente 1 e 3” nella **Tabella 5.2**, hanno sviluppato episodi di neutropenia febbrile e in considerazione dello stato di portatore di KPC è stata impostata terapia antibiotica con meropenem ev, gentamicina ev, colistina ev e proseguita gentamicina per os. Il “Paziente 1” ha inoltre sviluppato episodi di febbre e rinite, che sono stati trattati con successo con somministrazione di cefixima, cefalosporina di terza generazione.

Reazioni avverse. Durante la terapia orale con gentamicina non sono state osservate nefrotossicità, ototossicità né altre reazioni avverse in nessuno dei quattro pazienti studiati; anche il “Paziente 3” al quale il farmaco è stato somministrato per un periodo più lungo (372 gg) non ha manifestato effetti avversi. Non è stato individuato assorbimento gastrointestinale del farmaco, infatti i livelli plasmatici di gentamicina si sono mantenuti sempre in un range di 0-0.4 mg/L.

Follow up. La decontaminazione è stata ottenuta in 3 dei 4 pazienti trattati. A più di un anno di follow-up nessuno dei soggetti inclusi nello studio ha sviluppato infezione da KPC-Kp. Il tasso di decolonizzazione è infatti rimasto stabile durante il periodo di osservazione (mediana: 534.25 range: 345-682 gg). Neppure durante gli episodi di neutropenia febbrile, verificatisi in seguito alla decontaminazione, né durante alcuni episodi di febricola accompagnata a rinite e/o congiuntivite, trattati con cefepime, né in concomitanza dei periodi di immunodepressione indotti dalle chemioterapie e dal trapianto di cellule staminali ematopoietiche si sono avute infezioni da parte di *K. pneumoniae* carbapenemasi produttrice. In particolare uno dei pazienti studiati, il “Paziente 2”, a cui era stata fatta diagnosi di sarcoma istiocitico e con pregressa LLA T+ è stato sottoposto, dopo aver risposto bene al trattamento

di seconda linea con 4 cicli di CHOP-AVP, a TCSE aploidentico da madre donatrice; nonostante tale procedura, che induce un prolungato stato di aplasia e immunodepressione, non si sono avute manifestazioni cliniche di infezione né positivizzazione dei tamponi rettali per KPC-Kp. Successivamente il paziente in questione è andato incontro a progressione di malattia ed è stato sottoposto a diverse strategie chemioterapiche durante le quali non si è osservata comunque alcuna infezione da KPC né ripositivizzazione del tampone anale.

Parallelamente al follow up dei pazienti inclusi nello studio, è continuato lo screening nei soggetti ricoverati e/o ammessi al day hospital di Oncoematologia Pediatrica; è stata effettuata la ricerca microbiologica di KPC-Kp nei campioni ottenuti mediante raccolta di tamponi rettali e perianali in tutti i bambini ammessi al reparto. In questo periodo, ottobre 2015-agosto 2016, non è stato individuato nessun altro bambino positivo per *K. pneumoniae* e non si è più registrata, successivamente all'episodio epidemico dell'ottobre 2014, la trasmissione del germe tra i pazienti né la diffusione nosocomiale di KPC-Kp. Si è ottenuta pertanto la completa eradicazione del germe nell'unità di Oncoematologia Pediatrica di Pisa.

CAPITOLO 6

DISCUSSIONE

L'espansione dei ceppi di KPC-Kp nei centri di Oncoematologia Pediatrica in Italia è ben documentata dai dati disponibili in letteratura che riportano il tasso di infezioni, il quale è passato dallo 0.16/1000 pazienti nel 2012 allo 0.67/1000 nel 2013 (Caselli *et al.*). Sebbene lo studio di Caselli abbia coinvolto un piccolo numero di soggetti, ha documentato un incremento delle infezioni da parte di KPC-Kp di circa quattro volte nei pazienti pediatrici sottoposti a regimi di chemioterapia.⁵³ Il tasso di mortalità nei bambini trovato da Caselli è del 15.9 %, decisamente più basso rispetto a quanto visto nell'adulto con patologie ematologiche maligne, in cui è stata riportata una mortalità del 65% per infezioni da parte di enterobatteri carbapenemasi produttori⁶⁹. Nel nostro studio 1 paziente su 5 è andato incontro ad exitus per sepsi da KPC-Kp; se riportato in percentuale questo dato corrisponde al 20%, valore simile a quello riportato da Caselli e inferiore a quello individuato in una popolazione adulta con patologie ematologiche⁶⁹. Il motivo per cui la mortalità nelle sepsi da KPC sia inferiore nel bambino non è del tutto chiaro, probabilmente i bambini con malattie ematologiche sono colpiti più tardivamente nel corso della malattia rispetto all'adulto e hanno un miglior outcome che potrebbe dipendere dall'assenza di comorbidità nei bambini rispetto ai pazienti adulti e da un miglior livello di attenzione e consapevolezza del problema.

L'esposizione a terapie antibiotiche, soprattutto con fluorochinoloni, precedenti ricoveri ospedalieri e la presenza di devices endovascolari rientrano tra i principali fattori di rischio per colonizzazioni prolungate e successive infezioni da parte di KPC-Kp, condizioni che possiamo individuare in tutti i pazienti inclusi nello studio e nella paziente deceduta per sepsi da KPC. Ognuno dei soggetti infatti aveva avuto un precedente ricovero prima del momento in cui è stata riscontrata la positività per *K.pneumoniae*-KPC; tutti i pazienti hanno ricevuto un trattamento di profilassi con chinolonici, ogni bambino è stato infatti sottoposto a profilassi antibiotica per neutropenia (due con cotrimossazolo e gli altri due con un chinolonico, nello specifico ciprofloxacina) e infine ogni soggetto disponeva di dispositivi endovascolari, tra i quali il CVC tunnellizzato di tipo Groshong. Nei bambini ricoverati presso reparti di ematologia e oncologia, destinati a terapie prolungate, ripetuti prelievi e frequenti trasfusioni di emoderivati vengono posizionati cateteri venosi centrali, nello specifico il CVC di tipo Groshong.

Questo lavoro corrisponde al primo report sulla decontaminazione intestinale dei portatori di KPC-Kp condotto in una popolazione di pazienti pediatriche immunocompromesse. Sebbene il numero dei pazienti sia piccolo, il nostro studio suggerisce l'utilizzo di gentamicina orale per l'eradicazione dello stato di portatore con l'obiettivo di procedere con chemioterapia e trapianto di cellule staminali ematopoietiche in pazienti che non potrebbero altrimenti essere sottoposti a questo tipo di trattamenti. Finora non tutti gli esperti erano concordi nell'eseguire allo-TCSE in questi soggetti, quantomeno negli adulti. In uno studio condotto da Girmenia *et al.*³³ in una popolazione adulta, in cui era stata documentata un'infezione da CRKp prima di essere sottoposti a TCSE, si era registrata una recidiva di infezione nel 45.4% dei pazienti e il 90% di questi era andato incontro ad exitus nonostante un'adeguata terapia antibiotica. Questi risultati drammatici, valutati dal GITMO e da un gruppo di esperti, suggerivano pertanto che una pregressa infezione da parte di KPC-Kp rappresentava una controindicazione al TCSE soprattutto di tipo allogenico e che fosse quindi necessario impostare un programma di prevenzione e management dei pazienti con infezione o colonizzazione da CRKp da sottoporre a TCSE.^{33,47} Nel nostro studio, durante il periodo di follow up, uno dei pazienti è stato sottoposto a trapianto aploidentico da madre donatrice. Immediatamente dopo il trapianto si ha una fase di aplasia della durata di circa un mese, che rende i pazienti suscettibili alle infezioni batteriche e fungine, nonostante questo non sono stati registrati episodi di infezione batterica da parte di *K. pneumoniae* produttrice di carbapenemasi, neppure durante la fase neutropenica post-trapianto. Pertanto per quanto riguarda la popolazione pediatrica, facendo riferimento al nostro singolo caso di trapianto di cellule staminali ematopoietiche, la decontaminazione con gentamicina potrebbe consentire l'uso di questa procedura. Il motivo per cui questo è possibile nei bambini potrebbe risiedere nel fatto che la decontaminazione intestinale risulta più facile perché in questa popolazione di soggetti si ha un differente microbiota rispetto agli adulti.

Durante la decontaminazione con gentamicina abbiamo selezionato un ceppo resistente al farmaco in 1 su 4 dei bambini trattati, che corrisponde al 25%, stessa percentuale trovata nella popolazione di adulti non ematologici sottoposti a SDD nello studio di Tascini, Menichetti *et al.* In questo stesso soggetto è stata riscontrata anche una sepsi da KPC-Kp causata da un ceppo gentamicina-sensibile, il quale al sequenziamento risultava appartenere allo stesso ceppo isolato nel campione di feci all'inizio dello studio. La terapia orale con gentamicina potrebbe favorire l'emergenza di ceppi di KPC-Kp resistenti al farmaco, quindi anche se precedenti studi sulla SDD condotti da Zucherman e Saidel-Oiden non hanno

evidenziato ceppi resistenti, deve essere considerato questo potenziale rischio. Potrebbe essere utile quantificare la quota di KPC-Kp nelle feci, mediante esami colturali quantitativi, con lo scopo di sospendere la terapia orale qualora si noti una persistenza della stessa quantità di KPC-Kp, nonostante il trattamento prolungato con gentamicina, per evitare di selezionare ceppi resistenti; se invece si evidenziasse un trend di riduzione della conta di CFU, questo potrebbe spingere a continuare la terapia orale con gentamicina al fine di raggiungere la decontaminazione.

In questi pazienti fragili, la decontaminazione può essere confermata con il metodo molecolare. Nei centri dove questo metodo non è disponibile suggeriamo di confermare i risultati negativi al fine di essere sicuri di una reale negatività del test.

La mancanza di attività sistemica della gentamicina orale, tutti i pazienti hanno mantenuto livelli plasmatici compresi tra 0.0 e 0.4 mg/L, dimostra come il farmaco sia associato ad un buon profilo di sicurezza; non è stato evidenziato infatti alcun effetto avverso (né nefrotossicità, né ototossicità, né altra reazione avversa) neppure nei pazienti in cui la somministrazione del farmaco ha avuto una durata maggiore (272 e 372 gg).

I limiti del nostro studio sono rappresentati dalla mancanza di un gruppo di controllo e dall'esiguo numero di pazienti studiati. Considerando la piccola coorte di pazienti è necessario sottolineare la mancanza di potere statistico e l'impossibilità di determinare l'esatta efficacia del trattamento orale con gentamicina volta ad ottenere l'eradicazione dello stato di portatore di KPC-Kp e la cessazione della diffusione nosocomiale. Nonostante questo i risultati sono comunque positivi e suggeriscono tra le prospettive future di continuare a studiare questo tipo di strategia di decontaminazione.

CAPITOLO 7

CONCLUSIONI

Le infezioni da KPC-Kp rappresentano un importante e crescente problema nelle unità di terapia intensiva; la decontaminazione potrebbe essere una via per la riduzione della mortalità post infezione e per il miglioramento della prognosi dei bambini portatori del batterio MDR. La raccolta e l'analisi dei dati riguardanti il trattamento di SDD e il follow up per un intervallo lungo di tempo ha permesso di comprendere che, in caso di sviluppo di un'epidemia di KPC-Kp nelle unità di Oncoematologia Pediatrica, i clinici possono considerare l'uso della gentamicina orale, la cui efficacia può essere valutata attraverso la quota di CFU nelle feci, nell'ordine di ridurre la diffusione di tale germe e con l'obiettivo di consentire a questi pazienti di essere sottoposti a terapie intensive come la chemioterapia ed eventualmente il TCSE. Tale studio ha permesso anche di ottenere un vantaggio nella gestione dei pazienti contaminati da parte del personale sanitario, che ha avuto modo di adottare in maniera più efficace misure di isolamento e di mettere in atto precauzioni da contatto. Una volta ottenuta la decontaminazione inoltre risulta possibile spostare i pazienti dalle stanze di isolamento, ottenendo un miglioramento sia della qualità di vita del bambino, sia dell'organizzazione del reparto data la possibilità mettere a disposizione le stanze per altri pazienti.

La nostra esperienza, che corrisponde al primo report condotto su un gruppo di pazienti pediatrici ematologici sottoposti a chemioterapie e a TCSE, dimostra che la decontaminazione intestinale selettiva di KPC-Kp con gentamicina orale è un trattamento sicuro e possibilmente efficace. I risultati promettenti in tale popolazione di pazienti ad alto rischio di immunocompromissione, potrebbero pertanto suggerire di continuare a studiare in futuro tale strategia di SDD mediante studi prospettivi, randomizzati in larga scala per valutare la possibilità di utilizzare questo approccio con lo scopo di ridurre il rischio di severe infezioni da parte di *K. pneumoniae* carbapenemasi produttrice.

BIBLIOGRAFIA

1. WHO. The European health report 2009: health and health systems. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, 2009.
2. ISTAT. Cause di Morte, periodo di riferimento 2008. Available at: <http://www.istat.it/it/archivio/24446>.
3. AIRTUM Working Group, CCM, Group. AW. Italian cancer figures, report 2012: Cancer in children and adolescents. *Epidemiol Prev* 2013; **37**(1 Suppl 1): 1-296.
4. Ferrari A, A B. Participation of adolescents with cancer in clinical trials. *Cancer Treat Rev* 2007; **33**(7): 603-8.
5. Ulu-Kilic A1, Alp E, Percin D, et al. Risk factors for carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae rectal colonization in pediatric units. *J Infect Dev Ctries* 2014; **8**(10): 1361-4.
6. Podschun R, U. U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews* 1998; **11**: 589.
7. Bennett J E DR, Blaser M J-. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 2014; **2**: 240.
8. Moroni, Esposito, Antinori. Malattie Infettive. In: Masson E-, editor.; 2014.
9. <http://www.uptodate.com/contents/clinical-features-diagnosis-and-treatment-of-klebsiella-pneumoniae-infection/abstract/>.
10. Tu YC, Lu MC, Chiang MK, et al. Genetic requirements for Klebsiella pneumoniae-induced liver abscess in an oral infection model. *Infection and immunity* 2009; **77**(7): 2657-71.
11. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, al. e. Predictors of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. . *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**: 1028.
12. Herbert S, Halvorsen DS, Leong T, al. e. Large outbreak of infection and colonization with gram-negative pathogens carrying the metallo- beta -lactamase gene blaIMP-4 at a 320-bed tertiary hospital in Australia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; **28**: 98.
13. Hirsch EB, VH T. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**(6): 1119-25.
14. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, et al. Evaluation of methods to identify the Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2007; **45**(8): 2723-5.

15. Asensio A, Oliver A, González-Diego P, et al. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2000; **30**: 55.
16. Papadimitiou-Olivgeris M, Marangos M, et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; **77**(2): 169-73.
17. Tumbarello M, Trecarichi EM, Tumietto F, et al. Predictive models for identification of hospitalized patients harboring KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014; **58**(6): 3514-20.
18. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection*; **18**(5): 432-8.
19. Queenan AM, K B. Carbapenemases: the versatile b-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 2007; **20**: 440-58.
20. Kitchel B RJ, Patel JB, Srinivasan A, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**(8): 3365-70.
21. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, et al. Treatment Outcome of Bacteremia Due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**(4): 2018-13.
22. Zarkotoua O, Pournarasb S, Tseliotic P, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. 2011; **17**(12): 1798-803.
23. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2012; **55**: 943-50.
24. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001; **45**(4): 1151-61.
25. Munoz-Price LS PL, Bonomo RA, et al. . Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**(9): 785-96.

26. Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 258 Producing KPC-3 Carbapenemase. *Journal of clinical microbiology* 2009; **47**: 3793–94.
27. Fontana C, Favaro M, Sarmati L, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *BMC Res Notes* 2010; **3**: 40.
28. SN Richter, Frasson I, Franchin E et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009–December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog* 2012; **4**(1): 7.
29. Mazzariol A, Lo Cascio G, Ballarini P, et al. Rapid molecular technique analysis of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in an Italian surgery unit. *J Chemother* 2012; **24**(2): 93-6.
30. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill* 2012; **17**(33).
31. EuropeanCenter for Disease prevention and Control Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014 http://ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/arhai/Pages/annual-antimicrobial-resistance-surveillance-report.aspx. 2015 (accessed 12/05 2016).
32. Forni S, D'Arienzo S, Donzellini M, et al. L'utilizzo di antibiotici e l'antibiotico-resistenza in Toscana. Secondo report della Rete di Sorveglianza dell'Antibiotico Resistenza in Toscana (SART), 2015.
33. Girmenia C RG, Piciocchi A, Bertaina A, Pisapia G, Pastore D, Sica S, Severino A, Cudillo L, Ciceri F, Scimè R, Lombardini L, Viscoli C, Rambaldi A; Gruppo Italiano Trapianto Midollo Osseo (GITMO). Infections by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in SCT recipients: a nationwide retrospective survey from Italy. *Bone Marrow Transplant* 2015; **50**: 282-88.
34. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; **18**(5): 432-8.
35. Asthana S, Mathur P, V T. Detection of Carbapenemase Production in Gram-negative Bacteria. *J Lab Physicians* 2014; **6**(2): 69-75.
36. Tascini C, B V. L'uso dei farmaci antimicrobici in terapia intesiva. Dal laboratorio alla clinica. 2013.

37. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. <http://www.eucast.org>.
38. Tascini C, B V. L'uso dei farmaci antimicrobici in terapia intensiva. Lettura ragionata dell'antibiogramma. 2015.
39. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010; **15**(46).
40. Nordmann P PL. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrobial Chemother* 2013; **68**: 487-89.
41. Pournaras S, Poulou A, al. TAe. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**: 1319-21.
42. Burckhardt I, S. Z. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *Journal of clinical microbiology* 2011; **49**(9): 3321-4.
43. bioMérieux Corporate , bioMérieux Industry, Diagnostics bC. http://www.biomerieux.it/servlet/srt/bio/italy/dynPage?open=ITL_CLN_PRD&doc=ITL_CLN_PRD_G_PRD_CLN_3&pubparams.sform=1.
44. Nordmann P, Poirel L, L D. Rapid detection of carbapenemaseproducing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2012; **18**: 1503-7.
45. Chen L MJ, Endimiani A. et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of Klebsiella pneumoniae carbapenemase gene (blaKPC) variants. *J Clinical Microbiology* 2011; **2**: 579-85.
46. Zuckerman T BN, Sprecher H, Fineman R, Finkelstein R, Rowe J M and Oren I. SCT in patients with carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae: a single center experience with oral gentamicin for the eradication of carrier state. *Bone Marrow Transplantation* 2011; **46**: 1226-30.
47. Girmenia C, Viscoli C, Piciocchi A, et al. Management of carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae infections in stem cell transplant recipients: an Italian multidisciplinary consensus statement. *Haematologica* 2015; **100**(9): 373-6.
48. B.D. Debby, O. Ganor, M. Yasmin ea. Epidemiology of carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae colonization in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**(8): 1811-17.

49. Akturk H, Sutcu M, Somer A, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in pediatric and neonatal intensive care units: risk factors for progression to infection. *Braz J Infect Dis* 2015; **20**(2): 134–40.
50. Maltezou HC , Kontopidou F, Katerelos P, Daikos G, Roilides E, M T. Infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative pathogens in hospitalized children. *The Pediatric infectious disease journal* 2013; **32**(4): e151-4.
51. Caselli D, Cesaro S, Ziino O, Zanazzo G, Manicone R, Livadiotti S ea. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in children undergoing chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2010; **95**: 1612-15.
52. Mikulska M, Viscoli C, C. O. Aetiology and resistance in bacteraemias among adult and paediatric haematology and cancer patients. *J Infect* 2014; **68**: 321-31.
53. Caselli D, Cesaro S, Fagioli F, et al. Incidence of colonization and bloodstream infection with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in children receiving antineoplastic chemotherapy in Italy. *Infectious Diseases* 2016; **48**(2): 152-5.
54. Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2012; **74**(3): 213-23.
55. Elemam A, Rahimian J, M D. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology* 2010; **48**(10): 3558-62.
56. Averbuch D, Cordonnier C, Livermore DM, Mikulska M, Orasch C, al. VCe. Targeted therapy against multi-resistant bacteria in leukemic and hematopoietic stem cell transplant recipients: guidelines of the 4th European Conference on Infections in Leukemia (ECIL-4, 2011) *Haematologica* 2013; **98**: 1836-47.
57. Borer A, Saidel-Odes L, Eskira S, et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant K pneumoniae. *Am J Infect Control* 2012; **40**: 421-5.
58. Schechner V, Kotlovsky T, Kazma M, et al. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to become clinically infected? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2013; **19**: 451-6.
59. Tascini C, Sbrana F, Flammini S, et al. Oral Gentamicin Gut Decontamination for Prevention of KPCProducing *Klebsiella pneumoniae* Infections: Relevance of Concomitant Systemic Antibiotic Therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014; **58**(4): 1972-6.

60. Munoz-Price LS, JP Q. Deconstructing the infection control bundles for the containment of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Infect Dis* 2013; **26**: 378-87.
61. Buehlmann M, Bruderer T, Frei R, AF W. Effectiveness of a new decolonisation regimen for eradication of extended-spectrum-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Hosp Infect* 2011; **73**(113-7).
62. Katzung B.G., Masters S.B., A.J. T. Farmacologia generale e clinica. Piccin Nuova Libreria; 2011. p. 869-75.
63. Oren I, Sprecher H, Finkelstein R, et al. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: A prospective controlled trial. *Am J Infect Control* 2013; **41**(12): 1167-72.
64. Saidel-Odes L, Polachek H, Peled N, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of Selective Digestive Decontamination Using Oral Gentamicin and Oral Polymyxin E for Eradication of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carriage. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2012; **33**(01): 14-9.
65. Lübbert C, Faucheux S, Becker-Rux D, et al. Rapid emergence of secondary resistance to gentamicin and colistin following selective digestive decontamination in patients with KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: a single-centre experience. *International journal of antimicrobial agents* 2013; **42**(6): 565-70.
66. Bar-Yoseph H, Hussein K, Braun E, Paul M. Natural history and decolonization strategies for ESBL/carbapenem-resistant Enterobacteriaceae carriage: systematic review and meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016.
67. Giani T, Tascini C, Arena F, et al. Rapid detection of intestinal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase during an outbreak. *J Hosp Infect* 2012; **81**(2): 119-22.
68. European Committee on Antimicrobial Susceptibility. Testing Clinical breakpoints http://www.eucast.org/clinical_breakpoints. 2013.
69. Satlin MJ, Jenkins SG, Walsh TJ. The global challenge of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in transplant recipients and patients with hematologic malignancies. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2014; **58**(9): 1274-83.

