



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

**VALUTAZIONE DEL
PATTERN LOCALE DI
SENSIBILITÀ DI CEPPI DI
KLEBSIELLA PNEUMONIAE
RESPONSABILI DI
INFEZIONI NOSOCOMIALI**

Relatore: Chiar.mo
Prof. A. Giacometti

Tesi di Laurea di:
Francesco Ginevri

Correlatore: Dott.
G. Morroni

A.A. 2019/2020

INDICE

1. Introduzione

1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> e sue generalità	1
1.2 Carbapenemasi e loro classificazione	10
1.3 Caratteri salienti dei tre antibiotici in esame.	12

2. Materiali e Metodi

2.1 Microdiluizione in brodo.	18
2.2 E-Test.	21

3. Obiettivo e importanza dello studio. 23

4. Risultati dello studio

4.1 Tabella dei risultati.	24
4.2 Rappresentazione grafica dei risultati.	25
4.3 Discussione dei risultati.	26

5. Bibliografia. 31

INTRODUZIONE

1.1 *Klebsiella pneumoniae* e sue generalità

Generalità. *Klebsiella pneumoniae*, descritta per la prima volta nel 1882 da Carl Friedlander (Friedlander C. 1882.), è un bacillo Gram-, capsulato, non mobile, appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae (Fig. 1), ancora poco studiato e attorno a cui si sta generando una crescente preoccupazione in ambito scientifico connessa alla comparsa sempre più frequente di ceppi multiresistenti o ipervirulenti.

Questo batterio si ritrova ubiquitariamente in natura e colonizza suolo, acque, animali e l'uomo (Martin RM, Bachman MA. 2018.). Rappresenta, inoltre, un comune agente causale di infezioni acquisite durante l'ospedalizzazione, soprattutto polmoniti, infezioni urinarie e batteriemie (Martin RM, Bachman MA. 2018.), ma anche, seppure in minor parte, in comunità, in particolare con l'emergere di ceppi ipervirulenti. Questi ultimi, infatti, tendono ad infettare persone sane causando gravi infezioni quali meningiti, ascessi epatici, endoftalmiti e infezioni dei tessuti molli (Paczosa MK, Mecsas J. 2016.).



Fig.1-*Klebsiella pneumoniae*

Colonizzazione. La condizione indispensabile affinché si realizzi l'infezione è una precedente colonizzazione; come accennato precedentemente, l'ambiente esterno è una fonte di acquisizione di *K. pneumoniae* per l'uomo, in particolare l'ambiente ospedaliero, ricco di potenziali sorgenti di trasmissione: le mani degli operatori sanitari e il contatto tra persona e persona, superfici e strumentazione sanitaria (Jarvis et al., 1985).

Una volta acquisita, *K. pneumoniae* si stanza in modo stabile preferenzialmente a livello della mucosa nasofaringea e soprattutto del tratto gastrointestinale (*Podschun and Ullmann, 1998.*), mentre a livello cutaneo il batterio tende a risiedere solo transitoriamente (*Kloos and Musselwhite, 1975.*). Il tasso di colonizzazione varia a seconda del sito corporeo considerato e a seconda che *K. pneumoniae* sia stata acquisita in comunità o in ospedale. Nello specifico, il tasso di colonizzazione in comunità della mucosa nasofaringea si aggira tra il 3 ed il 15% (*Davis and Matsen, 1974; Wolf et al. 2001; Farida et al. 2013.*) contro un tasso di colonizzazione ospedaliero del 19% (*Pollack et al., 1972*); per quanto riguarda il tratto GI, la percentuale di persone colonizzate in comunità può raggiungere il 35% (*Davis and Matsen, 1974.*), mentre in ambiente ospedaliero può raggiungere il 77% (*Podschun and Ullmann, 1998.*). L'elevato tasso di colonizzazione ospedaliera sembra essere in larga parte dovuto all'uso di antibiotici: una precedente antibioticoterapia è significativamente associata con l'acquisizione di Klebsiella da parte del paziente; in uno studio è stato osservato un incremento della percentuale di colonizzazione dalle due alle quattro volte, due settimane dopo ammissione in ospedale, soprattutto in quei pazienti trattati con antibiotici ad ampio spettro o con combinazioni antibiotiche (*Rose and Schreier, 1968.*).

Fattori di rischio. Molteplici fattori rendono alcuni individui più suscettibili a sviluppare un'infezione a partire da una precedente colonizzazione: in parte dipendenti dal paziente e in parte dal ceppo batterico alla base del processo infettivo. Tra i primi rientrano tutte quelle situazioni che portano ad una condizione di deficit dell'immunità innata, in particolare: neoplasie maligne, diabete, epatopatie croniche, dialisi, trapianto d'organo, terapia corticosteroidica e chemioterapia; i suddetti oltre a favorire la progressione ad infezione, aumentano la morbilità e la mortalità della malattia che ne scaturisce (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016.*).

L'età del paziente è un altro elemento significativo: i neonati, soprattutto prematuri o ricoverati in terapia intensiva, a causa dell'imaturità delle loro difese immunitarie, dell'elevata permeabilità del loro tratto GI e di un microbioma non ancora formato, possono sviluppare sepsi da *K. pneumoniae* con maggior probabilità rispetto ad altre popolazioni (*Collado MC et al., 2015; Afroza S, 2006.*). L'altra fascia d'età maggiormente suscettibile e a maggior rischio di eventi mortali è quella anziana; questo è attribuibile, da una parte, ad una minore efficienza delle difese immunitarie, dall'altra ad eventi specifici quali aspirazione della flora batterica della mucosa orofaringea con seguente traslocazione di carica batterica a livello aereo (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016.*).

Infezione. A questo proposito, un altro elemento favorente la progressione da colonizzazione ad infezione è la traslocazione del batterio da una sede colonizzata ad un'altra (in particolare, vie aeree o urinarie), spesso come conseguenza di manovre mediche. Infatti, la presenza di fimbrie in ceppi di *K. pneumoniae*, permette al batterio di aderire stabilmente ai dispositivi medici che divengono, in questo modo, fonti di diffusione batterica (Mishra SK, 2015.). A questo proposito si ricorda che una frequente via di acquisizione di polmonite (VAP) mediata da *K. pneumoniae* è data dall'intubazione orotracheale, così come l'inserimento di un catetere vescicale rappresenta un importante punto d'ingresso per un'infezione delle vie urinarie (Zolfaghari PS, Wyncoll DL, 2011.).

Infine, anche i caratteri intrinseci al batterio giocano un ruolo per quanto riguarda il rischio di sviluppo d'infezione; la diffusione di ceppi di *K. pneumoniae* ipervirulenti, infatti, sta aumentando la possibilità di infettarsi non solo dei pazienti più fragili, ma anche di quelli più giovani e in salute (Paczosa MK, Mecsas J, 2016.).

La *K. pneumoniae* è l'agente causale di un ampio spettro di infezioni, che, come già accennato, varia in parte a seconda del ceppo batterico; nello specifico, i ceppi classici di *K. pneumoniae* sono prevalentemente alla base di infezioni nosocomiali quali polmoniti (HAP, polmonite che si presenta almeno dopo 48 ore da un ricovero, in un paziente senza precedenti sintomi di infezione polmonare), infezioni delle vie urinarie (UTI) e batteriemie sia primitive che secondarie; i ceppi ipervirulenti sono responsabili per lo più di infezioni comunitarie come ascessi epatici, polmoniti (CAP), celluliti, fasciti necrotizzanti, endoftalmiti e meningiti (Paczosa MK, Mecsas J, 2016.).

Per quanto riguarda le polmoniti, queste possono essere divise in due categorie: quelle acquisite in comunità (CAP) e quelle ospedaliere (HAP). Le HAP hanno una prevalenza di gran lunga maggiore rispetto alle CAP quando l'agente eziologico chiamato in causa è la *Klebsiella pneumoniae* (Paczosa MK, Mecsas J, 2016.). La *K. pneumoniae* è la causa sottostante di circa il 12% delle HAP, che rappresentano la principale causa di morte intraospedaliera per malattia infettiva (Magill et al, 2014.) e il principale agente responsabile di polmoniti associate alla ventilazione invasiva (VAP), in corso di ricovero in terapia intensiva (Kalanuria et al., 2014). La *K. pneumoniae* è raramente causa di CAP, in Nord America, Europa ed Australia, solo il 3-5% delle CAP riconoscono come agente patogeno la *K. pneumoniae*; la prevalenza sale nei continenti asiatico e africano, dove la *K. pneumoniae* è seconda solo allo *S. pneumoniae* (Paczosa MK, Mecsas J, 2016.). Tuttavia, la *Klebsiella* è molto rappresentata come agente eziologico nelle forme di CAP severe: infatti, il 22-32% delle CAP che richiedono ricovero in

unità di terapia intensiva è causato da *K. pneumoniae*, con una mortalità che va dal 45 al 72% (Paganin F. et al., 2004.).

Il tratto urinario è il sito d'infezione più comune per *K. pneumoniae* (Podschun and Ullmann, 1998); si può affermare che i ceppi classici di *K. pneumoniae* sono la seconda/terza causa di UTI dietro l'*Escherichia coli* (Czaja CA et al. 2007.)

Tipicamente, *K. pneumoniae* è causa del 2-6% delle UTI nosocomiali e del 4-7% delle UTI comunitarie (Laupland KB et al, 2007) e, generalmente, sono infezioni derivanti dalla contaminazione delle vie urinarie con la flora batterica intestinale (Rodriguez-Bano J et al. 2008).

Una conseguenza estremamente grave di una infezione urinaria o polmonare è la disseminazione batterica dal sito di infezione primario al circolo ematico, con conseguente batteriemia secondaria; tra i Gram -, *K. pneumoniae* è seconda solo ad *E. coli* come causa di batteriemia sia comunitaria che nosocomiale, con mortalità attorno 27-30% (Chetcuti Zammit S et al. 2014); un tasso di mortalità così elevato è legato alle comorbidità dei pazienti colpiti, spesso ricoverati in terapia intensiva, anziani, con neoplasie maligne, epatopatia e diabete mellito concomitanti (Kang et al., 2006).

Crescenti preoccupazioni si stanno sollevando riguardo queste comuni infezioni da *K. pneumoniae* in seguito alla comparsa sempre più frequente di ceppi multiresistenti che rendono sempre più difficile la risoluzione clinica della malattia e che, prolungando la durata dell'infezione, favoriscono l'estensione sistemica del batterio attraverso il circolo (Paczosa MK, Mecsas J, 2016.).

Oltre a quanto esposto, un'altra problematica consiste nella comparsa di ceppi ipervirulenti in grado di dare infezione anche in soggetti giovani e altrimenti sani, oltre che in pazienti già compromessi. Particolarmente rilevanti sono gli ascessi epatici dati da questi ceppi, ascessi che, probabilmente, derivano da una breccia a livello della barriera gastrointestinale dell'ospite, la quale consente al batterio di raggiungere, per via venosa, il fegato (Kim JK et al. 2009.).

Difese dell'ospite. Come avviene per ogni altro agente infettivo, anche *K. pneumoniae* si trova, prima di poter infettare, a dover superare tutta quella pletora di reazioni che il sistema immune dell'ospite le dispiega contro. I principali ostacoli che deve superare sono: barriere fisiche, difese umorali e cellulari immunitarie innate. Un buon numero di studi su modelli animali ha contribuito a delineare il ruolo di tutte queste componenti, così come le modalità di evasione da parte del patogeno (Zhang P et al., 2000).

Le prime barriere incontrate dal batterio sono quelle fisiche; tra queste rileviamo l'attività meccanica della clearance mucociliare a livello delle vie aeree, che permette l'intrappolamento dei microbi e particelle estranee e il loro spostamento verso l'esterno. A livello genitourinario, il flusso urinario, sinergicamente con il proprio PH tendenzialmente acido, rimuove *K. pneumoniae* insieme ad altri batteri prevenendone il raggiungimento della vescica. Allo stesso modo, questi batteri, per colonizzare il tratto GI devono affrontare una serie di ostacoli tra cui la peristalsi, che li spinge verso l'esterno, e il normale turnover dell'epitelio intestinale, che rimuove i batteri che vi sono aderiti (McClane BA, Mietzner TA, 1999.).

Una volta valicate le difese meccaniche, il batterio deve soprafare le difese innate di tipo umorale e cellulare messe in campo dal sistema immune.

Le prime consistono in un ricco insieme di fattori antimicrobici con funzione di battericida, batteriostatica e di opsonizzazione (20Zhan P. 2000). Tra queste gioca un ruolo primario il sistema del complemento, la cui attivazione può condurre, da una parte alla formazione di complessi di attacco sulla membrana batterica e alla seguente citolisi, dall'altra al rilascio di mediatori proinfiammatori, chemotattici e alla espressione sulla superficie del batterio di fattori che favoriscono la fagocitosi da parte del braccio cellulare del sistema immune. Una difesa umorale aggiuntiva è rappresentata dalle defensine, fattori battericidi espressi a livello polmonare che interrompono la continuità della membrana batterica, e dalla transferrina, fattore batteriostatico di sequestro del ferro utile alla proliferazione batterica (Paczosa MK, Mecsas J, 2016).

Sinergicamente con le difese umorali lavorano le difese cellulari innate; la prima linea cellulare coinvolta è rappresentata dai macrofagi residenti nei tessuti periferici, i quali sono dotati di capacità fagocitarie e sono in grado di amplificare la risposta immunitaria attraverso la produzione di citochine (Paczosa MK. Mecsas J, 2016). Stabilitasi l'infezione da *K. pneumoniae*, le prime cellule reclutate nel sito di infezione sono i granulociti neutrofili attirati dai fattori chemotattici rilasciati precedentemente dai macrofagi. I neutrofili hanno una grande capacità fagocitica e di *killing*, perciò sono fondamentali nel contenimento dell'infezione e nella clearance batterica (Kumar V., Sharma A., 2010). A questo proposito si può dire che, dallo studio di modelli murini, il contributo dato da queste due compagini cellulari (macrofagi e neutrofili) differisce a seconda dello specifico ceppo batterico, in quanto ci sono ceppi che appaiono resistenti all'azione neutrofila e altri, invece, maggiormente sensibili (Xiong H et al., 2015). E', inoltre, sostanziale per un'efficace risposta immunitaria, in modelli murini, il signaling mediato dai Toll like Receptors (TLR), soprattutto il TLR4 attraverso cui avviene a

produzione di citochine infiammatorie quali IL-17 e IL-23, necessarie per un maggior controllo dell'infezione e un miglior reclutamento neutrofilo (Paczosa MK, Mecsas J, 2016).

Fattori di virulenza. *Klebsiella pneumoniae* impiega numerosi metodi al fine di eludere la risposta dell'ospite, ma la sua strategia principale è quella di elusione e sopravvivenza piuttosto che soppressione diretta delle componenti del sistema immune (Paczosa MK, Mecsas J, 2016). I più importanti e meglio caratterizzati fattori di virulenza che permettono al batterio l'attuazione di questa strategia sono: capsula polisaccaridica, lipopolisaccaride (LPS), fimbrie e siderofori (Paczosa MK, Mecsas J 2016).

La capsula (Fig.-2) è una matrice polisaccaridica che riveste la cellula esternamente la quale, nei ceppi detti ipervirulenti, tende ad essere molto più rappresentata e robusta rispetto a quella dei ceppi classici e può contribuire significativamente alla patogenicità (Paczosa MK, Mecsas J, 2016). Le capsule sono composte da polisaccaridi ceppo-specifici denominati antigeni K (ad oggi sono noti 78 sierotipi di *K. pneumoniae* da K1 a K78) (Pan Y-J et al., 2008.). I geni necessari per la sintesi della capsula sono tutti situati nell'operone cromosomico cps; nei ceppi ipervirulenti, la produzione della capsula è amplificata grazie alla presenza di geni plasmidici (quali *rpmA* e *rpmA2*) che esprimono proteine regolatrici della trascrizione e che promuovono la trascrizione dell'operone *cps* dando un fenotipo batterico ipercapsulato (Paczosa MK, Mecsas J, 2016).

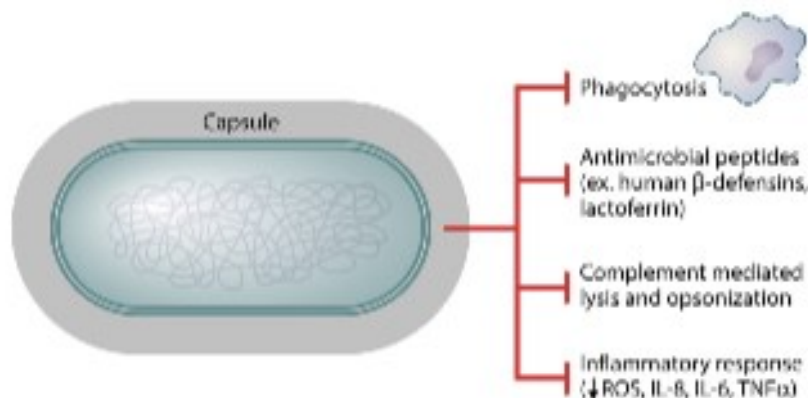


Fig.2-Capsula

C'è una forte associazione tra il sierotipo (determinato dalla combinazione polisaccaridica della capsula) e la gravità dell'infezione; non a caso, i sierotipi più virulenti sono il K1 e il K2, infatti i fenotipi batterici ipercapsulati appartengono quasi esclusivamente a sierotipi K1 e la restante parte a sierotipi K2 (Struve C. et al., 2015). Tuttavia, la maggior aggressività di questi due tipi non è completamente attribuibile alla maggior presenza di fenotipi ipercapsulati, ma anche ad una maggior resistenza alla fagocitosi e al killing intracellulare, oltre che alla concomitante

presenza di altri fattori di virulenza indipendenti dall'ipercapsula (*Paczosa MK, Mecsas J. 2016*).

Nello specifico, il ruolo che la capsula svolge durante l'infezione è, in primis, quello di protezione dalla fagocitosi, in aggiunta, ostacola l'attività battericida di molecole come le defensine facendo sì che vengano tenute a distanza dalla membrana plasmatica esterna del batterio. Come terza funzione, la capsula limita l'attivazione del complemento, bloccando le varie componenti dall'interazione con la membrana plasmatica e quindi l'opsonizzazione e la lisi batterica mediata dal complemento stesso. Tutto ciò si traduce anche in una minore attivazione della risposta immune in toto, con minori livelli di citochine flogistiche (IL-6 e TNF-alfa) e maggior produzione di citochine antiinfiammatorie (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016*). Il LPS (Fig.-3), componente fondamentale della membrana plasmatica esterna dei Gram-, è formato dall'antigene O, un core oligosaccaridico e il lipide A. Se da un lato LPS è un importante fattore di virulenza, dall'altro, il lipide A è un potente ligando di TLR-4, la cui attivazione comporta un importante stimolo infiammatorio (*Standiford LR. Et al., 2012*). Alcuni studi suggeriscono che ci sono ceppi di *K. pneumoniae* che mascherano il loro LPS, anche grazie alla loro capsula (*Wu MF. Et al., 2009*), e altri che sono in grado di modificarlo in modo da non renderlo più riconoscibile da TLR-4 (*Llobet et al. 2015*). Il lipide A ha anche un ruolo favorevole, poiché protegge il batterio dai peptidi cationici antimicrobici (*Clements A. et al., 2007*). L'antigene O del LPS svolge un ruolo primario di protezione tramite il sequestro del frammento C3b della terza frazione del complemento e il legame della frazione C1q, infatti i ceppi di *K. pneumoniae* che possiedono un LPS di lunghezza completa sono resistenti alla morte mediata dal sistema complementare, al contrario, ceppi con forme incomplete di LPS ne sono suscettibili, nonostante la presenza di una capsula (*Merino S. et al., 1992*) e incapaci di una diffusione batteriemia (*Shankar-Sina S. et al., 2004*).

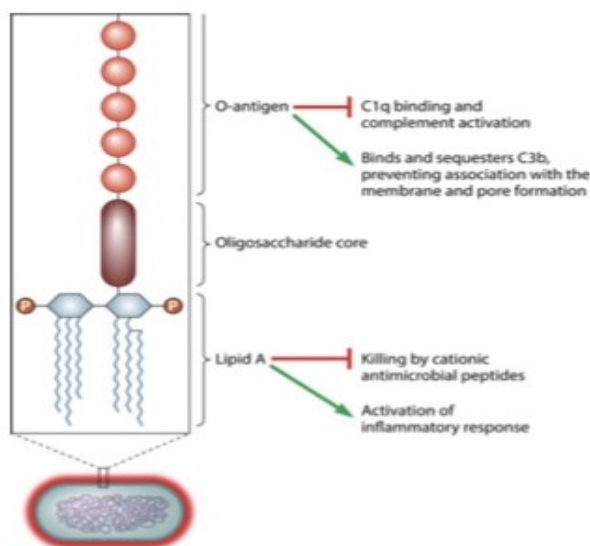


Fig.3-Lipopolisaccaride

Le fimbrie (Fig. 4) rappresentano un'altra classe di fattori di virulenza, mediatori dell'adesione batterica; in *K. pneumoniae* le principali strutture adesive sono la fimbria tipo 1 e la fimbria tipo 3.

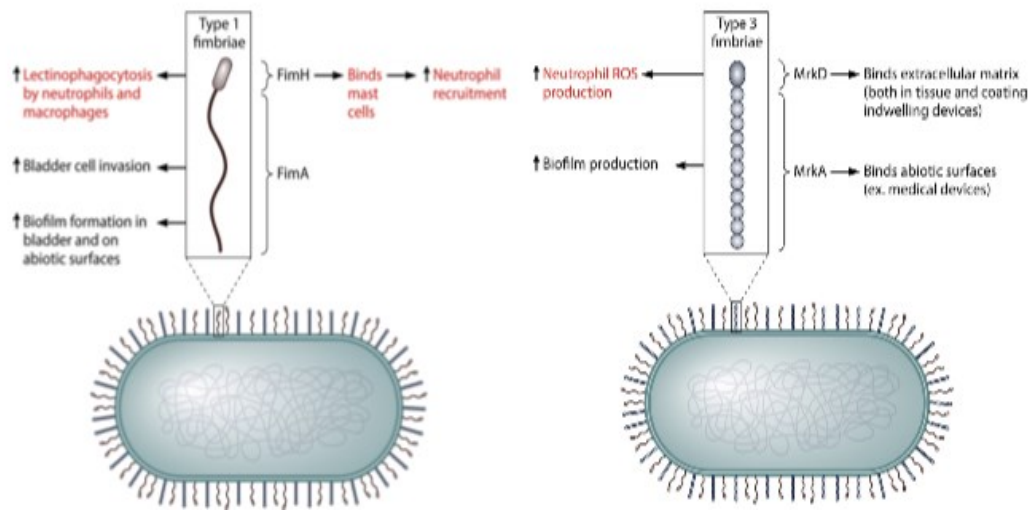


Fig.4-Fimbrie

Le prime sono sottili protrusioni filiformi localizzate sulla superficie batterica e si ritrovano nel 90% delle Klebsielle di isolamento clinico ed ambientale (Klemm P. et al. 2000). Le fimbrie tipo 1 sono costituite da due subunità: FimA e FimH, codificate rispettivamente da due geni *fimA* e *fimH*. La prima subunità (FimA) costituisce la maggior parte della struttura fimbriale, mentre l'altra è deputata alla funzione di adesione (Stahlut SG. et al., 2012). Il tipo di legame mediato da questa fimbria è definito “mannosio-sensibile”, in quanto si connette a glicoproteine D-Mannosilate. *K. pneumoniae* impiega stimoli ambientali per regolare l'espressione di queste strutture, infatti i geni che codificano per le fimbrie tipo 1 sono espressi solo nel tratto urinario e mancano al livello GI e polmonare; questa osservazione induce ad affermare che le fimbrie tipo 1 contribuiscano all'adesione del batterio all'urotelio vescicale e alla formazione di un biofilm durante l'infezione delle vie urinarie; d'altro canto è probabile che queste fimbrie risultino superflue, se non controproducenti, durante la colonizzazione GI o delle vie aeree (Struve C. et al., 2009.).

Le fimbrie di tipo 3, a differenza delle tipo 1, hanno struttura elicoidale e sono costituite da due subunità: MrkA, che forma la porzione più consistente, e MrkD, la cui estremità ha capacità adesive. Così come per le tipo 1, queste fimbrie si ritrovano in quasi tutte le Klebsielle isolate, ma non sono in grado di legare il mannosio, per cui sono dette “mannosio insensibili” (Paczosa MK, Mecsas J, 2016.). Per questa tipologia di fimbria non è ancora stato identificato uno specifico ligando, tuttavia ha mostrato una certa affinità per la matrice proteica, come collagene tipo IV e tipo V (Sebghati TA et al., 1998). Anche le fimbrie tipo 3 non sono utili nella

colonizzazione del tratto GI o delle vie aeree, in aggiunta in modelli di infezione murini, sembrano non contribuire a UTI (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016*). Il ruolo clinicamente rilevante di questa fimbria, ad oggi, è quello di conferimento al batterio della capacità di adesione a superfici abiotiche, come cateteri o tubi endotracheali; nel dettaglio, la subunità MrkA lega direttamente le superfici inanimate, mentre la subunità MrkD ha maggiore affinità di legame con collagene o superfici rivestite da matrice (*Jagnow J, Clegg S, 2003*). Ciò suggerisce che MrkA consente al batterio di aderire alla superficie del dispositivo medico (ad esempio catetere) prima o durante l'inserzione, poi, una volta che il dispositivo sia stato rivestito da materiale biologico derivante dall'ospite, come collagene o matrice extracellulare rilasciati in corso di danno tissutale, MrkD rafforza lo stanziamento di *K. pneumoniae* a livello del dispositivo stesso (*Francois P et al., 1998*).

In individui sani, l'azione patogena delle fimbrie può essere controbilanciata dalla loro interazione con le cellule immunitarie, dato che favoriscono la fagocitosi e all'internalizzazione batterica. Specificamente, la subunità FimA nelle fimbrie tipo 1 può innescare una forma di fagocitosi, indipendente dalle opsonine, chiamata lectinofagocitosi, mediata da neutrofili e macrofagi; mentre la subunità FimH può legarsi a mastociti e indurre una risposta infiammatoria in seguito al rilascio di citochine e al reclutamento neutrofilo (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016*).

Il ferro è un elemento cruciale per la proliferazione batterica e deve essere acquisito dal batterio dall'ambiente esterno. Questo metallo non è prontamente disponibile nell'organismo infettato soprattutto perché una delle risposte aspecifiche all'infezione da parte dell'ospite, consiste nel limitare la biodisponibilità della molecola, sequestrandola all'interno dei depositi cellulari (*Bullen JJ et al. 1972; Carniel E, 2001.*); oltre a ciò, la maggior parte di ferro circola nel plasma legata alla transferrina, motivo per cui solo una minima parte rimarrebbe a disposizione del batterio. Per queste ragioni, *K. pneumoniae*, come molti altri patogeni, impiega delle tattiche per rifornirsi di ferro e propagare l'infezione. La più importante è la secrezione di siderofori: molecole espresse sulla superficie batterica, che possiedono un'affinità per il ferro superiore a quella delle proteine dell'ospite chelanti questo metallo, e che permettono al patogeno di sottrarlo all'ambiente esterno e di usufruirne (*Miethke M et al. 2007*). *K. pneumoniae* esprime generalmente più di una tipologia di sideroforo (ad esempio, enterobactin, yersiniabactin, aerobactin e salmochelina), aspetto che ha conferito un notevole vantaggio in termini di efficacia infettiva, dato che più siderofori suppliscono all'eventuale soppressione di uno o più siderofori da parte dell'ospite (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016*). Enterobactin, tra i vari siderofori, è quella con diffusione maggiore tra i vari ceppi di *Klebsiella pneumoniae* ed è perciò

considerata il principale sistema di *uptake* del ferro a disposizione di questo batterio. L'enterobactin è inibita dalla lipocalina-2, proteina con numerose funzioni antibatteriche e rilasciata in corso di infezione da numerosi tipi cellulari, tra cui i neutrofili. Inibendo enterobactin, la lipocalina-2 rallenta la crescita e la diffusione di tutti quei batteri che esprimono solo questo sideroforo (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016*).

Yersiniabactin, al contrario di enterobactin, è stata osservata solo dal 18% dei ceppi classici di *K. pneumoniae* e nel 90% dei ceppi ipervirulenti di isolamento clinico, soprattutto se isolati dal tratto respiratorio. A causa della sua struttura, differente da quella di enterobactin, la sua attività non risulta essere inibita dalla lipocalina-2. Tuttavia, questo sideroforo ha difficoltà nel reperire il ferro necessario in presenza di transferrina plasmatica, per questo motivo un batterio, che esprima solo yersiniabactin, è impossibilitato a disseminarsi dal polmone ad altri siti (*Bachman MA et al., 2011*).

La salmochelina è una forma glicosilata di enterobactin, questa modifica previene l'inibizione da parte della lipocalina-2. Questa proteina consente la colonizzazione nasofaringea anche in soggetti sani e immunocompetenti; in linea con questo aspetto, salmochelina è presente solo nel 2-4% dei ceppi nosocomiali di *K. pneumoniae* e in oltre il 90% dei ceppi comunitari ipervirulenti (*Paczosa MK, Mecsas J, 2016*).

Aerobactin, infine, espresso dal 93 al 100% dei ceppi ipervirulenti di *K. pneumoniae*, raramente nei ceppi classici nosocomiali, è sempre in associazione con la presenza di ipercapsula, in quanto il gene che codifica per aerobactin è situato nello stesso plasmide di virulenza che trasporta il gene *rmpA*. Tra i vari siderofori, è quello che svolge la maggior attività ed è indispensabile per ceppi ipervirulenti al fine di infettare efficacemente il sito polmonare e i tessuti molli (*Russo et al, 2015; Paczosa MK, Mecsas J, 2016*).

1.2 Carbapenemasi e loro classificazione

Una delle problematiche più attuali riguardo la *Klebsiella pneumoniae* è quella della multiresistenza antibiotica in seguito a cui, anche infezioni banali quali le UTI, possono divenire refrattarie alla terapia e infezioni più gravi, come polmoniti e batteriemie, possono aumentare la loro letalità (*Boucher HW et al., 2009*).

Tra gli elementi scatenanti la multiresistenza si possono citare le porine, proteine formanti canali sulla membrana batterica esterna, in quanto la loro downregulation riduce l'ingresso di molecole, tra cui gli antibiotici (*Hernandez-Alles S et al., 2000*). Le pompe di efflusso sono anch'esse proteine situate sulla membrana citoplasmatica del batterio e possono contribuire all'antibioticoresistenza, tanto che studi su ceppi con delezione a livello del locus genico

codificante per la proteina AcrAB (pompa di efflusso) sono risultati più suscettibili ai beta-lattamici rispetto a ceppi wild-type (*Padilla E. et al., 2010*).

Ad oggi, le più grandi preoccupazioni in tema di resistenza antibiotica sono, però, incentrate sulla rapida e mondiale diffusione di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro e, ancor di più, di carbapenemasi, in grado di conferire resistenza a quasi tutti i beta-lattamici disponibili (penicilline, cefalosporine, monobattami e carbapenemi) (CDC. 2015). Dal 1990, data della prima descrizione di una carbapenemasi, è stato riportato un incremento esponenziale dei batteri produttori di questi enzimi (*Diene and Rolain, 2014*).

Classificazione chimica. Le carbapenemasi possono essere divise in classi: la classe A include KPC, IMI, NMC, SME e GES, serin-carbapenemasi, le quali conferiscono diversi gradi di resistenza antibiotica. SME, IMI e NMC sono codificati da geni cromosomici, mentre KPC e GES da geni plasmidici trasferibili (*Queenan AM et al. 2007*). In particolare, la KPC, tra le serin-carbapenemasi, è la meglio descritta e diffusa nelle Enterobacteriaceae, specialmente nella *K. pneumoniae*. La propagazione in tutto il mondo di questo gene è associata al trasposone Tn4401 (*Cuzon G et al., 2010*); la classe B include le metallo-carbapenemasi, così chiamate per la presenza di uno o più atomi di zinco nel sito attivo enzimatico. Appartengono a questa schiera gli enzimi VIM, GIM, SIM, IMP e NDM; i geni che li codificano sono ritrovabili all'interno di plasmidi trasferibili sia tra le Enterobacteriaceae che tra altri batteri (*P. aeruginosa* e *A. baumannii*). Gli enzimi IMP, scoperti per la prima volta nel 1991 in Giappone, in *S. marcescens* risultano, ad oggi, diffusi in tutto il mondo tra Enterobacteriaceae e altri Gram-. Gli enzimi del tipo VIM, scoperti per la prima volta nel 1997 a Verona, sono anch'essi globalmente diffusi tra diverse specie batteriche. Tuttavia, una delle più grandi preoccupazioni in campo di antibioticoresistenza è data dagli enzimi NDM, scoperti solamente nel 2009, ad oggi sono tra le più comuni carbapenemasi in molti Gram- (*Diene SM, Rolain J-M, 2014*); infine, la classe D delle carbapenemasi, comprendente gli enzimi OXA, è costituita da serin-carbapenemasi, i cui geni sono sia a livello del cromosoma batterico, sia a livello dei plasmidi. In questo gruppo, solo OXA-48, OXA-162 e OXA-181 sono stati descritti in Enterobacteriaceae. Quest'ultima classe di enzimi è in grado di idrolizzare solo uno spettro ristretto di beta-lattamici ed ha una bassa capacità di idrolisi nei confronti dei carbapenemi, ma, se combinati con una membrana batterica poco permeabile, conferisce comunque un alto livello di resistenza contro questi antibiotici (*Poirel L. et al. 2011*).

Classificazione genetica. Dal punto di vista della localizzazione genetica, i geni che esprimono queste carbapenemasi possono essere distinti in: geni situati a livello cromosomico e geni situati su elementi genetici mobili, quali plasmidi, trasposoni e integroni. Gli enzimi come SME, NMC e IMI, sono codificati a livello cromosomico, cosa che può aver contribuito alla loro scarsa diffusione tra gli enterobatteri (Queenan AM et al., 2007). Al contrario, enzimi quali GES e soprattutto KPC, sono codificati a livello di plasmidi trasferibili ed alcune delle loro varianti sono tra le più diffuse in tutto il mondo tra i Gram- (Nordmann P et al., 2011). A conferma di quanto esposto, possiamo citare il trasposone Tn4401 (codificante l'enzima KPC-2) identificato in ceppi di *K. pneumoniae*, il quale è stato recentemente descritto anche in plasmidi di ceppi di *P. aeruginosa*, evidenziando fortemente la capacità di questi geni di resistenza di passare da una specie batterica all'altra (Diene and Rolain, 2014).

Per quanto riguarda le metallo-carbapenemasi, i loro geni, generalmente associati ad altri loci genici di resistenza, sono stati ritrovati soprattutto in integroni, anch'essi elementi genetici mobili contenuti in plasmidi (Voulgari E et al., 2013; Mazel D, 2006).

Una menzione la merita anche il gene che codifica per la carbapenemasi NDM (blaNDM); il suo gene si localizza a livello del trasposone Tn125 ed è stato descritto per la prima volta in un plasmide. Tuttavia, questo trasposone è stato descritto anche a livello del cromosoma di *A. baumannii*, supportando l'abilità di questo gene di spostarsi da una molecola di DNA all'altra (Pfeifer Y et al., 2011).

Concludendo, si può affermare che la diffusione di batteri produttori di carbapenemasi, negli ultimi 20 anni, è diventata uno dei problemi sanitari di maggior rilievo. Questa esplosione è, in larga parte, dovuta al fatto che questi enzimi hanno geni che si localizzano su elementi trasponibili in grado di passare da un batterio all'altro. Oltre a ciò, è probabile che, in un futuro prossimo, emergeranno nuove carbapenemasi, come esemplificato dalla recente comparsa di NDM (Rolain JM et al., 2012).

La battaglia contro l'insorgenza sempre più massiccia di batteri multiresistenti ha costretto la ricerca a trovare sempre nuove molecole e nuove combinazioni di farmaci per far fronte a questa minaccia.

1.3 Caratteri salienti dei tre antibiotici esaminati

Nel nostro studio abbiamo valutato l'efficacia di alcune di queste nuove molecole contro *K. pneumoniae*, in particolare: Ceftazidime/Avibactam (CZA), Ceftolozano/Tazobactam (CT) e Meropenem/Vaborbactam (MV).

CEFTAZIDIME/AVIBACTAM. CZA accoppia una cefalosporina di terza generazione con un nuovo inibitore non beta-lattamico delle beta-lattamasi (Avibactam) (*Van Duin D, Bonomo RA, 2016*). Ceftazidime, essendo un antibiotico beta-lattamico, agisce andando ad inibire l'enzima batterico PBP, fondamentale nella sintesi del peptidoglicano della parete batterica, mentre Avibactam si lega in maniera covalente e reversibile alle beta-lattamasi. Questa reversibilità è un elemento peculiare perché permette ad una singola molecola di Avibactam di inattivare più molecole di beta-lattamasi (*van Duin D, Bonomo RA, 2016*). Avibactam ha uno spettro d'azione inibitorio rivolto verso le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBLs), le carbapenemasi di classe A (in primis KPC) e le beta-lattamasi di classe A, C e D (*van Duin D, Bonomo RA, 2016*); i maggior timori legati a questa molecola sono dovuti alla scarsa capacità di Avibactam di inibire le metallo-beta-lattamasi che stanno divenendo sempre più comuni in particolare la NDM (*Berrazeg M et al, 2014*).

Lo spettro antimicrobico contro cui è rivolto CZA include prevalentemente batteri Gram -, quali Enterobacteriaceae, mentre per i batteri Gram+ possiamo registrare una debole attività antistreptococcica, molto limitata contro Stafilococchi e assente contro Enterococchi. C'è una buona attività contro *P. aeruginosa*, mentre *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* sono generalmente resistenti (*van Duin D, Bonomo RA, 2016*).

In un grande studio in vitro, CZA è stato testato verso più di 20.000 ceppi di Enterobacteriaceae di isolamento clinico, di questi solo 11 sono risultati avere una MIC >8 microgrammi/ml. Due di questi 11 producevano metallo-beta-lattamasi, note per essere resistenti all'inibizione da parte di Avibactam. Questi dati dimostrano l'estrema affidabilità di questa molecola contro la minaccia delle Enterobacteriaceae produttori KPC (*Castanheira M et al., 2015*).

L'insieme delle malattie per cui ne è stato approvato l'impiego comprende principalmente: le infezioni urinarie complicate (incluse le pielonefriti), infezioni intra-addominali complicate, polmoniti acquisite in ospedale (HAP e VAP) (*Shirley M, 2018*).

Farmacocinetica CZA. Le caratteristiche farmacocinetiche salienti di questo antibiotico possono essere riassunte come segue: l'unica via di somministrazione è quella endovenosa, il volume di distribuzione apparente è di circa 15 litri, cosa che suggerisce la tendenza di questo antibiotico a non avere siti di accumulo e a distribuirsi omogeneamente nel distretto extracellulare. Ha un'emivita di 1,5 ore e l'eliminazione avviene per via renale. Questi elementi farmacocinetici danno delle implicazioni pratiche importanti, cioè il numero delle somministrazioni giornaliere (ben 3) e la necessità di abbassare i dosaggi nei pazienti con

filtrato glomerulare ridotto (*van Duin D, Bonomo RA, 2016*). Per quanto riguarda gli effetti collaterali, si tratta di un farmaco molto sicuro, in quanto, anche a dosi superiori a quelle terapeutiche, non dà allungamento del tratto QT e solo il 30% dei volontari che hanno assunto queste dosi ha manifestato eventi avversi, per lo più lievi, come nausea, vomito e cefalea (*Das S. et al, 2014*).

Studi clinici. Uno studio randomizzato di fase 2 riguardante l'uso di CZA in infezioni urinarie complicate a confronto con Imipenem/Cilastatina ha mostrato risposte cliniche e microbiologiche sovrapponibili tra il gruppo sperimentale e quello di controllo; inoltre, hanno confermato il profilo di sicurezza di questa nuova molecola, con un solo paziente su 68 che ha sviluppato eventi avversi.

Un altro studio di fase due, volto a valutare l'efficacia di CZA in combinazione con Metronidazolo verso infezioni intraddominali complicate, ha evidenziato tassi di risposta clinica simili a quelli del gruppo di controllo trattato con Meropenem. Il braccio sperimentale ha mostrato una maggiore incidenza di eventi avversi rispetto a quello di controllo, molto probabilmente per la presenza di Metronidazolo nel primo gruppo. Quindi, anche questo studio ha dimostrato una non inferiorità del CZA e Metronidazolo nei confronti del Meropenem per la gestione delle infezioni intraddominali complicate (*van Duin D, Bonomo RA, 2016*).

CEFTOLOZANO/TAZOBACTAM. Il secondo antibiotico oggetto di questo studio è Ceftolozano/Tazobactam (C/T) che include in un'unica formulazione una nuova cefalosporina di quinta generazione con un inibitore delle beta-lattamasi di tipo beta-lattamico (*van Duin D, Bonomo RA, 2016*). Ceftolozano ha una struttura chimica simile a quella di Ceftazidime, eccezion fatta per la presenza di una catena laterale in posizione-3 a livello del nucleo "cefem", cosa che gli conferisce un'ottima azione anti-pseudomonas. Trattandosi di un beta-lattamico, Ceftolozano esercita un'azione battericida del tutto sovrapponibile a quella descritta per Ceftazidime (*Zhanel GG et al, 2014*).

Tazobactam, invece, si lega irreversibilmente alle beta-lattamasi, "proteggendo" la molecola antibiotica dall'azione di questi enzimi batterici. L'aggiunta di questo inibitore estende lo spettro di questo farmaco alla maggior parte dei batteri produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (*Zhanel GG et al., 2014*). Tuttavia, a differenza di Avibactam, non è in grado di bloccare le carbapenemasi del gruppo KPC (*Stachyra T et al., 2009*).

Lo spettro antimicrobico di C/T rimane, comunque, sostanzialmente simile a quello già esposto per CZA, quindi con una preferenza verso batteri Gram– e una spiccata predilezione contro *P. aeruginosa* (van Duin D, Bonomo RA, 2016).

Le tipologie di infezioni per cui è stato pensato questo nuovo farmaco sono: le infezioni urinarie complicate, le infezioni intraddominali complicate e le polmoniti associate a ventilazione (Zhanel GG et al., 2014).

Farmacocinetica C/T. Per quanto riguarda la farmacocinetica possiamo affermare che anche per questo antibiotico è disponibile la sola via di somministrazione endovenosa, la concentrazione plasmatica raggiunge il suo picco dopo circa un'ora dall'inizio dell'infusione. Il volume di distribuzione di C/T si aggira intorno ai 13 litri, simile a quello dei liquidi extracellulari, escludendo la possibilità che vi siano sedi d'accumulo del farmaco. Ha un'emivita di quasi 3 ore, cosa che spiega anche per questo farmaco, la necessità di somministrazione ogni 8 ore; l'escrezione avviene per via renale, dopo aver subito un minimo metabolismo (van Duin D, Bonomo RA, 2016).

Studi clinici. Studi di fase 3 hanno messo a confronto l'efficacia di C/T e Levofloxacin nella cura di infezioni urinarie complicate ed hanno evidenziato una superiorità di C/T sia nell'analisi intention-to-treat che nell'analisi per-protocol. Gli eventi avversi sono stati simili per frequenza nei due gruppi di studio: il 5-6% dei pazienti ha sviluppato cefalea, il 3-4% stipsi (Wagenlehner FM et al., 2015).

Altri due grandi studi di fase 3 randomizzati hanno messo a confronto C/T associato a Metronidazolo e Meropenem nella cura delle infezioni intraddominali complicate. Da questi si evince che nei pazienti trattati col nuovo C/T il tasso di cura è stato leggermente più basso (83% contro 87%), una differenza valutata come non statisticamente significativa (Solomkin J et al., 2015).

MEROPENEM/VABORBACTAM. L'ultimo antibiotico oggetto di questo studio è Meropenem/Vaborbactam (M/V); si tratta di una combinazione di carbapenemico con un nuovo inibitore delle beta-lattamasi. Meropenem, essendo un antibiotico beta-lattamico, esercita, come già accennato, un'azione diretta contro l'enzima PBP, inibendo una tappa fondamentale per la sintesi del peptidoglicano (Young R. Lee, Baker NT, 2018). Diversamente, Vaborbactam è un inibitore non beta-lattamico delle beta-lattamasi che esercita un effetto particolarmente potente nei confronti non solo delle carbapenemasi di classe A in cui rientra l'enzima KPC, ma

anche nei confronti delle beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL) e beta-lattamasi di classe C (Zhanel GG et al., 2018). In questo modo, Vaborbactam estende ulteriormente lo spettro di Meropenem anche nei confronti di quei batteri Gram- produttori di carbapenemasi. Tuttavia, non è in grado di bloccare le metallo-carbapenemasi (carbapenemasi di classe B) e le carbapenemasi di classe D (enzimi OXA) (Young R. Lee, Baker NT, 2018).

I principali microorganismi contro cui è stato pensato questo nuovo farmaco sono quelli appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae, in particolare carbapenemasi secernenti, mentre non è migliorata l'attività verso batteri quali *P. aeruginosa* e *A. baumannii* rispetto al solo Meropenem (Jorgensen SCJ, Rybak MJ, 2018). Da uno studio in vitro eseguito su 11.559 ceppi di Enterobacteriaceae, è emerso che il 99,3% era inibito da M/V, mentre antibiotici messi a confronto nell'ambito del suddetto studio hanno mostrato una capacità di inibire dall'82 al 98% degli stessi ceppi. Tra i ceppi non inibiti da M/V rientravano batteri produttori di metallo-carbapenemasi ed enzimi OXA, che notoriamente sfuggono al blocco da parte di Vaborbactam (Pfaller MA et al., 2018).

M/V è attualmente indicato da parte della FDA nel trattamento delle infezioni urinarie complicate, incluse le pielonefriti, causate da *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* multiresistenti, secernenti carbapenemasi del tipo delle KPC; comunque, grazie ad ulteriori studi, è molto probabile che nel futuro il suo impiego venga esteso anche ad altre tipologie di infezioni (Young R. Lee, Baker NT, 2018).

Farmacocinetica M/V. Per quanto riguarda i dati farmacocinetici di M/V, si può dire che la somministrazione avviene per via endovenosa; ha un volume di distribuzione pari a circa 18 litri, indicando una buona diffusione a livello dei liquidi extracellulari. La tendenza a legare proteine plasmatiche varia molto tra Meropenem e Vaborbactam, infatti mentre il primo ha una scarsa propensione a legarsi alle proteine (2%), il secondo viaggia legato a proteine per il 33%. La clearance di Vaborbactam avviene per circa l'85% per via renale, mentre per il Meropenem la clearance renale riguarda circa il 70% della totale. Per questi motivi è indispensabile una correzione della dose tanto maggiore quanto lo è il grado di insufficienza renale, a partire dai pazienti con filtrato glomerulare stimato inferiore a 50ml/min (Young R. Lee, Baker NT, 2018). In uno studio di fase 1, la somministrazione di una singola dose di M/V in soggetti adulti con vario grado di insufficienza renale, ha dimostrato che una riduzione del filtrato glomerulare ha un impatto simile sia sulla clearance di Meropenem che su quella di Vaborbactam; ciò suggerisce che la riduzione della dose deve avvenire in modo simile per queste due molecole quando si fa un aggiustamento in pazienti nefropatici (Rubino CM et al., 2018).

Studi clinici. M/V è stato studiato in due trials clinici di fase 3; il primo (TANGO I) ha confrontato l'efficacia di M/V con Piperacillina/Tazobactam nella terapia di infezioni urinarie complicate, tra cui anche pielonefriti. M/V è stato somministrato al dosaggio di 2g-2g con infusioni ogni 8 ore per 10 giorni; alla fine della terapia, M/V si è dimostrato superiore sulla base della valutazione degli outcomes che comprendevano: miglioramento o risoluzione dei sintomi ed eradicazione microbiologica (*Petty LA et al, 2018*). Un potenziale limite di questo studio è stata la scelta di escludere quei pazienti con eGFR <30ml/min, piuttosto che includerli aggiustando le dosi (*Young R Lee, Baker NT, 2018*).

Il secondo trial clinico (TANGO II) ha messo a confronto M/V con la miglior terapia disponibile per il trattamento di varie infezioni (come pielonefriti, infezioni intraddominali, polmoniti, batteriemie) scatenate da Enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE). Sono stati inclusi pazienti infetti da batteri CRE evidenziati da esami colturali o test molecolari, mentre sono stati esclusi quei pazienti sottoposti a più di 24 ore di terapia efficace, con infezioni a rischio di vita e con infezioni da batteri produttori di metallo-carbapenemasi. Il trattamento con M/V è risultato avere percentuali di cura più elevate alla fine della terapia rispetto agli antibiotici a confronto (64,3% contro il 33,3%); la mortalità dopo 28 giorni era del 17,9% nel gruppo trattato con M/V e del 33,3% nel gruppo di controllo. Ciò a chiara dimostrazione del fatto che il trattamento con M/V si associa non solo ad una maggiore percentuale di cura, ma anche ad una riduzione del tasso di mortalità (*Kaye KS et al., 2017*).

In generale, gli eventi avversi registrati associati alla somministrazione di M/V sono tipicamente lievi, nello studio TANGO II nessun paziente ha sviluppato gravi reazioni, inoltre il trattamento con M/V è risultato avere minor nefrotossicità rispetto agli antibiotici di controllo. Nello studio TANGO I, gli eventi avversi più comuni sono stati: cefalea, diarrea e flebite nel sito di infusione (*Kaye KS et al., 2017*).

Al netto di questi dati, questo nuovo antibiotico appare essere molto promettente, in quanto rispetto ad altri antibiotici che coprono batteri CRE, quali aminoglicosidi o Colistina, affianca ad un'ottima efficacia, assenza di eventi avversi significativi (*Young R Lee, Baker NT, 2018*).

MATERIALI E METODI

Per quanto riguarda la costruzione di questo studio, ci siamo serviti di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* produttori di carbapenemasi KPC isolati clinicamente dal laboratorio di Microbiologia Clinica della Azienda Ospedaliera Universitaria Ospedali Riuniti di Ancona, di preparati contenenti le combinazioni dei 3 antibiotici testati (strisce graduate per E-Test e polvere antibiotica per la tecnica della microdiluizione in brodo, quest'ultima solo per CZA e C/T).

Infine, ci siamo serviti di tutta la strumentazione necessaria per l'esecuzione sia della tecnica di microdiluizione in brodo che dell'E-test al fine di valutare in modo quantitativo il valore della Minima Concentrazione Inibente (MIC).

2.1 Microdiluizione in brodo

Per la microdiluizione in brodo abbiamo utilizzato:

- piastre microtitre da 96 pozzetti sterili (una per ciascun antibiotico);
- puntali sterili monouso;
- piastre Petri vuote sterili;
- pipetta multicanale;
- micropipette a volume variabile;
- anse sterili monouso;
- provette contenenti brodo Cation-Adjusted Mueller-Hinton (MH) per la diluizione dell'antibiotico;
- provette contenenti brodo MH per la preparazione dell'inoculo batterico;
- brodoculture del microorganismo da esaminare;
- spettrofotometro;
- incubatore con temperatura di circa 37°C.

Il primo passo per l'esecuzione di questa tecnica è la preparazione della microtitre con brodo MH; si versa dapprima del brodo su una piastra Petri in condizioni di sterilità dopodiché, con la pipetta multicanale, si vanno a prelevare 50 microlitri di brodo da inoculare in ciascun pozzetto (Fig.5)

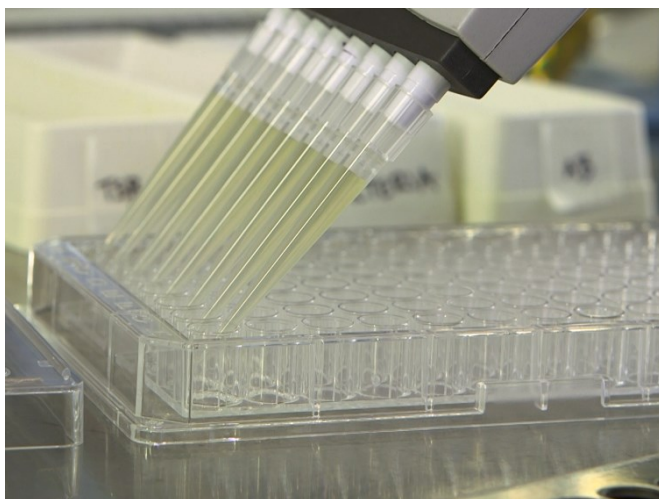


Fig.5-Preparazione piastra microtitre

Successivamente, va preparata la soluzione madre composta da brodo MH e dall'antibiotico da saggiare ad una concentrazione di 5000 microgrammi/ml. Le concentrazioni di antibiotico da saggiare per la MIC (esprese in microgrammi/ml) sono: 256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125. L'ultima colonna della piastra microtitre rappresenta il controllo di crescita e non deve contenere antibiotico.

Lo step successivo consiste nella diluizione dell'antibiotico a partire dalla soluzione madre a 5000 microgrammi/ml; si inizia con l'intento di preparare una soluzione di antibiotico ad una concentrazione quadrupla (1024) rispetto a quella più elevata che si vuole saggiare (256). Per ottenere questa soluzione a concentrazione quadrupla viene impiegato il principio per cui $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$, in questo modo si calcola quanto si deve prelevare dalla soluzione antibiotica madre (5000 microgrammi/ml) per ottenere un determinato volume di soluzione antibiotica a concentrazione 1024 microgrammi/ml. Da questa nuova soluzione preparata con MH, si aggiungono 50 microlitri ai pozzetti (solo quelli della prima colonna) della piastra microtitre già contenenti 50 microlitri di solo brodo MH, così facendo si otterranno i pozzetti della prima colonna con 100 microlitri di soluzione antibiotica a 512 microgrammi/ml.

A questo punto si procede con la diluizione scalare in micropiastra, ovvero con la micropipetta multicanale si va a mescolare il contenuto della prima colonna di pozzetti, tramite prelievo di 50 microlitri, col contenuto dei pozzetti della seconda colonna. Si procede allo stesso modo anche per la diluizione delle colonne successive di pozzetti fino alla colonna 11. Una volta arrivati a questo punto si dovrà avere l'accortezza di gettar via gli ultimi 50 microlitri di soluzione, evitando di aggiungerli al pozzetto della colonna 12, che non dovrà contenere antibiotico in quanto controllo di crescita batterica.

Al termine di questa procedura, tutte le colonne conterranno una concentrazione antibiotica doppia rispetto a quella finale da saggiare. Si deve proseguire preparando gli inoculi di

sospensione batterica con i singoli ceppi da esaminare. Questa sospensione batterica, che andrà inoculata dentro i pozzetti della microtitre, deve avere una concentrazione standardizzata pari a $1 \cdot 10^6$ CFU/ml, perciò sarà fondamentale diluire opportunamente la brodocoltura batterica; per misurare la concentrazione della brodocoltura ci serviamo dello spettrofotometro impostato ad una lunghezza d'onda di 625 nanometri. Quindi, prepariamo il “bianco” misurando l'assorbanza del brodo MH da solo e azzerando lo strumento, dopodiché, preleviamo una quota (1 ml) dalla brodocoltura precedentemente diluita e ne misuriamo la densità ottica (torbidità) che dovrà essere pari a 0,100 (accettabile range tra 0,080 e 0,120), cioè quel valore di densità ottica che corrisponde approssimativamente ad una concentrazione di $1 \cdot 10^8$ CFU/ml. Una volta ottenuta con questo procedimento una sospensione a tale concentrazione, dovremo procedere diluendo la nostra brodocoltura di 100 volte, prelevando 50 microlitri di sospensione batterica e mescolandoli con 5ml di brodo MH, così facendo avremo a disposizione una concentrazione pari a $1 \cdot 10^6$ CFU/ml.

Arrivati a questo punto, si dovranno inoculare 50 microlitri da ciascuna delle brodoculture batteriche standardizzate, contenenti i vari ceppi da esaminare, in ognuna delle righe orizzontali della microtitre (in modo tale che ogni riga corrisponda ad uno specifico ceppo batterico) che andranno aggiunti ai 50 microlitri già presenti e contenenti concentrazioni decrescenti di antibiotico. In questo modo la concentrazione batterica al termine dell'allestimento finale del test è pari a circa $5 \cdot 10^5$ CFU/ml; infine si va ad incubare il tutto a 37°C per 24 ore.

Al termine dell'incubazione, si andrà ad esaminare attentamente la piastra microtitre con lo scopo di determinare, per ogni ceppo, la più bassa concentrazione di antibiotico alla quale non si osserva crescita visibile (Fig.5); questa concentrazione corrisponde alla Minima Concentrazione Inibente (MIC).



Fig.6-Crescita batterica nei pozzetti

Al fine di controllare la qualità di tutta la procedura eseguita, si è andati a verificare che la MIC dei ceppi di controllo per le Enterobacteriaceae (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *K. pneumoniae* 700603) fosse nei range stabiliti dalle tabelle di riferimento EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Per interpretare la sensibilità o resistenza di ogni singolo ceppo nei confronti delle molecole antibiotiche testate, si sono confrontati i valori di MIC ottenuti con i breakpoint clinici stabiliti dall'EUCAST: i breakpoint stabiliscono quei valori di MIC per i quali possiamo considerare un dato ceppo sensibile, intermedio o resistente ad un determinato antibiotico. Questi valori riflettono l'efficacia di un antibiotico nella pratica clinica: nel caso di un ceppo sensibile, la terapia con quell'antibiotico sarà verosimilmente efficace, mentre nel caso di un ceppo resistente, la terapia non condurrà all'eliminazione del patogeno e sarà pertanto inefficace.

2.2 E-Test

Per l'esecuzione dell'E-Test ci siamo serviti dei seguenti materiali:

- terreni di coltura Mueller-Hinton Agar;
- provette sterili;
- brodo MH per la diluizione degli inoculi di ceppi batterici da esaminare;
- pipette a volume variabile;
- puntali sterili monouso;
- anse sterili monouso;
- pinze sterili monouso;
- tamponi sterili monouso;
- strisce imbibite di concentrazioni predefinite e crescenti di antibiotico (CZA, C/T e M/V);
- spettrofotometro;
- incubatore a temperatura di 37°C.

Per prima cosa, vengono preparati 2 ml di sospensione batterica in brodo MH per ciascun ceppo da esaminare in modo da ottenere una concentrazione standard di circa $1 \cdot 10^8$ CFU/ml; per fare questo viene impiegato lo spettrofotometro impostato alla lunghezza d'onda di 625 nanometri. Quindi, si prepara il "bianco" misurando l'assorbanza del solo brodo MH e azzerando lo strumento; successivamente, si preleva 1 ml da ciascuna brodocoltura batterica e per ciascuna viene misurata la densità ottica che deve risultare di 0,100 (accettabile range tra 0,080 e 0,120), valore corrispondente ad una concentrazione di circa $1 \cdot 10^8$ CFU/ml.

Una volta ottenute queste brodocolture a concentrazione standard, vi immergiamo un tampone sterile monouso e lo strisciamo uniformemente sulla superficie sterile dell'agar MH avendo cura di passare in ogni punto della sua superficie almeno due volte. Questa metodica permette di avere sulla superficie della piastra Petri una quantità costante ed uniforme di inoculo batterico. Si prepara una piastra per ogni ceppo batterico che occorre saggiare. Su questi terreni andremo a posizionare le strisce contenenti gli antibiotici verso cui valutare sensibilità o resistenza dei ceppi in studio. La striscia di e-test permette di effettuare una valutazione semiquantitativa: la concentrazione dell'antibiotico è infatti scalare lungo la striscia, e parte da concentrazioni basse (0,06 microgrammi/ml) per arrivare a concentrazioni elevate (256 microgrammi/ml). Operativamente, andiamo innanzitutto a verificare l'integrità dell'involucro contenente le strisce, dopodiché apriamo l'involucro facendo attenzione a non toccare la striscia, con una pinza sterile la afferriamo e la applichiamo sulla superficie dell'agar orientata con la faccia graduata verso l'operatore. È sempre bene assicurarsi di aver fatto aderire completamente la striscia alla superficie dell'agar esercitandovi sopra una lieve pressione con la pinza sterile e una volta fatta aderire, non bisogna spostarla o muoverla.

Le piastre con agar così allestite andranno in incubatore per circa 24 ore alla temperatura di 37°C, dopodiché si dovranno leggere i risultati ottenuti e ricavare i valori di MIC dei tre antibiotici verso i ceppi in esame; per fare questo sarà necessario individuare l'alone di crescita formatosi attorno alla striscia graduata e identificare il punto in cui questo la interseca (Fig.7). La minima concentrazione antibiotica indicata sulla striscia graduata, in grado di inibire la crescita corrisponderà al valore di MIC.

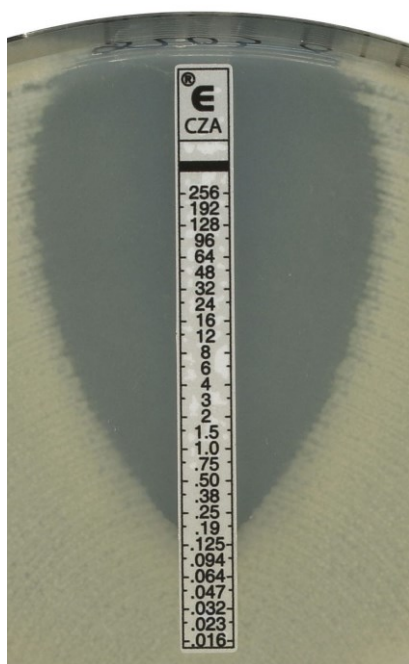


Fig.7-Alone d'inibizione di crescita attorno alla striscia e-test

Infine, andremo a confrontare i valori di MIC con gli attuali breakpoint messi a disposizione da parte dell'EUCAST, in modo da poter categorizzare i singoli ceppi come resistenti o sensibili ad un dato antibiotico.

Come per la metodica della microdiluizione in brodo, anche per l'E-Test è necessario avere un controllo di qualità della procedura attuata, per questo motivo tra i ceppi saggiati sono sempre stati inclusi i ceppi di controllo per le Enterobatteriaceae (*E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* ATCC 27853). I risultati ottenuti dall'esperimento sono stati accettati solo qualora le MIC dei ceppi di controllo siano risultate all'interno del range atteso stabilito dall'EUCAST.

OBIETTIVO

L'obiettivo che questo studio si propone è quello di andare a valutare e quantificare la problematica della resistenza antibiotica nei confronti di tre farmaci di ultima generazione e di recente introduzione nella pratica ospedaliera (Ceftazidime/Avibactam, Ceftolozano/Tazobactam e Meropenem/Vaborbactam) da parte di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* produttori di carbapenemasi del tipo KPC che sono stati isolati da pazienti ricoverati nella Clinica di Malattie Infettive Tropicali dell'azienda Ospedaliera Universitaria di Ancona. Così facendo, si vuole mettere in evidenza un fenomeno che nei prossimi anni, con l'ulteriore impiego nella realtà clinica di questi nuovi antibiotici andrà, con ogni probabilità, ingigantendosi ulteriormente privandoci, in modo sempre più significativo, di armi importanti nella lotta contro uno dei microorganismi patogeni nosocomiali più comuni.

RISULTATI

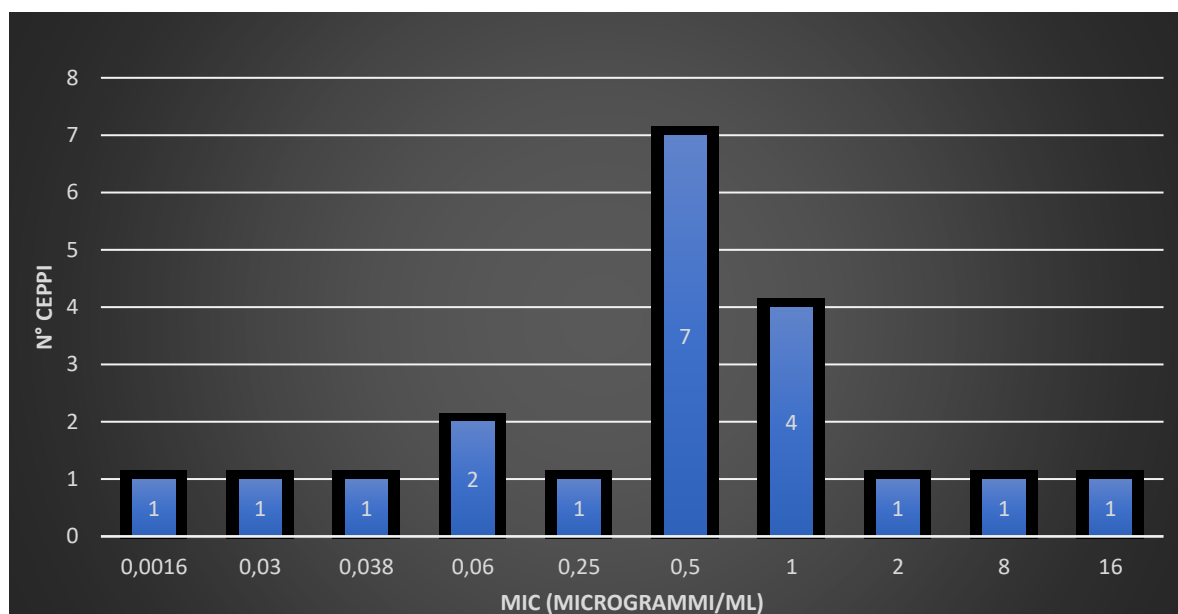
Si riportano nella tabella seguente i valori di MIC misurati in microgrammi/ml ottenuti sperimentalmente, saggiando i vari ceppi di *K. pneumoniae* con i tre antibiotici sopracitati.

4.1 Tabella dei risultati

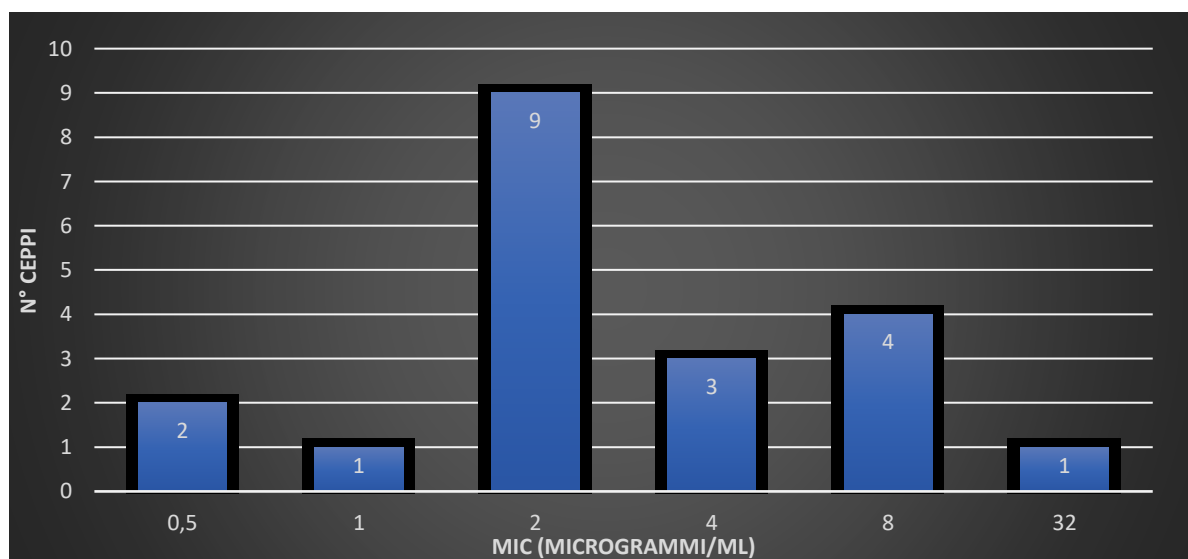
Ceppo Batterico	M/V (MIC)	CZA (MIC)	C/T (MIC)
ATCC 700603	0,064	0,5	1
ATCC 25922	0,023	0,125	0,5
KPC 386584	0,5	2	>256
KPC 407623	0,5	2	>256
KPC 420784	0,5	0,5	64
KPC 421584	8	8	>256
KPC 345073	0,5	2	128
KPC 347264	2	2	64
KPC 346519	< 0,0016	1	32
KPC 342250	16	32	128
KPC 345990	0,038	2	128
E. coli KPC 346522	0,03	0,5	8
KPC 357014	0,5	8	128
KPC 358232	0,25	2	256
KPC 358139	1	2	128
KPC 34759	0,5	4	256
KPC 359426	0,5	8	256
KPC 357808	0,06	4	256
KPC 357833	0,06	4	256
KPC 351652	1	2	64
KPC 356657	1	8	>256
KPC 343588	1	2	64

4.2 Rappresentazione grafica dei risultati

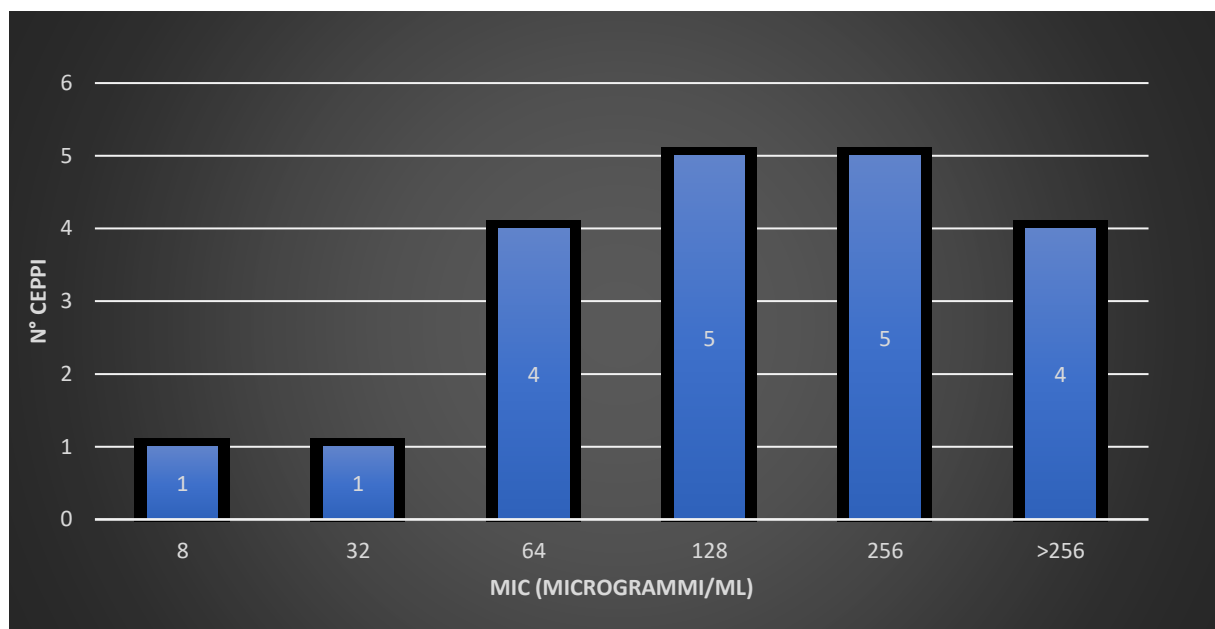
Qui di seguito è stata rappresentata graficamente la distribuzione dei valori di MIC tra i ceppi presi in esame per l'antibiotico Meropenem/Vaborbactam.



Nel grafico seguente vengono illustrati i dati relativi alle MIC dei ceppi esaminati per l'antibiotico Cefotazidime/Avibactam.



Infine, andiamo a visualizzare i risultati inerenti alle MIC dell'ultimo antibiotico, Ceftolozano/Tazobactam, il quale ha uno spettro antimicrobico rivolto preferenzialmente verso *P. aeruginosa*.



4.3 Discussione dei risultati

Come ampiamente descritto nella sezione introduttiva, le Enterobacteriaceae hanno dimostrato una grande versatilità e capacità di adattamento in ambienti come i reparti ospedalieri, dove l'elevata pressione selettiva proveniente dagli impiegatissimi trattamenti antibiotici, ha generato ceppi batterici resistenti ad un numero sempre maggiore di molecole antimicrobiche. Una delle specie nosocomiali maggiormente interessate dal fenomeno della multiresistenza è indubbiamente *K. pneumoniae*. I meccanismi che questi batteri mettono in atto sono molteplici e differenti l'uno dall'altro, tutti finalizzati a sfuggire l'azione dei vari antibiotici; nei confronti degli antibiotici beta-lattamici, su cui questo studio ha voluto focalizzare l'attenzione, il meccanismo principale è senz'altro la produzione di molecole enzimatiche ad azione beta-lattamasica. Questi enzimi legano ed inattivano il core della molecola beta-lattamica, ovvero l'anello beta-lattamico, rendendola del tutto inefficace nello svolgere la propria attività battericida (Bush K., 2018). In questo studio si è voluto approfondire il ruolo svolto da una particolare beta-lattamasi, cioè la carbapenemasi. Questa classe di enzimi solo negli ultimi decenni ha conosciuto un'ampissima diffusione tra i batteri appartenenti alla famiglia delle

Enterobacteriaceae, grazie alla sua codificazione da parte di elementi genetici mobili, quali plasmidi o trasposoni, conferendo a questi batteri uno spettro di resistenza estremamente ampio nei confronti degli antibiotici beta-lattamici, persino verso la classe dei carbapenemici (Diene. S.M. and J-M Rolain, 2014). In questo studio abbiamo esaminato la sensibilità o la resistenza dei ceppi di *K. pneumoniae* produttori di KPC, la principale carbapenemasi di classe A, nei confronti di tre beta-lattamici (due cefalosporine e un carbapenemico) associati ad inibitori di beta-lattamasi: Tazobactam che dai dati in merito presenti in letteratura non ha dimostrato alcuna efficacia nei confronti di carbapenemasi di qualsiasi classe, Avibactam e Vaborbactam che al contrario si sono dimostrati, dai dati noti in letteratura, efficaci nel blocco delle serin-carbapenemasi tra cui la KPC.

Passiamo all'analisi dei risultati in nostro possesso, ottenuti saggiando 20 ceppi batterici di cui 19 *K. pneumoniae* secernenti KPC e 1 ceppo di *E. coli* anch'esso produttore di KPC.

I valori di MIC ottenuti saggiando i suddetti ceppi con Meropenem/Vaborbactam sono i seguenti:

- KPC 346519: <0,0016 microgrammi/ml;
- KPC *E. coli* 346522: 0,03 microgrammi/ml;
- KPC 345990: 0,038 microgrammi/ml;
- KPC 357808 e KPC 357833: 0,06 microgrammi/ml;
- KPC 358232: 0,25 microgrammi/ml;
- KPC 386584, KPC 407623, KPC 420784, KPC 345073, KPC 357014, KPC 34759 e KPC 359426: 0,5 microgrammi/ml;
- KPC 358139, KPC 351652, KPC 356657 e KPC 343588: 1 microgrammo/ml;
- KPC 347264: 2 microgrammi/ml;
- KPC 421584: 8 microgrammi/ml;
- KPC 342250: 16 microgrammi/ml.

Confrontando questi valori di MIC con i breakpoint disponibili stabiliti dall'EUCAST, si può affermare che 19 ceppi su 20 produttori di KPC risultano sensibili ($MIC \leq 8$ microgrammi/ml) al Meropenem/Vaborbactam, con una percentuale di sensibilità del 95%. Il valore di MIC_{50} , ovvero la concentrazione minima di antibiotico con cui si è ottenuta l'inibizione della crescita del 50% dei ceppi in studio, è risultato essere pari a 0,5 µg/ml. Il valore di MIC_{90} , ovvero la concentrazione minima con cui si è inibita la crescita del 90% dei ceppi in esame, è risultato essere di 2 µg/ml. I dati disponibili nella letteratura scientifica evidenziano per M/V, nei confronti di *K. pneumoniae*, un valore di MIC_{50} e MIC_{90} rispettivamente di 0,12 µg/ml e 1 µg/ml

che risultano essere, tra quelli registrati per le Enterobacteriaceae, i valori più elevati di MIC₅₀ e MIC₉₀ verso M/V (*B. Viaggi, C. Tascini, GM Rossolini, Enterobacterales multiresistenti dal laboratorio alla clinica, 2018*). Le percentuali di sensibilità di *K. pneumoniae* produttrice di KPC, verso M/V, che emergono dalla letteratura sono del 99%. I nostri dati nel complesso si discostano parzialmente, da quelli presenti nella ben più ampia raccolta dati presente in letteratura.

I valori di MIC ottenuti saggiando i ceppi con Ceftazidime/Avibactam sono i seguenti:

- KPC 420784 e KPC *E. coli* 346522: 0,5 microgrammi/ml;
- KPC 346519: 1 microgrammo/ml;
- KPC 386584, KPC 407623, KPC 345073, KPC 347264, KPC 345990, KPC 358232, KPC 358139, KPC 351652 e KPC 343588: 2 microgrammi/ml;
- KPC 34759, KPC 357808 e KPC 357833: 4 microgrammi/ml;
- KPC 421584, KPC 357014, KPC 359426 e KPC 356657: 8 microgrammi/ml;
- KPC 342250: 32 microgrammi/ml.

I valori di MIC ottenuti confrontati con i breakpoint EUCAST ci dicono che dei 20 ceppi esaminati solo uno è risultato resistente a Ceftazidime/Avibactam (> 8µg/ml), avendo una MIC di 32µg/ml. Anche verso questa combinazione antibiotica, il tasso di sensibilità che abbiamo rilevato è risultato essere del 95%. Il valore di MIC₅₀ è di 2µg/ml, mentre il valore di MIC₉₀ è 8µg/ml. I dati forniti dalla letteratura mostrano per questa combinazione antibiotica un valore di MIC₅₀ e MIC₉₀, verso le Enterobacteriaceae produttrici KPC, rispettivamente di 0,5µg/ml e 2µg/ml. Il tasso di sensibilità si aggira intorno al 98% (*van Duin D., Bonomo RA, 2016*). Da questo confronto emerge con ancor più forza la diversità tra i nostri dati locali e quelli disponibili in letteratura; evidentemente le *K. pneumoniae* KPC produttrici isolate dal laboratorio di Microbiologia Clinica dell'azienda ospedaliera di Ancona mostrano una maggior resistenza verso queste nuove molecole rispetto a quelle di altre realtà ospedaliere.

Per quanto riguarda i dati ricavati dal saggio con Ceftolozano/Tazobactam, i risultati sono i seguenti:

- KPC *E. coli* 346522: 8 microgrammi/ml;
- KPC 346519: 32 microgrammi/ml;
- KPC 420784, KPC 347264, KPC 351652 e KPC 343588: 64 microgrammi/ml;
- KPC 345073, KPC 342250, KPC 345990, KPC 357014 e KPC 358139: 128 microgrammi/ml;

- KPC 358232, KPC 34759, KPC 359426, KPC 357808 e KPC 357833: 256 microgrammi/ml;
- KPC 386584, KPC 407623, KPC 421584 e KPC 356657: >256 microgrammi/ml.

Utilizzando i breakpoint EUCAST emerge il fatto che tutti i ceppi presi in esame sono resistenti a Ceftolozano/Tazobactam (MIC > 2µg/ml). La MIC₅₀ e la MIC₉₀ calcolate sono risultate essere rispettivamente di 128µg/ml e >256µg/ml. Non possiamo confrontare i nostri dati con quelli in letteratura in quanto assenti, poiché è noto che questa combinazione antibiotica è inadatta al trattamento delle Enterobatteriaceae KPC secernenti. Questo dato non deve meravigliare, infatti la molecola Tazobactam non esercita alcuna azione inibitoria verso le carbapenemasi, le quali potranno così idrolizzare la cefalosporina di quinta generazione a cui l'inibitore si trova associato. Da una parte Tazobactam è utile in quanto amplia lo spettro antimicrobico nei confronti della gran parte di quei ceppi produttori di beta-lattamasi, dall'altra risulta inutile contro i ceppi KPC secernenti. Quindi, col nostro studio abbiamo confermato questo dato, che risulta assolutamente concorde con quanto già ampiamente espresso in letteratura.

In conclusione, è possibile affermare che nel complesso i nostri dati, per quanto riguarda la risposta a M/V e soprattutto a CZA, si discostano significativamente da quelli raccolti in letteratura. Un primo aspetto meritevole di attenzione è la presenza di un ceppo già resistente nei confronti di due nuove molecole quali CZA e M/V, il che assume una gravità ancora maggiore se si pensa che M/V è disponibile nella pratica clinica in Italia solo da pochi mesi (7 aprile 2020). Questo significa che negli anni a venire il problema sarà destinato ad amplificarsi ulteriormente, perciò sarebbe utile indagare con ulteriori studi quali meccanismi sottendono queste resistenze. Inoltre, il fatto che lo stesso isolato (*K. pneumoniae* KPC 342250) sia resistente contemporaneamente a M/V e CZA suggerisce che il meccanismo di resistenza queste nuove combinazioni possa essere lo stesso. Le ipotesi possibili sono diverse:

- Mutazioni puntiformi a livello dei geni che codificano per la KPC, che rendono il bersaglio non più riconoscibile da parte dei nuovi inibitori;
- Aumentata sintesi di enzimi ad attività carbapenemasi, tale da rendere meno efficace l'azione di Vaborbactam o Avibactam;
- Mutazioni a livello dei geni che codificano per le porine che mediano l'ingresso dell'inibitore a livello della membrana plasmatica esterna del batterio, in modo da impedire l'entrata della molecola, prevenendone il legame con la KPC;
- Mutazioni a livello di geni che codificano per pompe di efflusso, le quali, essendo espresse sulla membrana plasmatica, andrebbero a mediare un trasporto attivo verso

l'esterno della cellula batterica abbattendo le concentrazioni di inibitore all'interno del batterio.

Inoltre, sarebbe interessante determinare la localizzazione degli elementi genetici che codificano per questi fattori, distinguendo una resistenza costituzionale (localizzazione a livello del cromosoma batterico), da una resistenza acquisita (localizzazione a livello di elementi genetici mobili).

Un secondo aspetto su cui vale la pena focalizzare l'attenzione è la differenza tra i ceppi di *K. pneumoniae* isolati dai pazienti della Clinica di Malattie Infettive di Ancona e quelli di altre realtà ospedaliere. A testimonianza del crescente problema legato a infezioni da isolati di *K. pneumoniae* KPC produttori possiamo portare diversi studi presenti in letteratura, in particolare “*Clinical and epidemiological characteristics of KPC-producing Klebsiella pneumoniae from bloodstream infections in a tertiary referral center in Italy*” pubblicato nel 2019 da L. Brescini e coll. che inquadra anche alcune delle peculiarità della realtà dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Ancona. Evidenziando tassi di mortalità legati all'infezione da *K. pneumoniae* molto elevati compresi in un range dal 22% al 72%, da parte di una specie batterica che, in ambiente ospedaliero, è divenuta ormai endemica. Altro dato significativo che emerge è: una percentuale intorno al 96% di isolati di *K. pneumoniae* KPC produttori con resistenza completa al Meropenem (MIC >16µg/ml) e il restante 4% non suscettibile al Meropenem (MIC >8µg/ml). Le *K. pneumoniae* isolate nella nostra realtà ospedaliera appartengono a due ceppi principali: ST₅₁₂ e ST₃₀₇, quest'ultimo potrebbe, in un prossimo futuro, emergere come clone rilevante dal punto di vista clinico in molte realtà ospedaliere, data la presenza di numerose caratteristiche in grado di fornire un vantaggio nell'adattamento in ambiente ospedaliero. Questo ceppo presenta dei fattori di virulenza che sembrano giocare un ruolo centrale nel vantaggio adattativo a livello ambientale (L. Villa et al. 2017).

Il nostro studio fornisce una panoramica sull'attività delle nuove molecole nei confronti di patogeni nosocomiali. L'identificazione di un ceppo resistente a tutti i nuovi antibiotici beta-lattamici in esame deve mettere in guardia dal possibile uso di nuovi antibiotici: la recente commercializzazione infatti non garantisce l'efficacia della molecola stessa. Prima dell'utilizzo nella pratica clinica, la valutazione dell'attività degli antibiotici resta necessaria, soprattutto nel caso di nuovi antibiotici. L'utilizzo senza questo tipo di informazione potrebbe portare alla selezione di ceppi resistenti e alla conseguente inefficacia del trattamento in tempi relativamente brevi dalla commercializzazione.

Possiamo concludere sottolineando la necessità che i nostri dati forniscano lo stimolo per approfondire ulteriormente le problematiche legate a questo comune patogeno nosocomiale, al fine di caratterizzare nuovi meccanismi di resistenza, nuovi ceppi emergenti e affrontare una minaccia che è in continua evoluzione.

BIBLIOGRAFIA

- ***Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense.** M.K. Paczosa, J. Mecsas; *Microbiol and Mol Biol Rev* 2016; 80: 629-661.
- **Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species.** S.M Diene and J.-M. Rolain; *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 831-838.
- **Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozan/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations.** David van Duin and Robert A. Bonomo; *Clin Infect Dis* 2016; 63(2):234-241.
- **Lee YR, Baker NT. Meropenem-vaborbactam: a carbapenem and beta-lactamase inhibitor with activity against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(8):1411-1419.
- **Friedlander C. 1882. Über die scyzomyceten bei der acuten fibrosen pneumonie.** *Arch Pathol Anat Physiol Klin Med* 87: 319-324.
- **Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*.** *Front Cell Infect Microbiol*. 2018; 8:4.
- **Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, Hughes JM. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*.** *Infect Control*. 1985;6(2):68-74.
- **Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603.

- Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of Staphylococcus and Micrococcus species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol.* 1975;30(3):381-385.
- Davis TJ, Matsen JM. Prevalence and characteristics of Klebsiella species: relation to association with a hospital environment. *J Infect Dis.* 1974;130(4):402-405.
- Wolf B, Rey LC, Moreira LB, et al. Carriage of gram-negative bacilli in young Brazilian children with community-acquired pneumonia. *Int J Infect Dis.* 2001;5(3):155-159.
- Farida H, Severin JA, Gasem MH, et al. Nasopharyngeal carriage of Klebsiella pneumoniae and other Gram-negative bacilli in pneumonia-prone age groups in Semarang, Indonesia. *J Clin Microbiol.* 2013;51(5):1614-1616.
- Rose HD, Schreier J. The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora. *Am J Med Sci.* 1968; 255:228-236.
- Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis.* 2015; 26:26050. Published 2015 Feb 2.
- Afroza S. Neonatal sepsis-- a global problem: an overview. *Mymensingh Med J.* 2006;15(1):108-114.
- Mishra SK, Basukala P, Basukala O, Parajuli K, Pokhrel BM, Rijal BP. Detection of biofilm production and antibiotic resistance pattern in clinical isolates from indwelling medical devices. *Curr Microbiol.* 2015;70(1):128-134.
- Zolfaghari PS, Wyncoll DL. The tracheal tube: gateway to ventilator-associated pneumonia. *Crit Care.* 2011;15(5):310.
- Kalanuria AA, Ziai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU [published correction appears in Crit Care. 2016; 20:29. Zai, Wendy [corrected to Ziai, Wendy]]. *Crit Care.* 2014;18(2):208. Published 2014 Mar 18.
- Paganin F, Lilienthal F, Bourdin A, et al. Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor. *Eur Respir J.* 2004;24(5):779-785.
- Czaja CA, Scholes D, Hooton TM, Stamm WE. Population-based epidemiologic analysis of acute pyelonephritis. *Clin Infect Dis.* 2007;45(3):273-280.
- Laupland KB, Ross T, Pitout JD, Church DL, Gregson DB. Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection.* 2007;35(3):150-153.

- Rodríguez-Baño J, López-Cerero L, Navarro MD, Díaz de Alba P, Pascual A. Faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: prevalence, risk factors and molecular epidemiology. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(5):1142-1149.
- Kang CI, Kim SH, Bang JW, et al. Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *J Korean Med Sci.* 2006;21(5):816-822.
- Kim JK, Chung DR, Wie SH, Yoo JH, Park SW; Korean Study Group for Liver Abscess. Risk factor analysis of invasive liver abscess caused by the K1 serotype *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(1):109-111.
- Pan YJ, Fang HC, Yang HC, et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol.* 2008;46(7):2231-2240.
- Struve C, Roe CC, Stegger M, et al. Mapping the Evolution of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *mBio.* 2015;6(4): e00630. Published 2015 Jul 21.
- Standiford LR, Standiford TJ, Newstead MJ, et al. TLR4-dependent GM-CSF protects against lung injury in Gram-negative bacterial pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;302(5): L447-L454.
- Wu MF, Yang CY, Lin TL, et al. Humoral immunity against capsule polysaccharide protects the host from magA+ *Klebsiella pneumoniae*-induced lethal disease by evading Toll-like receptor 4 signaling. *Infect Immun.* 2009;77(2):615-621.
- Clements A, Tull D, Jenney AW, et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J Biol Chem.* 2007;282(21):15569-15577.
- Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí VJ, Tomás JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun.* 1992;60(6):2529-2535.
- Klemm P, Schembri MA. 2000. Fimbrial surface display systems in bacteria: from vaccines to random libraries. *Microbiology* 146(Part 12): 3025–3032.
- Shankar-Sinha S, Valencia GA, Janes BK, Rosenberg JK, Whitfield C, Bender RA, Standiford TJ, Younger JG. 2004. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen

contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. *Infect Immun* 72:1423–1430.

- Stahlhut SG, Struve C, Krogfelt KA, Reisner A. 2012. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65:350–359.
- Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. 2009. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infect Immun* 77:5016–5024.
- Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. 1998. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun* 66:2887–2894.
- Jagnow J, Clegg S. 2003. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology* 149:2397–2405.
- Francois P, Vaudaux P, Lew PD. 1998. Role of plasma and extracellular matrix proteins in the physiopathology of foreign body infections. *Ann Vasc Surg* 12:34–40.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. 1972. Iron binding proteins and infection. *Br J Haematol* 23:389–392.
- Carniel E. 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect* 3:561–569.
- Miethke M, Marahiel MA. 2007. Siderophore-based iron acquisition island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol Lett* 183:289–294.
- Bachman MA, Lenio S, Schmidt L, Oyler JE, Weiser JN. 2012. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. *mBio* 3: e00224 –11.
- Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. 8 June 2015. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. *Infect Immun*.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1–12.

- Hernandez-Alles S, Conejo M, Pascual A, Tomas JM, Benedi VJ, Martinez-Martinez L. 2000. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 46:273–277.
- Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 54:177–183.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440–458, table.
- Cuzon G, Naas T, Truong H et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1349–1356.
- Poirel L, Castanheira M, Carrer A et al. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2546–2551.
- Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 2011; 19: 588–595.
- Voulgari E, Poulou A, Koumaki V, Tsakris A. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? *Future Microbiol* 2013; 8: 27–39 41.
- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4: 608–620.
- Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E et al. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1998–2001.
- Rolain JM, Parola P, Cornaglia G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic? *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1699–1701.
- Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro Surveill* 2014; 19.
- Castanheira M, Mills JC, Costello SE, Jones RN, Sader HS. Ceftazidime-avibactam activity tested against Enterobacteriaceae isolates from U.S. hospitals (2011 to 2013) and characterization of beta-lactamase-producing strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:3509–17.

- Shirley M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs*. 2018;78(6):675-692.
- Das S, Armstrong J, Mathews D, Li J, Edeki T. Randomized, placebo-controlled study to assess the impact on QT/QTc interval of supratherapeutic doses of ceftazidime-avibactam or ceftaroline fosamil-avibactam. *J Clin Pharmacol* 2014; 54:331–40.
- Zhanel GG, Chung P, Adam H, et al. Ceftolozane/tazobactam: a novel cephalosporin/ β -lactamase inhibitor combination with activity against multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Drugs*. 2014;74(1):31-51.
- Stachyra T, Levasseur P, Pechereau MC, et al. In vitro activity of the β -lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and Enterobacteriaceae expressing KPC carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:326–9.
- Solomkin J, Hershberger E, Miller B, et al. Ceftolozane/tazobactam plus metronidazole for complicated intra-abdominal infections in an era of multidrug resistance: results from a randomized, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cIAI). *Clin Infect Dis* 2015; 60:1462–71.
- Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, et al. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem- β -Lactamase Inhibitor Combinations [published correction appears in *Drugs*. 2018 May 10]. *Drugs*. 2018;78(1):65-98.
- Jorgensen SCJ, Rybak MJ. Meropenem and Vaborbactam: Stepping up the Battle against Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Pharmacotherapy*. 2018;38(4):444-461.
- Pfaller MA, Huband MD, Mendes RE, Flamm RK, Castanheira M (2018) In vitro activity of meropenem-vaborbactam and characterization of carbapenem resistance mechanisms among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from the 2015 meropenem-vaborbactam surveillance program. *Int J Antimicrob Agents pii S0924-8579(18):30064–30065*.
- Rubino CM, Bhavnani SM, Loutit JS, Lohse B, Dudley MN, Griffith DC (2018) Single-dose pharmacokinetics and safety of meropenem-vaborbactam in subjects with chronic renal impairment. *Antimicrob Agents Chemother* 62(3): e02103-17.
- Petty LA, Henig O, Patel TS, Pogue JM, Kaye KS. Overview of meropenem-vaborbactam and newer antimicrobial agents for the treatment of carbapenem-

resistant Enterobacteriaceae. *Infect Drug Resist.* 2018; 11:1461-1472. Published 2018 Sep 12.

- Kaye KS, Vazquez J, Mathers A et al (2017) Meropenem-vaborbactam (VABOMERE) vs. best available therapy for CRE infections: TANGO II randomized, controlled phase 3 study results abstract. IDWeek, San Diego, p 1862.
- Bush K. 2018. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 62: e01076-18.
- B. Viaggi, C. Tascini, GM Rossolini, Enterobacterales multiresistenti dal laboratorio alla clinica, *EDIMES*; 2018; 42-43.
- Brescini, L., Morroni, G., Valeriani, C. et al. Clinical and epidemiological characteristics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in a tertiary referral center in Italy. *BMC Infect Dis* 19, 611 (2019).
- Villa L, Feudi C, Fortini D, et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microb Genom.* 2017;3(4): e000110. Published 2017 Apr 26.