



Indicazioni sulle misure di prevenzione e controllo delle infezioni da “Enterobatteri produttori di *carbapenemasi*” (CPE) per le Aziende Sanitarie ed Ospedaliere della Campania

1. Premessa

La crescente diffusione degli Enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE=*Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae*) e, in particolare, di quelli che esplicano tali resistenze attraverso l'azione delle “*carbapenemasi*”, ovvero di particolari β -lattamasi attive sui carbapenemi (CPE=*Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae*), viene attualmente considerato dalle Organizzazioni sanitarie internazionali come un problema di sanità pubblica particolarmente preoccupante.

In alcune Aree critiche ospedaliere l'incremento delle infezioni da CPE ha rappresentato uno dei più rilevanti problemi assistenziali emersi nell'ultimo quinquennio, assumendo in generale proporzioni allarmanti, sia su scala mondiale che europea: il fenomeno sinora ha riguardato in maniera più evidente alcuni Paesi, quali ad esempio Stati Uniti, Colombia, India, Pakistan, Israele, Cipro, Grecia, e la stessa l'Italia.

A tale fenomeno vengono associate implicazioni di notevole rilevanza clinica: infatti, nelle Aree assistenziali maggiormente interessate dalle infezioni da CPE si registrano: un incremento degli insuccessi terapeutici, una più elevata onerosità delle cure specifiche e l'incremento della mortalità attribuibile a tali forme. Inoltre, sono in aumento i casi in cui i ceppi di CPE, specialmente *K. pneumoniae*, esprimono resistenze combinate anche ad altri antibiotici non β -lattamici, il che rende ancor più problematico l'approccio terapeutico

I rapporti sulle antibiotico resistenze divulgati negli ultimi due anni dal ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*, frutto della sorveglianza realizzata dal network europeo EARSS-net, riferiscono dell'incremento della *prevalenza di CPE ottenuti da isolati clinici invasivi*, fenomeno registrato in modo più evidente in alcuni Paesi europei, tra cui l'Italia. Tale andamento preoccupante, secondo le stesse istituzioni internazionali, è associato all'incremento dei portatori ed all'efficace meccanismo di trasferimento genico mediante il quale i *determinanti plasmidici* di resistenza dei CPE vengono trasferiti all'interno della stessa specie e/o tra specie diverse.

In merito ai meccanismi di resistenza degli Enterobatteri ai Carbapenemi, gli enzimi più frequentemente coinvolti sono le *serino-betalattamasi* di classe A, quali KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemasi*) e le *metallo-betalattamasi* di classe B, quali VIM (*Verona integron-encoded metallo-betalattamasi*), NDM (*New Delhi metallo-betalattamasi*) e IMP (*Imipenemasi*). Inoltre, in diversi Paesi europei sono stati segnalati *outbreak* ospedalieri sostenuti da ceppi di *K.pneumoniae* che esprimono una combinazione di enzimi di classe D ad attività *oxacillinasica*, quali OXA-48 (responsabile anche di ridotta suscettibilità ai Carbapenemi) con *beta-lattamasi* del tipo CTX-M15, risultandone un fenotipo multi resistente (EARSS-net 2011).

La stessa rete europea EARSS-net nel 2011 ha rilevato i saggi di antibiotico sensibilità ai Carbapenemi effettuati su 14.594 isolati invasivi (da sangue e liquor) di *K.pneumoniae*, dei quali 1.323 (9,1%) sono risultati resistenti. La maggior parte degli isolati resistenti - 1.115 isolati, pari al 84,3% - sono stati riportati dalla Grecia (prevalenza 68,2%), seguita dall'Italia (164 isolati, prevalenza pari a 26,7%) e da

Cipro (13 isolati, prevalenza del 15,7%). Il *trend* del periodo 2008-2011 risulta significativamente in incremento in alcuni Paesi (Grecia, Ungheria e Italia).

Il dato delle resistenze ai *Carbapenemi* registrato in Campania dalla rete SI.RE.AR. nel 2011 ha assunto proporzioni particolarmente preoccupanti, risultando considerevolmente più elevato rispetto ai tassi italiani ed ancor più rispetto a quelli europei, come mostrato nella Tabella 1: il 44,4% dei 216 isolati invasivi di *K.pneumoniae* rilevati dalla rete *Si.Re.Ar.* è risultato resistente ai Carbapenemi, con un incremento rispetto al 2010 del 17,9% per Imipenem, e del 15,7% per Meropenem; entrambe gli incrementi sono statisticamente significativi.

La rete SI.RE.AR. continua a monitorare il fenomeno, nell'ambito del Sistema Regionale di Sorveglianza Regionale delle antibiotico resistenze.

Tabella 1. Confronto 2010-11 della resistenza ai Carbapenemi negli isolati invasivi di *K.pneumoniae* rilevati in Campania.

Antibiotico	2010			2011			Variazione 2010-2011
	n° isolati	% Resistenti	95% C.I.	n° isolati	% Resistenti	95% C.I.	
<i>Imipenem</i>	154	24,7	18.3-32.4	195	42,6	35.6-49.9	+17,9% (8,2 - 27,6)
<i>Meropenem</i>	150	28,7	21.8-36.7	196	44,4	37.4-51.7	+15,7% (5,7 - 25,7)

Al momento, la maggior parte dei casi di infezioni da CPE è sostenuto da ceppi di *K. pneumoniae*; tuttavia in diverse aree geografiche, sia europee che non, sono state isolate altre *Enterobacteriaceae*, specialmente *E. coli*, che manifestano la capacità di esprimere resistenza ai *carbapenemi*, spesso combinata anche ad altri antimicrobici. L'ampliamento della circolazione inter-specie della resistenza ai *carbapenemi* all'interno delle *Enterobacteriaceae* resta per il momento caratterizzato da un andamento relativamente sporadico, ma desta comunque preoccupazione per sue le possibili evoluzioni.

A tale riguardo l'ECDC ha pubblicato nel 2011 un documento di valutazione del rischio (*Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae - CPE*) nel quale vengono indicate le misure di controllo ritenute più efficaci per il contenimento della diffusione di CPE. Queste misure riguardano le precauzioni da contatto nelle pratiche assistenziali, la tempestiva identificazione dei pazienti infetti, l'isolamento dei pazienti colonizzati/infetti, la sorveglianza attiva dei colonizzati mediante screening dei contatti, ecc.

In Italia tali misure sono state recepite negli ultimi anni da diverse istituzioni sanitarie regionali, con diverse modalità ed in diversa misura, a seconda dei casi. Inoltre, nel febbraio 2013 il Ministero della Salute ha emanato una Circolare (n. 0004968 del 26/02/2013) che ha per oggetto la "Sorveglianza ed il controllo delle infezioni da batteri produttori di carbapenemasi – CPE". Quest'ultima circolare, oltre ad indicare alcune delle predette misure di controllo del fenomeno CPE, istituisce un Sistema di Sorveglianza Nazionale che riguarda la segnalazione delle *batteriemie* da *K. Pneumoniae* ed *E. coli* produttori di carbapenemasi.

L'obiettivo di questo documento è quello di fornire indicazioni utili all'applicazione di efficaci misure di controllo della diffusione delle CPE nell'ambito delle Strutture ospedaliere operanti in Campania, e di descrivere le modalità con cui le Aziende Sanitarie ed Ospedaliere della Campania dovranno aderire alla sorveglianza nazionale delle infezioni invasive da Enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE).

2. Sorveglianza nazionale delle infezioni invasive da Enterobatteri produttori di *carbapenemasi* (CPE)

La Regione Campania, nel recepire la predetta CMS 4968, aderisce alla Sorveglianza nazionale delle batteriemi da *Klebsiella pneumoniae* e da *Escherichia coli* produttori di *carbapenemasi*.

Pertanto, ciascuna Azienda Sanitaria ed Ospedaliera della Campania dovrà attivare un flusso dati, specificamente dedicato ai casi definiti nella sezione successiva, indipendentemente dall'eventuale propria partecipazione al Sistema Regionale di Sorveglianza delle Antibiotico resistenze – SI.RE.AR. – in quanto le due rilevazioni fanno riferimento a *definizioni di caso* diverse; inoltre esse si avvalgono di modalità differenti ed indipendenti di raccolta dei dati e di segnalazione dei casi.

2.1 Definizione di caso

I casi indicati dalla CMS 4968 sono rappresentati dai pazienti “con una o più *emocolture positive* per *Klebsiella pneumoniae* o per *Escherichia coli*”, nei quali gli stessi microrganismi isolati presentino una o entrambe le seguenti caratteristiche”:

- Non sensibilità ad *imipenem* o *meropenem*.
- Produzione di *carbapenemasi* rilevata fenotipicamente o genotipicamente.

Dal momento che dal 2012 la Regione Campania ha introdotto l'adozione dei criteri interpretativi EUCAST per i test di sensibilità agli antimicrobici, gli stessi Enterobatteri vengono attualmente considerati clinicamente sensibili a *Imipenem* se la MIC (concentrazione minima inibente) è ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ (quando il trattamento consiste nella dose standard raccomandata nell'adulto di 500 mg e.v. quattro volte al giorno).

D'altro canto, per quanto riguarda la produzione di *carbapenemasi*, EUCAST chiarisce che “*con questi breakpoints, alcuni ceppi produttori di carbapenemasi sono classificati come sensibili e dovrebbero essere riportati come tali, ovvero la presenza o l'assenza di una carbapenemasi non influenza di per sé la categorizzazione di sensibilità*”.

Per gli aspetti operativi, la CMS 4968 raccomanda l'adozione, da parte dei Laboratori di Microbiologia, delle indicazioni fornite dal Comitato di Studio degli Antimicrobici dell'AMCLI (CoSA), nelle quali si raccomanda di sottoporre a conferma fenotipica i ceppi di enterobatteri che abbiano una MIC $\geq 0,5$ $\mu\text{g/ml}$ per *Meropenem* (CoSA-AMCLI 2012).

Pertanto, nel merito degli aspetti operativi inerenti l'applicazione della CMS 4968, la produzione di *carbapenemasi* non necessariamente comporta una *non sensibilità ad i carbapenemi* evidenziata dal referto microbiologico. Di conseguenza, rifacendosi ai documenti di riferimento sopra citati, i ceppi di *K. pneumoniae* isolati da emocolture, se presentano una ridotta sensibilità al *meropenem* (MIC ≥ 0.5 mg/l o diametro dell'*alone di inibizione* ≤ 25 mm), andranno sottoposti a conferma fenotipica per la produzione di carbapenemasi, indipendentemente dalla interpretazione della sensibilità clinica alla stessa molecola, valutata con i *breakpoints* EUCAST.

In merito alle indicazioni riguardanti le metodologie di screening e di conferma fenotipica della produzione di *carbapenemasi*, nonché per le eventuali misure organizzative necessarie alla operatività dei Laboratori di Microbiologia nella loro esecuzione, si rimanda alle seguenti sezioni dedicate.

2.2 Modalità di raccolta e trasmissione dei dati

Lo strumento per la raccolta dei dati da avviare al flusso è la *Scheda di sorveglianza* allegata alla *CMS 4968*, che viene integralmente adottata in ogni sua parte per l'utilizzo da parte degli Ospedali e dalle Strutture sanitarie operanti in Campania. I dati raccolti attraverso il predetto strumento vanno avviati al flusso applicando le seguenti modalità:

1. Il referente del **Laboratorio** nel quale venga accertato il caso definito come sopra, invierà **entro 48 ore** la Scheda di segnalazione, compilata nelle parti A e B nei campi di competenza, alla Direzione Sanitaria del Presidio e/o dell'Azienda ospedaliera, la quale ne completerà la compilazione.
2. La **Direzione Sanitaria** del Presidio e/o dell'Azienda ospedaliera invierà le parti A e B della scheda di sorveglianza **entro 48 ore** al Servizio Epidemiologia della ASL competente per territorio.
3. La **ASL competente** invierà **entro 7 giorni** la parte B della scheda di sorveglianza all'Osservatorio Epidemiologico della Regione Campania (oer@regione.campania.it), alla Direzione Generale del Ministero della Salute (Ufficio 05, Malattie Infettive e Profilassi Internazionale – malinf@sanita.it) ed all'Istituto Superiore di sanità (CNESPS e DMIPI – sorveglianza.kpc@iss.it).

3. Misure di sorveglianza e controllo della diffusione di CPE

3.1 Sorveglianza attiva delle colonizzazioni

In questa fase l'ECDC raccomanda fortemente di intensificare le misure di sorveglianza, dedicando particolare attenzione allo screening per identificare lo stato di *portatore di CPE*,

Infatti, l'entità della diffusione dei CPE, sia in ambito ospedaliero che territoriale, non è attualmente nota in molte realtà regionali italiane, oltre che in molti Paesi membri UE. Ciò rende necessaria una migliore definizione del quadro epidemiologico sulla circolazione dei CPE in ciascun ambito nazionale e regionale, rispetto al quale sono state osservate differenze anche sostanziali tra i diversi territori, i quali risentono in maniera differente dell'influenza di quei fattori socio-demografici (flussi migratori, contiguità geografica, ecc.) che hanno sin qui determinato la variegata circolazione dei CPE.

La definizione di un più aggiornato quadro epidemiologico - sia locale che generale - potrà consentire la successiva modulazione delle risposte che i singoli Sistemi Sanitari, nazionali e regionali, dovranno attivare nel tempo.

Attualmente, riferendosi alle raccomandazioni europee ed alla *CMS 4968*, è possibile adottare le seguenti indicazioni:

- 1) Nelle Strutture di ricovero nelle quali venga accertato tra i pazienti uno o più casi di infezione o colonizzazione da CPE, è raccomandata l'attivazione di un *piano di sorveglianza attiva* che accerti lo stato di portatore eventualmente instauratosi nei *contatti* dei casi indice o secondari. La sorveglianza attiva delle colonizzazioni proposta dalla *CMS 4968* prevede che sui contatti si eseguano i test di screening mediante tampone rettale - una o due volte la settimana in ciascun soggetto - avvalendosi dei metodi microbiologici descritti nella sezione dedicata:
 - la *CMS 4968* identifica come possibili contatti *tutti i pazienti assistiti dalla stessa equipe di un paziente colonizzato o infetto*, suggerendo tuttavia di adattare il piano di sorveglianza alla frequenza di isolamento di CPE ed alle singole realtà Strutturali/Organizzative;
 - nella *CMS 4968* viene raccomandata l'esecuzione dello screening al momento del ricovero nel caso di pazienti che nel corso di precedenti ricoveri siano già risultati colonizzati/infetti da CPE;
 - la *CMS 4968*, inoltre, raccomanda che siano sottoposti a screening specifico anche i pazienti provenienti da particolari aree geografiche interessate da una diffusione endemica di CPE (es. Grecia, Cipro, India, Pakistan, Colombia, Israele, Stati Uniti d'America);

- il piano di sorveglianza deve prevedere il protrarsi dello screening dei contatti fino a quando nel reparto interessato dalle infezioni/colonizzazioni non venga ragionevolmente accertata l'interruzione della trasmissione. A tale scopo possono essere adottati due criteri: assenza di nuovi casi positivi per CPE per un periodo adeguato - preferibilmente 3 settimane - e, contestualmente, isolamento di tutti i casi ricoverati nel reparto durante le ultime 3 settimane;
 - è necessario intensificare le misure di precauzione da contatto - descritte successivamente - per ciascun paziente colonizzato/infetto, almeno fino a quando non si dimostri una negativizzazione persistente (tamponi rettali negativi per 3 settimane);
 - in caso di negativizzazione sarebbe teoricamente possibile sospendere le precauzioni da contatto, sebbene in tal caso sia comunque opportuno proseguire la sorveglianza microbiologica del paziente per l'intera durata del ricovero, al fine di poter prontamente ripristinare tali precauzioni in presenza di una nuova positività del tampone rettale;
 - sul piano pratico, tuttavia, dal momento che la negativizzazione in corso di ricovero è un evento poco frequente, nel paziente risultato colonizzato/infetto è possibile interrompere lo screening dopo due tamponi positivi consecutivi, mantenendo le precauzioni da contatto per tutta la durata del ricovero indipendentemente dallo screening. Il tampone rettale può eventualmente essere ripetuto prima della dimissione, in tempo utile per conoscere l'eventuale positività del paziente dimesso, al quale tale informazione è dovuta, e poter adottare anche a livello del territorio le misure per il controllo della trasmissione.
- 2) La *CMS 4968* suggerisce di sottoporre a screening al momento del ricovero, *"ove ciò sia fattibile"*, anche i pazienti:
- provenienti (o ricoverati negli ultimi tre mesi) presso altri Ospedali e/o Strutture di ricovero territoriali per anziani;
 - provenienti o trasferiti in reparti nei quali il rischio di Infezioni associate all'assistenza sia più elevato (Terapia intensiva, Oncologia, Ematologia, Neuro-riabilitazione/Unità spinale e Chirurgia dei trapianti).

L'implementazione di queste ultime misure estensive deve intendersi raccomandata con maggior forza in caso di eventi epidemici non risolti. Inoltre, in quest'ultima eventualità, è possibile valutare anche l'opportunità di eseguire gli screening sullo staff assistenziale.

3.2 Controllo della trasmissione in ambito ospedaliero

La *CMS 4968*, richiamando le raccomandazioni contenute nel predetto documento di valutazione del rischio dell'ECDC, definisce alcuni interventi da attuare nei casi di infezione o colonizzazione da CPE. L'applicazione delle misure di tipo assistenziale, brevemente elencate di seguito, in alcuni casi presuppone interventi di carattere organizzativo che possono migliorarne l'implementazione.

Indicazioni riguardanti le misure di carattere assistenziale

Le seguenti precauzioni da contatto nell'assistenza dei pazienti portatori di CPE, previste dalla Circolare ministeriale, richiamano a loro volta quelle indicate dal succitato Documento ECDC:

- incrementare le misure di igiene delle mani prima e dopo il contatto con pazienti portatori di CPE;
- privilegiare l'uso di materiali monouso (guanti, sovra camice, ecc.); è raccomandato anche l'utilizzo di padelle e pappagalli monouso, che in alternativa devono essere disinfettati dopo l'uso;
- utilizzare strumentario medico dedicato: fonendoscopio, bracciale sfigmomanometro (o utilizzo di copri-manicotto), glucometro, ossimetro, lacci emostatici, ecc.;
- ridefinire in maniera standardizzata le procedure di *reprocessing* degli strumenti coinvolti nell'endoscopia digestiva e respiratoria, nonché nella dialisi;

- in Aree assistenziali a più elevato rischio, quali Terapie intensive, ecc., prevedere misure supplementari per l’igiene dei pazienti (esempio: per il lavaggio del paziente su cute integra al di sotto della mandibola utilizzo di clorexidina al 2%);
- richiedere una maggiore frequenza dell’igiene ambientale, con utilizzo di disinfettanti appropriati;
- richiedere la più stretta osservanza delle misure per la prevenzione delle infezioni associate a *devices* (intubazione, cateterizzazione urinaria, utilizzo di dispositivi intravascolari), comprendendo in tali misure l’attenta valutazione della reale necessità di permanenza degli stessi dispositivi;
- Il trattamento antibiotico ha un importante ruolo nel favorire la colonizzazione da parte di germi multi resistenti (MDR) in generale, e di CPE in particolare. Inoltre, operando una forte pressione selettiva, il trattamento antibiotico incrementa la carica di MDR e/o CPE nel soggetto colonizzato, aumentando anche la probabilità di trasmissione ad altri soggetti. Occorre, pertanto **scoraggiare il più possibile l’uso inappropriato di antibiotici.**

Interventi organizzativi per migliorare l’attuazione dell’isolamento dei casi

- al fine di poter garantire l’isolamento dei pazienti colonizzati o infetti, è auspicabile che presso le Direzioni di ciascuna Struttura ospedaliera venga tenuta costantemente aggiornata la disponibilità delle stanze singole, o adattabili a stanza singola, richiamando le diverse Unità Operative ad una forte collaborazione per il migliore utilizzo dei locali da adibire all’isolamento;
- nel caso di indisponibilità di stanze singole, è opportuno prevedere l’utilizzo di spazi delimitati nei quali sia possibile garantire l’isolamento attraverso stringenti precauzioni da contatto, o adottare l’isolamento in coorte, prevedendo in ogni caso l’utilizzo di bagni dedicati ed intensificando le attività di pulizia/decontaminazione;

Interventi organizzativi per migliorare la corretta gestione assistenziale

- la *CMS 4968*, richiamando le indicazioni del predetto documento di valutazione del rischio del ECDC, pone l’attenzione sulla opportunità di garantire l’assistenza del paziente colonizzato o infetto da parte di personale dedicato. Sebbene tale opzione resti prioritaria, in caso di oggettivo impedimento alla sua realizzazione è necessario garantire la massima adesione alle precauzioni da contatto da parte di tutti i soggetti (personale, visitatori, ecc.) che possano interagire con il paziente colonizzato/infetto. A tal fine, è opportuno responsabilizzare un componente dell’equipe assistenziale sulla costante verifica dell’applicazione delle misure di precauzione, attraverso un sistema di controllo adeguatamente documentato (es.: istruzioni operative, *check list*, ecc.);
- Le Direzioni Generali dovranno assicurare alle Direzioni Mediche di Presidio (DMPO) adeguate risorse che consentano l’intensificazione degli interventi di pulizia/sanificazione. Le stesse DMPO devono fornire indicazioni operative al personale addetto alle pulizie che opera nelle Aree assistenziali interessate dai casi;
- Le DMPO dovranno mettere in atto azioni di formazione/audit sull’uso appropriato dei *device* invasivi e degli antibiotici. In questo ambito di interventi, le DMPO, oltre a curare i percorsi formativi per il corretto uso dei *device*, dovranno intensificare le azioni interne di monitoraggio sull’uso degli antibiotici e favorire le corrette politiche prescrittive, anche attraverso il coinvolgimento delle Farmacie Ospedaliere, che contribuiranno alla realizzazione dei percorsi di autovalutazione e di *benchmarking*.

Interventi organizzativi per migliorare le strategie di comunicazione

- Una adeguata collocazione del paziente colonizzato/infetto e la sua corretta gestione assistenziale richiedono, da parte delle DMPO, la definizione e l’attuazione di protocolli di comunicazione sulla gestione dei ricoveri e l’integrazione della documentazione sanitaria;

- una efficace comunicazione deve riguardare non soltanto il personale interno alla Unità Operativa specificamente dedicato alle attività assistenziali, ma anche gli addetti ai servizi accessori (trasporto, diagnostica, vitto, pulizia, ecc.);
- deve essere attuato un programma di formazione specifica sulle misure di prevenzione e controllo della diffusione di CPE, esteso a tutto il Personale coinvolto;
- sia il ricovero che i trasferimenti (intra- ed extra-ospedalieri) del portatore di CPE devono avvenire garantendo la comunicazione diretta agli operatori delle strutture riceventi, mentre la documentazione sanitaria del paziente colonizzato/infetto da CPE, ricoverato o trasferito, dovrà evidenziare in maniera ben visibile lo stato del paziente;
- il paziente interessato dal fenomeno di colonizzazione/infezione dovrà essere adeguatamente informato sulla propria condizione e sulle norme comportamentali pratiche richieste dal suo stato durante il ricovero;
- alla dimissione, ove persista lo stato di colonizzazione da CPE, deve essere fornita al paziente una nota informativa di carattere pratico, predisposta dalla DMPO, che indichi in maniera chiara e facilmente comprensibile le seguenti informazioni:
 - o cosa sono gli *Enterobatteri produttori di Carbapenemasi* e come si trasmettono;
 - o il significato dello *stato di portatore*;
 - o le *precauzioni* e le norme igieniche da adottare dopo la dimissione per ridurre il rischio di trasmissione ai contatti;
 - o i riferimenti per le specifiche necessità diagnostico/assistenziali successive al ricovero;
 - o la stessa nota deve fornire indicazioni e riferimenti per il MMG e per i medici che dopo il ricovero avranno in cura il soggetto interessato.

4. Metodi microbiologici

Il Ministero della Salute propone, quali riferimenti scientifici per le metodiche di Laboratorio da utilizzare nella conferma della produzione di *carbapenemasi* e nello *screening* dei portatori, i documenti prodotti nel 2012 dal Comitato di Studio per gli Antimicrobici (CoSA) dell'Associazione dei Microbiologi Clinici Italiani - AMCLI, a cui si rimanda per i dettagli tecnici.

4.1 Conferma fenotipica della produzione di “carbapenemasi”

Le predette fonti scientifiche propongono di effettuare i test di conferma fenotipica per la produzione di *carbapenemasi* – sia sugli isolati di *K. pneumoniae* che di *E. coli* - in presenza di una ridotta sensibilità al meropenem: $MIC \geq 0.5 \text{ mg/L}$ o diametro *alone di inibizione* $\leq 25 \text{ mm}$. Il *meropenem* è preferibile come indicatore, in quanto dotato di maggiore specificità, sia rispetto all'*imipenem* che all'*ertapenem*.

Le metodologie praticabili nella routine di laboratorio vengono elencate di seguito, nell'ordine di priorità di scelta proposto dai Comitati scientifici di riferimento.

Test di sinergia mediante combinazione su dischetto di meropenem con ac. boronico o ac. dipicolinico

I test che consentono maggiori possibilità di standardizzazione ed una maggiore accuratezza sono i test di sinergia, rispettivamente con *acido fenilboronico*, la cui positività è indicativa della produzione di KPC (o, più raramente, di altre carbapenemasi di classe molecolare A), ed il test di sinergia con *EDTA o acido dipicolinico*, indicativo della produzione di *metallo-beta-lattamasi* (MBL) quali VIM o NDM.

I due test si basano sull'effetto sinergico di potenziamento dell'azione in vitro dei carbapenemi, che alcuni inibitori di tali *carbapenemasi*, quali l'acido boronico e l'acido dipicolinico, esercitano



rispettivamente in presenza di *KPC* e *MBL*. Il manifestarsi dell'effetto sinergico sarà evidentemente indicatore della produzione di una delle predette carbapenemasi.

I test di sinergia, tuttavia, non sono in grado di svelare la presenza di altre carbapenemasi quali *OXA48*

Test di Hodge (variamente modificato)

Si basa sulla riduzione dell'attività del carbapenemico nei confronti di un ceppo indicatore sensibile, causata dalle carbapenemasi eventualmente prodotte dal microrganismo in esame e disperse nel mezzo circostante, le quali avranno l'effetto di proteggere il ceppo indicatore sensibile presente sulla stessa piastra.

Il *test di Hodge*, oltre ai limiti metodologici dovuti alla minore possibilità di standardizzazione ed alla relativa soggettività dell'interpretazione, presenta anche il limite di evidenziare solo la presenza generica di attività carbapenemasi, non distinguendo fra le diverse classi di *carbapenemasi*. Tuttavia il test consente di confermare la sospetta produzione di carbapenemasi anche nei casi in cui è presente una carbapenemasi di tipo differente da *KPC* o *MBL*, come *OXA-48*, per le quali i test di sinergia con inibitori danno risultato negativo;

Test di combinazione su striscia a gradiente di diffusione

I test di diffusione (*Etest*) per *MBL*, basati sul confronto tra la MIC del ceppo in esame per meropenem e la MIC dello stesso ceppo per meropenem+inibitore delle *MBL* (*EDTA*), si limitano alla rilevazione delle sole *MBL*.

Al fine di ottemperare correttamente al flusso della sorveglianza nazionale, i test di conferma fenotipica dovranno essere eseguiti anche su quei ceppi di *K. Pneumoniae* ed *E. coli*, isolati da emocolture, che presentino ridotta sensibilità ai carbapenemi, definita come sopra ($MIC \geq 0.5$ mg/L o diametro alone di inibizione ≤ 25 mm).

Inoltre, con riferimento alle raccomandazioni contenute nel documento ECDC, almeno in una prima fase di valutazione complessiva dell'entità del fenomeno, è raccomandata la ricerca attiva e la segnalazione interna degli Enterobatteri produttori di carbapenemasi isolati anche dagli altri campioni clinici, indipendentemente dalla loro sensibilità clinica, da parte dei Laboratori di microbiologia ospedalieri, i quali dovranno darne tempestiva comunicazione alle Direzioni sanitarie.

La segnalazione interna dei ceppi CPE isolati da *campioni diversi dalle emocolture non seguirà il flusso informativo della sorveglianza nazionale*, ma rientrerà nelle misure che ciascuna Azienda sanitaria ed ospedaliera dovrà implementare per la sorveglianza ed il controllo del fenomeno.

Pertanto è raccomandata l'implementazione tempestiva dei predetti test di conferma in tutte le Aziende sanitarie ed ospedaliere: le Aziende con più di un Presidio Ospedaliero potranno individuare al proprio interno almeno un Laboratorio di riferimento, in grado di eseguire il test di conferma fenotipica sugli isolati sopra descritti.

Infine, è opportuno prevedere la conservazione mediante congelamento dei ceppi di CPE confermati fenotipicamente, almeno per quei casi che rientrano ne flusso informativo nazionale, e/o nei casi per i quali è prevista la necessità di genotipizzazione.

4.3 Test di screening colturale per l'individuazione dei pazienti colonizzati da CPE

Come anticipato in precedenza, lo screening dei pazienti colonizzati può essere effettuato mediante esame colturale di un campione prelevato con tampone rettale.

Alcune delle metodiche descritte di seguito rispondono alla necessità di consentire una comunicazione tempestiva del sospetto di CPE, mentre in alcuni casi potrebbe essere richiesta la caratterizzazione delle colonie individuate come “sospette” attraverso successivi test di identificazione, di sensibilità ai *carbapenemi* ed eventuali test di conferma.

I metodi di screening proposti dal Comitato di Studio per gli Antimicrobici (CoSA) dell’Associazione dei Microbiologi Clinici Italiani - AMCLI – per la ricerca dei ceppi CPE, sono i seguenti:

Semina diretta su terreno selettivo con dischetti

Il campione (tampone rettale) viene inoculato su un terreno solido selettivo per bacilli aerobi Gram negativi. Successivamente, nel punto di inoculo viene deposto un dischetto di *meropenem* (10 µg); le colonie con morfologia tipica per *Enterobacteriaceae* che crescono all’interno dell’alone di inibizione, ovvero nell’area corrispondente ad un alone di inibizione con diametro ≤ 30 mm, devono essere considerate sospette. L’esito positivo, ai fini di una tempestiva segnalazione, può essere ottenuto anche dopo 16-18 ore, il che abbrevia notevolmente i tempi di comunicazione; in caso di esito negativo sarà invece opportuno effettuare una seconda lettura dei terreni dopo ulteriori 24 ore d’incubazione.

L’aggiunta di un secondo dischetto di meropenem addizionato di acido fenilboronico potrebbe consentire il contestuale riconoscimento della produzione di enzimi del tipo KPC.

Diverse fonti scientifiche considerano tale metodica dotata di diversi vantaggi sul piano tecnico, oltre che vantaggiosa anche in termini di rapporto costi/benefici.

Semina su terreni cromogeni

Il tampone rettale viene inoculato su terreni cromogeni specifici per la ricerca di batteri con scarsa sensibilità ai carbapenemi.

Tali terreni possono rendere relativamente facile e rapida l’individuazione delle colonie sospette e l’identificazione presuntiva di specie. Tuttavia, specialmente in caso di terreni con bassa specificità, potrebbe essere necessario caratterizzare le colonie sospette con identificazione definitiva e test di sensibilità ai *carbapenemi* (*doc. CoSa, Amcli 2012*), il che può comportare un “... eccessivo utilizzo di test aggiuntivi ...” e, di conseguenza, un “... ritardo nella comunicazione dell’esito positivo ...”.

La scelta di terreni cromogenici dotati di specificità adeguata consente invece di ottenere risultati relativamente rapidi ed affidabili attraverso questa metodica.

Semina previo arricchimento

Tale metodica può dimostrarsi più sensibile delle precedenti, tuttavia richiede tempi di esecuzione più lunghi (fino a 72 ore) e risulta più indaginosa, oltre che relativamente onerosa.

Essa prevede la semina del tampone rettale in 5 ml di Tryptic Soy Broth addizionato con un dischetto di ertapenem o meropenem da 10 µg (concentrazione finale 2 µg/ml), seguita da incubazione a 35°C per 18 ore e successiva semina di 100 µl della brodo coltura su agar McConkey; anche quest’ultimo andrà incubato a 35°C per 24-48 ore.