



Allegato B

Protocollo operativo per la diagnosi, la sorveglianza e il controllo degli enterobatteri resistenti ai carbapenemi nelle strutture sanitarie e socio-sanitarie





Sommario

1. Premessa	2
2. Obiettivi	4
3. Sorveglianza e controllo	4
3.1 Misure di sorveglianza e controllo della trasmissione delle infezioni da CRE nelle strutture sanitarie..	4
3.1.1 Sorveglianza attiva delle colonizzazioni da CRE nelle strutture ospedaliere	4
3.2 Controllo della trasmissione in ambiente ospedaliero.....	5
3.2.2 Follow-up dei casi di colonizzazione/infezione	5
3.3 Cosa non è necessario fare di routine	6
3.4 Dimissione dei pazienti.....	6
3.5 Formazione informazione.....	7
Appendice 1: Protocolli microbiologici.....	8
Appendice 2: sorveglianza e controllo della trasmissione delle infezioni da CRE.....	15





1. Premessa

La diffusione di ceppi di *Enterobatteri* (*Enterobacteriaceae*, ora tassonomicamente definite *Enterobacterales*) resistenti ai carbapenemi (Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*-CRE), specialmente se produttori di carbapenemasi (Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae*-CPE), rappresenta non solo un problema clinico emergente e di grande rilevanza, perché tale resistenza è frequentemente associata a resistenze multiple a diverse classi di antibiotici (ceppi pan-resistenti), ma anche un problema di sanità pubblica, per la loro elevata capacità di diffusione clonale fra pazienti diversi, e per la capacità di trasmissione mediante elementi genetici mobili tra i diversi microrganismi.

Esistono diversi tipi di carbapenemasi: a) carbapenemasi a serina, quali gli enzimi di tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e di tipo OXA-48 carbapenemase; b) metallo- β -lattamasi, quali gli enzimi VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase), NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) e più raramente IMP (Imipenemase). Negli *Enterobatteri* i tipi di carbapenemasi più frequentemente rilevati sono quelli di classe A e B, che possono diffondersi mediante plasmidi (es. KPC e NDM). Più raramente la resistenza ai carbapenemi è dovuta all'iperproduzione di β -Lattamasi a spettro esteso (ESBL) o di enzimi AmpC associata a ridotta permeabilità alle porine, oppure a presenza di carbapenemasi di classe D quali le OXA-48. Attualmente il meccanismo di resistenza più frequentemente riscontrato nella Regione Veneto è mediato dal plasmide KPC, anche se sono in aumento le segnalazioni di carbapenemasi di classe B e D.

La percentuale di isolati di *Klebsiella pneumoniae* produttori di carbapenemasi è molto variegata con differenze significative tra i vari Paesi; in alcuni casi si sono verificate epidemie di larga scala che hanno coinvolto numerosi ospedali di una stessa regione, in altri contesti la presenza di questi microrganismi è divenuta endemica, mentre vi sono Paesi in cui il fenomeno è ancora sotto controllo.

Gli *Enterobatteri* sono frequentemente responsabili di infezioni comunitarie e infezioni correlate all'assistenza, causando cistiti, pielonefriti, batteriemie, polmoniti, peritoniti, meningiti, infezioni device-correlate. La mortalità a essi attribuita risulta elevata, in particolar modo nelle batteriemie, dove può raggiungere il 70%.

Essi possono colonizzare l'uomo (a livello cutaneo, tratto respiratorio e digerente), comportandosi come patogeni opportunisti nei soggetti a rischio.

Interventi attivi di controllo delle infezioni, (tempestiva identificazione dei casi di infezione e dei pazienti colonizzati, e la tempestiva attuazione di misure di prevenzione) risultano efficaci nell'eradicare o contenere fortemente la diffusione di questi microrganismi.

Nella Regione del Veneto, un'indagine effettuata presso tutte le strutture ospedaliere pubbliche e private ha permesso di evidenziare che gli isolamenti di CRE da emocoltura sono cresciuti da 336 (relativi a 192 pazienti) nel 2016 a 516 (relativi a 273 pazienti) nel 2017. Rapportando gli isolamenti al numero di giornate di degenza (ricoveri ordinari, sia per acuti sia in lungodegenza/riabilitazione), il tasso di pazienti con batteriemia da CRE è cresciuto nel biennio considerato da 0.49 a 0.70 per 10,000 gg di degenza.

Nella maggior parte delle strutture è attivo uno screening sistematico dei pazienti ricoverati in Terapia Intensiva; in alcune lo screening è esteso all'Oncoematologia, al Centro Trapianti, o ad altri reparti anche a seconda dell'epidemiologia locale. Alcuni ospedali hanno avuto difficoltà nel fornire i dati di screening relativi ai singoli pazienti (su cui il test può essere stato ripetuto più volte), per cui si forniscono i dati sui risultati complessivi dei test effettuati: sono risultati positivi a CPE l'11.2% dei test effettuati in Terapia Intensiva (2413/21595), il 6.2% nei Centri Trapianti (385/6219), il 3.3% in Oncoematologia (133/4013), e il 2.8% in altri reparti in cui era attivo uno screening sistematico (473/17006).

Valori di positività più elevati sono stati riportati nei risultati della sorveglianza attiva effettuata su pazienti considerati ad altro rischio. Le strategie adottate sono differenti nelle diverse strutture, nella maggior parte includono la valutazione dei contatti di pazienti con infezione/colonizzazione da CRE, con precedente nota positività a CRE, o trasferiti da altro ospedale; solo in un numero limitato di strutture la sorveglianza attiva è





condotta su pazienti con recente ricovero ospedaliero o provenienti da strutture residenziali per anziani. I risultati sul totale dei test condotti su pazienti ad alto rischio mostrano una positività del 14.6% in Area Medica, del 21.9% in Area Chirurgica, e del 7.0% in altri reparti ospedalieri.

2. Obiettivi

Il presente documento descrive le misure di controllo da applicare per il contenimento delle infezioni da Enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE) in accordo con le più recenti raccomandazioni, fornendo indicazioni pratiche per la diagnosi, la sorveglianza e l'interruzione della catena di trasmissione dei microrganismi in questione; viene affrontato inoltre anche il problema concernente l'uso inappropriato degli antibiotici. Per questo motivo, sono riportate in appendice (Appendice 1. Protocolli microbiologici) alcune note al referto microbiologico che, fornendo indicazioni per una corretta interpretazione dell'esame colturale e del suo significato clinico, potrebbero favorire un utilizzo più corretto degli antibiotici.

Non viene in questa sede affrontato l'aspetto terapeutico delle infezioni causate da questi microrganismi.

3. Sorveglianza e controllo

3.1 Misure di sorveglianza e controllo della trasmissione delle infezioni da CRE nelle strutture sanitarie

Tutte le strategie necessarie a ridurre e controllare le infezioni sostenute da CRE, affinché siano efficaci, devono essere tempestive e coinvolgere diversi aspetti dell'assistenza sanitaria come:

- corretta igiene delle mani;
- migliore igiene nelle strutture sanitarie (che includa decontaminazione, disinfezione, pulizia e sterilizzazione degli ambienti ospedalieri e delle apparecchiature);
- attività di formazione del personale sanitario ed informazione/educazione dei pazienti e dei visitatori;
- sorveglianza attiva delle infezioni;
- uso consapevole degli antibiotici.

In appendice (Appendice 2 Sorveglianza e controllo della trasmissione delle infezioni da CRE) sono riportate le misure di carattere generale, organizzativo ed assistenziale per la prevenzione e controllo della trasmissione di CRE.

3.1.1 Sorveglianza attiva delle colonizzazioni da CRE nelle strutture ospedaliere

L'impiego della sorveglianza attiva è uno strumento essenziale nel controllo delle infezioni da CRE, non solo nel corso di focolai epidemici, ma anche come misura routinaria, in particolare nei setting in cui queste infezioni siano frequenti, per:

- definire l'epidemiologia locale di questi agenti patogeni e capire dove, quando e quali siano i soggetti sintomatici e non, al fine di allocare le risorse ove necessario e stabilire le misure di controllo da adottare;
- attuare l'appropriato isolamento dei pazienti infetti e/o colonizzati, le precauzioni da contatto e le altre misure necessarie.





Inoltre, poiché l'Italia è un paese ad alta endemia per CRE, è necessario prevedere lo screening anche quale strategia atta a ridurre il rischio di introduzione di CRE nei reparti che ospitano pazienti ad alto rischio (es. reparti di terapia intensiva e di onco-ematologia) devono, pertanto, essere considerate a rischio e sottoposte a screening le seguenti categorie di pazienti:

- identificati come colonizzati o infetti nei 12 mesi precedenti l'attuale ricovero;
- trasferiti da altra struttura assistenziale per acuti (pubblica o privata) e da riabilitazione intensiva;
- trasferiti da strutture territoriali per anziani (es. case residenza anziani);
- con storia di ricovero e pernottamento nei 3 mesi precedenti o, se possibile nei 6 mesi precedenti in un setting assistenziale (che può includere anche le strutture residenziali per anziani) - in zone endemiche, in Italia o all'estero; nel caso di pazienti provenienti da altri paesi endemici, lo screening è raccomandato anche in assenza di contatto con le strutture sanitarie nel paese estero;
- in ingresso, per primo ricovero, in reparti a rischio, quali terapia intensiva, oncologia, ematologia, riabilitazione intensiva, chirurgia dei trapianti;
- con contatti frequenti con le strutture assistenziali, quali quelli sottoposti a dialisi o chemioterapia antitumorale nei precedenti 12 mesi, o comunque immunodepressi;
- contatti di pazienti con infezione o colonizzazione da CRE e pazienti assistiti dalla stessa équipe di un paziente risultato infetto o colonizzato da CRE (inclusi i pazienti della stessa stanza, unità o reparto, in base alla frequenza osservata di CRE e alle caratteristiche strutturali/organizzative della struttura).

Si raccomanda, di sottoporre a screening specifico al momento del ricovero, tramite tampone rettale, tutti i soggetti considerati a rischio di aver acquisito un'infezione/colonizzazione da CRE

3.2 Controllo della trasmissione in ambiente ospedaliero

In considerazione dell'alta capacità dei CRE di causare focolai epidemici in ambito assistenziale, è necessario potenziare le misure di controllo, come le precauzioni da contatto, l'isolamento o il cohorting (raggruppamento) dei pazienti positivi (colonizzati o infetti) e in base all'organizzazione della struttura, dove possibile, l'impiego di personale infermieristico dedicato.

Dovrebbero essere preventivamente sottoposti ad isolamento da contatto:

- pazienti ad alto rischio di colonizzazione, in attesa dei risultati dello screening;
- pazienti con un risultato preliminare positivo del test di screening, in attesa della conferma fenotipica/genotipica;
- pazienti in ingresso in reparti che ospitano pazienti ad alto rischio di andare incontro a colonizzazione/infezione o di sviluppare conseguenze gravi in seguito all'infezione (es. reparti di terapia intensiva e di onco-ematologia).

3.2.2 Follow-up dei casi di colonizzazione/infezione

In base ai dati disponibili sulla durata della colonizzazione in ospedale e al fine di garantire la corretta applicazione delle precauzioni da contatto nei pazienti colonizzati o infetti, si raccomandano i seguenti criteri di follow-up:

1. per ciascun paziente colonizzato o infetto con prima positività identificata in corso del ricovero, al fine di limitare il numero di tamponi rettali, si raccomanda di interrompere lo screening dopo un test positivo e di mantenere le precauzioni da contatto fino alla dimissione;
2. in caso di nuovo ricovero di paziente con almeno una positività accertata in passato:





- se l'ultima positività è stata osservata nei 90 giorni precedenti, si raccomanda di non effettuare ulteriori test di screening e di applicare le precauzioni da contatto per tutta la durata del ricovero;
- se l'ultima positività è stata osservata più di 90 giorni prima, si raccomanda di effettuare lo screening all'ingresso. Il paziente sarà considerato negativo dopo **tre test** consecutivi negativi, eseguiti a una settimana di intervallo uno dall'altro (qualora la gestione dei pazienti lo richieda e l'organizzazione dell'ospedale lo consenta, è possibile ridurre l'intervallo tra un test e il successivo a 3-4 giorni). Alla presenza di tre test consecutivi negativi, eseguire comunque una valutazione del rischio prima di rimuovere le precauzioni da contatto¹. Qualora lo stesso paziente (risultato negativo a tre test consecutivi e senza successive positività) sia nuovamente ricoverato in ospedale, si raccomanda di implementare le precauzioni da contatto e di eseguire almeno un test di screening (ottimali, tre campioni); solo dopo la conferma della negatività sarà possibile rimuovere le precauzioni da contatto;

3. i pazienti che sono stati potenzialmente esposti ad un paziente indice² (stessa stanza, unità o reparto a seconda del tipo di pazienti) dovranno essere sottoposti a screening con cadenza settimanale fino ad evidenza di cessata circolazione di CRE nel reparto.

3.3 Cosa non è necessario fare di routine

Non vi è evidenza che l'identificazione di soggetti portatori di CRE attraverso lo screening dello staff possa rappresentare una misura preventiva efficace per ridurre la trasmissione intraospedaliera di CRE. Tale misura può essere proposta al personale di un'Unità Operativa coinvolta da un evento epidemico non risolto nonostante l'applicazione di tutte le misure di controllo previste.

3.4 Dimissione dei pazienti

In caso di dimissione, o di trasferimento ad altra struttura sanitaria di paziente positivo per CRE, la struttura dimettente deve informare della positività i familiari/caregiver, o il personale medico di riferimento, della struttura che accoglie il paziente.

Qualora i pazienti ricoverati identificati come **contatto**³ di caso indice siano già stati dimessi, per ragioni legate ai tempi di risposta della Microbiologia, individuare tra le seguenti opzioni:

- *dimesso a domicilio*: comunicazione al MMG per indicazioni pratiche;
- *dimesso in altra struttura sanitaria o casa di riposo*: comunicazione al personale medico di riferimento e, tramite la Commissione Ospedaliera per il controllo delle infezioni correlate all'assistenza, al referente del rischio infettivo dell'ULSS di riferimento.

Analogamente, nel caso di paziente identificato come contatto dopo il trasferimento ad altra Unità Operativa, dare immediata comunicazione all'Unità Operativa di trasferimento per l'adozione immediata delle precauzioni da contatto ed esecuzione dello screening microbiologico; in caso di positività considerare il paziente caso indice per quella Unità Operativa.

¹In questi casi, può essere utile una nota al referto microbiologico che specifichi: "La negatività di tre campioni per la ricerca di enterobatteri resistenti ai carbapenemi non è indicativa di clearance microbiologica. In opportune condizioni, è possibile rilevare una nuova positività, ad esempio a seguito di terapie antibiotiche."

²Caso indice: primo caso in una famiglia o in un altro gruppo definito (portatori di malattia, ecc.) che arriva all'attenzione del ricercatore.

³Contatti: pazienti gestiti dalla stessa équipe assistenziale (personale medico e infermieristico o altre figure con contatti stretti e ripetuti).





3.5 Formazione informazione

I pazienti sottoposti a screening dovranno essere opportunamente informati sui motivi dell'esame microbiologico e sui comportamenti da osservare per la protezione dei contatti e della comunità più in generale.

Inoltre, si consiglia di predisporre programmi formativi per gli operatori sanitari che consentano di affrontare in modo adeguato non soltanto le procedure di campionamento per le finalità microbiologiche e di sorveglianza, ma anche le implicazioni etiche dello screening e la comunicazione con i pazienti e dei loro caregiver.

In tali occasioni, è necessario motivare tutto il personale sanitario interessato spiegando l'importanza del problema e le implicazioni della sorveglianza per la prevenzione e il controllo, e per il corretto trattamento antibiotico, e comunicare in modo chiaro:

- obiettivi della sorveglianza;
- metodo e tempi appropriati di raccolta, stoccaggio e trasporto dei campioni;
- scelta e modalità operative del test di screening;
- tempestività della disponibilità dei risultati microbiologici;
- canali di comunicazione (standardizzati e semplificati) da utilizzare;
- definizione dei ruoli e delle responsabilità del personale coinvolto;
- azioni da intraprendere in base ai risultati microbiologici.





Appendice 1: Protocolli microbiologici

Sulla base delle più recenti indicazioni ministeriali, in questo protocollo viene adottata la definizione CRE anziché CPE perché più corretta in quanto, come nella precedente circolare, dovranno essere segnalati tutti i ceppi resistenti ai carbapenemi, sia quelli produttori di carbapenemasi, sia quelli non produttori di carbapenemasi ma resistenti ad almeno un carbapenemico (ertapenem, imipenem o meropenem). Viene pertanto aggiunto l'ertapenem tra gli antibiotici da considerare per la resistenza ai carbapenemi. È cambiata la definizione di caso in seguito alla pubblicazione delle nuove linee guida prodotte da European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) per cui i ceppi appartenenti alla categoria I (precedentemente categorizzati come intermedi) sono definiti come “sensibili con aumentata esposizione al farmaco” e pertanto non possono essere raggruppati con i ceppi R (resistenti). Nella nuova definizione di caso ai fini della sorveglianza, i ceppi di categoria I saranno assimilati ai sensibili (S) e quindi non dovranno essere segnalati, a meno che non siano produttori di carbapenemasi come dimostrato da test fenotipici o genotipici (vedere sotto).

Sui materiali biologici inviati per una diagnosi microbiologica, una rapida e accurata rilevazione degli isolati resistenti ai carbapenemi è molto importante per il management della terapia antimicrobica, l'implementazione delle misure di *infection control* e a scopi epidemiologici.

Inoltre al fine di identificare l'eventuale positivizzazione per CRE di pazienti già ricoverati e di predisporre le opportune misure di contenimento, la conoscenza in tempi rapidi dei risultati dei test di screening è cruciale. I risultati devono essere comunicati prima possibile a tutto il personale sanitario interessato (l'obiettivo dovrebbe essere: massimo 2 giorni di tempo).

Identificazione delle carbapenemasi in microrganismi isolati da campioni microbiologici clinici

Gli obiettivi sono rivolti a riconoscere in modo efficace tutti gli Enterobatteri produttori di carbapenemasi, e distinguerli dai ceppi che sono resistenti ai carbapenemi in virtù di altri meccanismi.

A fronte della diversità della tipologia degli enzimi, della considerevole variazione nei livelli di resistenza fenotipica ai carbapenemi (ad esempio nella valutazione delle MIC), e della complessità della resistenza ai carbapenemi non mediata dalle carbapenemasi, non esiste un metodo universalmente applicabile in grado di realizzare quest'obiettivo.

Quando sospettare la produzione di carbapenemasi alla lettura dell'antibiogramma

In Europa, l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), per gli Enterobatteri, sulla base dei definiti breakpoint clinici per i carbapenemi, raccomanda di riportare nella refertazione i risultati del test di sensibilità (antibiogramma) senza alcuna variazione, in quanto la presenza o l'assenza di una carbapenemasi non influenza di per sé la categorizzazione di sensibilità. In molte aree, la rilevazione e la caratterizzazione delle carbapenemasi, nei casi sospetti, è raccomandata, o obbligatoria, per scopi epidemiologici o di controllo delle infezioni.

Tuttavia, i nuovi antimicrobici, di recente introduzione nella pratica clinica con attività sui batteri Gram negativi, hanno dimostrato attività solo su determinati meccanismi di resistenza, che devono essere necessariamente rilevati per un corretto approccio terapeutico.

La produzione di carbapenemasi deve essere sospettata in tutti gli isolati di *Enterobatteri* per i quali le MIC dei carbapenemi siano superiori ai rispettivi *cut-off* epidemiologici (ECOFF) dei ceppi selvaggi o *wild-type* della specie corrispondente. I valori ECOFF definiscono l'estremità superiore della distribuzione dei ceppi *wild-type*, per cui i microrganismi con valori di MIC superiori all'ECOFF hanno verosimilmente acquisito qualche meccanismo di resistenza.





Tuttavia, i *breakpoint* clinici dei carbapenemi sono più elevati dei valori di ECOFF, e i diversi sistemi utilizzati nella pratica di laboratorio per determinare la sensibilità agli antibiotici non sempre consentono di misurare valori di MIC dei carbapenemi nel range degli ECOFF.

Secondo le indicazioni dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), il Meropenem viene attualmente considerato il farmaco più idoneo da utilizzare per sospettare la produzione di carbapenemasi, perché garantisce, rispetto a Imipenem ed Ertapenem, una adeguata sensibilità e specificità nella selezione dei ceppi sui quali effettuare i test di conferma.

In questo documento è pertanto raccomandato di sottoporre a conferma fenotipica e/o molecolare tutti i ceppi di Enterobatteri che presentino nel test di sensibilità (antibiogramma) una **MIC \geq 0,25 $\mu\text{g/ml}$ per meropenem**.

Il valore di MIC \geq 0,5 $\mu\text{g/ml}$ per meropenem (CoSA-AMCLI 2012) dovrebbe invece essere utilizzato da quei laboratori la cui strumentazione in uso per i test di sensibilità non consente di saggiare la MIC = 0,25.

La produzione di carbapenemasi negli Enterobatteri può essere rilevata e confermata con metodi fenotipici o molecolari.

I test di conferma devono essere disponibili a livello locale, per consentire di individuare in tempi rapidi i ceppi produttori di carbapenemasi e poter attuare celermente i corretti approcci terapeutici e tutte le necessarie misure di *infection control*.

1. Test di conferma fenotipica

Per il rilievo fenotipico della produzione di carbapenemasi sono proposte le seguenti tipologie di test:

- ***Test di sinergia***

Il microrganismo potenziale produttore di carbapenemasi è testato nei confronti di un carbapenemico alla presenza di inibitori quali EDTA o acido dipicolinico (per MBL) ed acido boronico (per KPC) in disco-combinazione/disco-approssimazione.

Vantaggi: di facile esecuzione, consente la rilevazione e caratterizzazione fenotipica delle carbapenemasi di tipo KPC e MBL.

Limiti: non consente il riconoscimento della produzione di carbapenemasi di tipo OXA (in questo ambito, può essere utile l'evidenza di resistenza alla temocillina con altre sinergie negative, oppure la crescita dopo semina su terreni selettivi per questo microrganismi con geni OXA).

- ***Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time of Flight (MALDI-ToF)***

La spettrometria di massa è diventata di utilizzo comune nei laboratori di Microbiologia e consente, oltre ad una rapida identificazione di numerosi microrganismi, anche di rilevare la produzione di carbapenemasi. Il sistema rileva i cambiamenti di massa dovuti all'idrolisi di una molecola di carbapenemico. Richiede una pre-incubazione di un carbapenemico con il microrganismo in esame, può essere completato in circa due ore e fornisce un risultato SI/NO. Numerosi studi in letteratura descrivono le sue eccellenti applicazioni per la rilevazione delle carbapenemasi (analisi del farmaco e dei suoi prodotti di degradazione) negli enterobatteri, utilizzando differenti carbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem) vari buffer di reazione (es.: ammonio citrato, Tris-HCl, NH_4HCO_3), differenti matrici e differenti tempi di incubazione.

Vantaggi: rappresenta un metodo semplice, rapido ed economico per rilevare la produzione di carbapenemasi negli Enterobatteri, è può essere introdotto con facilità, in quei laboratori che già utilizzano il sistema per le identificazioni di batteri e funghi, nel flusso di lavoro di un laboratorio di Microbiologia.

Limiti: auspicabile una futura standardizzazione delle procedure operative e loro validazione in studi multicentrici o in studi multipli in singoli centri, inoltre, le impostazioni del MALDI-ToF devono essere modificate rispetto a quelle utilizzate per l'identificazione dei microrganismi.





- **Test immunocromatografici**

Sono commercialmente disponibili test immunocromatografici che permettono di rilevare, negli Enterobatteri produttori di carbapenemasi, la presenza dei principali determinanti di resistenza eventualmente presenti (KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48-like).

Il saggio utilizza anticorpi monoclonali marcati diretti contro i principali determinanti di resistenza: KPC, OXA, VIM, IMP, NDM. Quando il campione migra attraverso la membrana di nitrocellulosa (strip), gli enzimi presenti vengono catturati, e compare visivamente una linea colorata in corrispondenza della regione contenente gli anticorpi monoclonali specifici diretti selettivamente contro il determinante di resistenza immobilizzato sulla membrana. La regione di controllo, qualunque sia il risultato, deve sempre mostrare una linea colorata affinché il test possa considerarsi valido.

Sono disponibili test immunocromatografici specifici per un singolo determinante di resistenza o test multiplex in grado di rilevare contemporaneamente solo alcuni o tutti i principali determinati di resistenza.

Vantaggi: costi contenuti, facilità di utilizzo e tempi di esecuzione di circa 15 minuti. Ottimale la possibilità di rilevare contemporaneamente in un unico test tutti i principali determinati di resistenza e di rilevare anche due diversi meccanismi di resistenza nello stesso microrganismo. I dati di letteratura disponibili evidenziano una ottima sensibilità e specificità e nessuna interferenza tra i diversi meccanismi di resistenza.

Limiti: i test sono di recente commercializzazione e quindi, seppur promettenti, necessitano di validazione in studi multicentrici o in studi multipli in singoli centri.

- **Test colorimetrico (CarbaNP test e sue varianti)**

Rileva l'idrolisi di un carbapenemico da parte di un microrganismo produttore di carbapenemasi. L'idrolisi "in vitro" acidifica il terreno determinando un cambio di colore dell'indicatore di pH. Questo test è stato segnalato per la sua capacità di rilevazione delle carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* spp.

Vantaggi: è relativamente economico, rapido, riproducibile e dai dati della letteratura risulta essere molto sensibile e specifico. Il test richiede la pre-incubazione di un carbapenemico con il microrganismo da saggiare, e può essere completata in circa 2 ore. Sono disponibili test commerciali oppure i materiali per i test possono essere preparati *in-house* (un riferimento può essere il documento CLSI, 2016).

Limiti: come tutti i test colorimetrici, ha una valutazione soggettiva, quindi operatore-dipendente, che in alcuni casi può non essere agevole.

- **Test di Hodge** (variamente modificato)

Si basa sulla dispersione delle carbapenemasi da parte del microrganismo produttore in esame nel mezzo circostante e sulla sua capacità di proteggere dall'azione dei carbapenemi i ceppi sensibili presenti sulla stessa piastra.

Vantaggi: di esecuzione relativamente facile, economico, non richiede dispositivi o reagenti particolari, consente di riconoscere la produzione di tutti i tipi di carbapenemasi incluse quelle di tipo OXA.

Limiti: è un test relativamente aspecifico, non permettendo, ad esempio la distinzione fra carbapenemasi di classe A e MBL, richiede un certo grado di esperienza per l'interpretazione affidabile dei risultati, può comportare il rischio di risultati di falsa positività (ceppi iperproduttori di AmpC o ESBL) o di falsa negatività (ceppi produttori di MBL).

Vista la maggior accuratezza e standardizzazione dei test di conferma in precedenza elencati, se ne sconsiglia l'utilizzo routinario, riservando al test di Hodge solo un ruolo di supporto nei casi dubbi.

Ulteriori test sono commercialmente disponibili e vengono elencati per completezza:





- **Test di combinazione su striscia a gradiente di diffusione per MBL** (è di facile esecuzione, ma è costoso e permette di rilevare solo le carbapenemasi tipo metallo-beta-lattamasi).
- **Terreni cromogeni selettivi**, ad esempio per microrganismi con geni OXA.

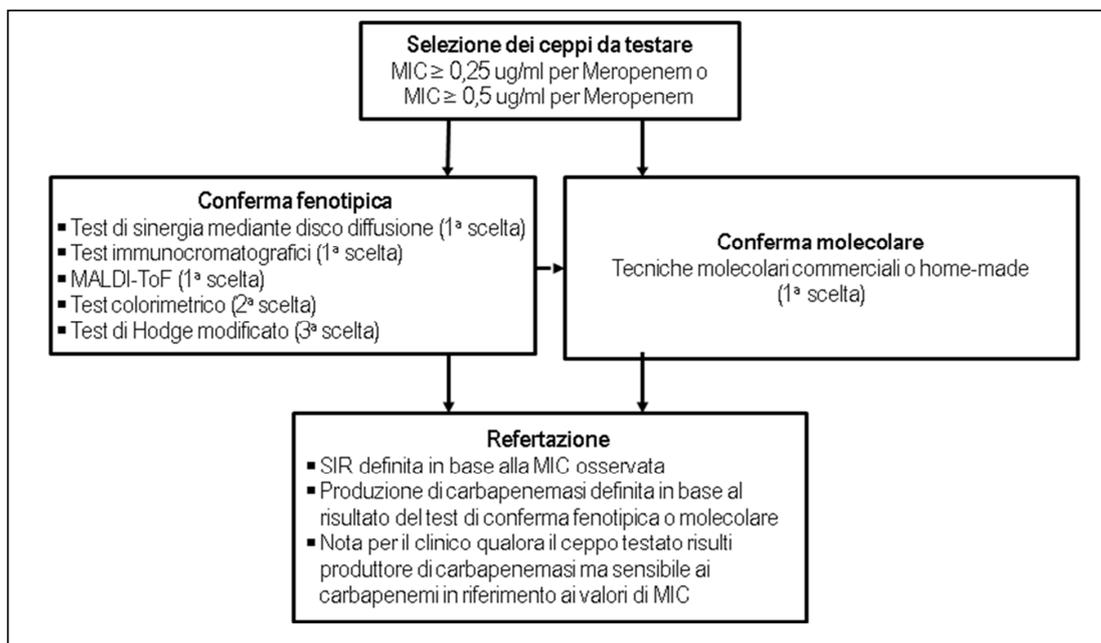
2. Test di conferma molecolari

Sono attualmente utilizzabili diverse tecniche molecolari, commercialmente disponibili o eseguite con metodiche *home-made*, che permettono la conferma nel microrganismo in esame della presenza di carbapenemasi e l'identificazione dei determinanti di resistenza presenti (KPC, VIM, IPM; NDM-1, OXA-48, e/o altri determinanti di resistenza). L'utilizzo di questi test si rende indispensabile soprattutto in caso di sospette condizioni epidemiche, per la mancanza di inibitori specifici per alcune carbapenemasi (es. OXA-58) e le difficoltà nella standardizzazione/ interpretazione dei risultati dei test fenotipici.

La conferma molecolare è auspicabile sia per il management della terapia antimicrobica (alcune nuove molecole sono attive solo su particolari determinanti), sia per fini epidemiologici (tracing), sia in ambito di valutazione del rischio (la diffusibilità della metallo-beta-lattamasi NDM è ad esempio maggiore rispetto ad altri geni), sia per l'implementazione delle necessarie misure di *infection control*.

Gli enterobatteri con resistenza ai carbapenemi per cause diverse dalla produzione di carbapenemasi, come l'iperproduzione di β -Lattamasi a spettro esteso (ESBL) o di enzimi AmpC associata a ridotta permeabilità alle porine (test di conferma fenotipica e/o molecolare negativo), sono inclusi nella sorveglianza regionale perché ritenuti meno problematici da un punto di vista clinico ed epidemiologico. Tali microrganismi possono rientrare nella lista dei microrganismi alert a livello locale, in base alle disposizioni delle singole aziende.

Figura 1 - Algoritmo per l'identificazione fenotipica e/o molecolare e la refertazione degli Enterobatteri produttori di carbapenemasi isolati da campioni clinici



Standard per la refertazione (antibiogramma, interpretazione risultati)





Per l'antibiogramma è raccomandato utilizzare una metodica in grado di saggiare le MIC (Minima Concentrazione Inibente) in microdiluizione in brodo, in caso d'infezioni invasive (sepsi, meningiti) e polmonari accertate (da campione profondo).

Tempo di refertazione delle colture: risultati intermedi o preliminari

I risultati intermedi o preliminari devono essere rilasciati per l'isolamento degli isolati clinici potenzialmente significativi, non appena si rileva una crescita, tranne che siano state concordate soluzioni alternative specifiche con i richiedenti.

I risultati urgenti devono essere comunicati in conformità alle politiche aziendali inserendo la nota *“Isolamento di microrganismo Non-sensibile/Resistente ai carbapenemi. Può essere produttore di una carbapenemasi, sono in corso successivi accertamenti”*.

Al fine di ridurre il rischio di trasmissione, si raccomanda di adottare subito le precauzioni da contatto in attesa del risultato del test di conferma. L'applicazione delle precauzioni da contatto potrà essere interrotta in caso di negatività del test.

Tempo di refertazione colture: risultati definitivi

I referti finali dovrebbero seguire quelli preliminari nel più breve tempo possibile.

Devono essere segnalati tutti gli isolamenti di ceppi resistenti ai carbapenemi, sia produttori di carbapenemasi, sia non produttori di carbapenemasi. Deve essere aggiunta al referto dell'antibiogramma sulla base della tipologia di resistenza la nota: *“Isolato produttore di carbapenemasi (indicare il possibile meccanismo di resistenza se confermato) / Isolato resistente ai carbapenemi; la terapia con carbapenemi potrebbe risultare scarsamente efficace o inefficace. Nel caso in cui si intendano utilizzare tali farmaci si raccomanda una preventiva consulenza con un esperto di terapia antibiotica. Si raccomanda di utilizzare le precauzioni standard e da contatto per prevenire la diffusione del microrganismo.”*

L'esecuzione dell'antibiogramma, sebbene non necessaria, può essere utile anche negli isolati da **test di screening/culture di sorveglianza**, per definire se si tratti di un ceppo di *Klebsiella pneumoniae* produttore di carbapenemasi o CRE, e a scopo epidemiologico. La presenza dell'antibiogramma nel referto tuttavia potrebbe indurre a terapie antibiotiche inappropriate: viene pertanto raccomandato di inserire una nota esplicativa al referto riportante: *“Colonizzazione da Klebsiella pneumoniae produttore di carbapenemasi (indicare il possibile meccanismo di resistenza se confermato) o CRE, non esiste alcuna indicazione ad un trattamento antibiotico in assenza di infezione. Si raccomanda di utilizzare le precauzioni standard e da contatto per prevenire la diffusione del microrganismo”*.

Identificazione di ceppi con resistenza ai carbapenemi non correlata alla presenza di carbapenemasi

Oltre al meccanismo di resistenza rappresentato alla produzione di enzimi “carbapenemasi”, più raramente la resistenza ai carbapenemi può essere causata da meccanismi diversi quali la ridotta permeabilità della membrana esterna per perdita di porine [proteine che permettono all'antibiotico di entrare nella cellula batterica], l'aumento dell'efflusso dell'antibiotico, e l'iperproduzione di β -lattamasi di tipo ESBL -extended-spectrum beta-lactamase- o AmpC (enzimi che sono in grado di inattivare debolmente i carbapenemi)]. Questi meccanismi di resistenza, in genere, conferiscono una ridotta sensibilità o un basso livello di resistenza solo ad alcuni carbapenemi. Questi ceppi con resistenza ad almeno un carbapenemico (ertapenem, imipenem o meropenem) non correlata alla presenza di carbapenemasi (test di conferma per le carbapenemasi negativi) devono essere sempre notificati e conservati per possibili ulteriori valutazioni molecolari.





3. Metodiche microbiologiche fenotipiche di screening.

Esistono diversi protocolli per la rilevazione dei soggetti colonizzati.

- **Semina diretta su terreno selettivo (McConkey) con dischetto di meropenem**

Il tampone viene direttamente strisciato sulla superficie del terreno agarizzato selettivo, posizionando subito dopo nell'area di semina più densa un dischetto di meropenem (10 µg). Devono essere considerate sospette e quindi sottoposte a test di conferma le colonie con morfologia tipica per *Enterobacteriaceae* (ora *Enterobacterales*) che risultino crescere all'interno dell'alone di inibizione della crescita batterica, ovvero nell'area corrispondente ad un alone di inibizione con diametro ≤ 30 mm.

Vantaggi: lettura dei risultati dopo 24 ore in caso di esito positivo, o qualora l'esito sia negativo è opportuno effettuare una seconda lettura a 48 ore. Facile riconoscimento delle colonie sospette. Costi contenuti. L'aggiunta di un secondo dischetto di meropenem addizionato di acido boronico, se ritenuta conveniente, potrebbe consentire il contestuale riconoscimento della produzione di enzimi del tipo KPC, ed evitare dunque la necessità di test di conferma in caso di risultato positivo.

Limiti: l'aggiunta di dischetti al terreno deve essere eseguita con modalità tecniche ottimali e richiede pertanto un leggero aumento del tempo di esecuzione. Nei pazienti colonizzati in bassa carica potrebbero verificarsi risultati falsamente negativi.

- **Semina diretta su terreni cromogeni selettivi per la rilevazione di CPE**

Devono essere utilizzati terreni cromogeni selettivi, specifici per la ricerca di Enterobatteri con scarsa sensibilità ai carbapenemi.

Vantaggi: questi terreni consentono un facile riconoscimento delle colonie sospette ed una identificazione presuntiva di specie. La lettura dei risultati richiede 18-24 ore.

Limiti: tale approccio è sicuramente economicamente più costoso, la specificità deve essere valutata in base al terreno utilizzato.

- **Semina su McConkey previo arricchimento in terreno liquido addizionato di carbapenemico**

E' la metodica consigliata dal CDC, e prevede la semina del tampone rettale in 5 ml di Tryptic Soy Broth addizionato con un dischetto di ertapenem o meropenem 10 µg (concentrazione finale 2 µg/ml), seguita da incubazione a 35°C per 18 ore, successiva semina di 100 µl della brodo coltura su agar McConkey (incubato anch'esso a 35°C per 24-48 ore), con o senza aggiunta di dischetto di meropenem nell'area di semina.

Vantaggi: facile riconoscimento delle colonie sospette e costi contenuti.

Limiti: lettura dei risultati dopo 48-72 ore ed un maggiore carico di lavoro per il laboratorio. Inoltre, l'eventuale sviluppo prevalente nel brodo di arricchimento di altri generi di bacilli Gram-resistenti ai carbapenemi (*Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) potrebbe impedire il rilevamento di eventuali enterobatteri presenti e comportare risultati falsamente negativi.

Caratterizzazione degli isolati sospetti

Le colonie evidenziate come "sospette", utilizzando una delle metodiche sopra descritte, dovranno essere caratterizzate con identificazione, antibiogramma ed eventuali test fenotipici o molecolari.

Ovviamente nel caso in cui per il paziente fosse già nota la colonizzazione da parte di un ceppo produttore di carbapenemasi, altre caratterizzazioni dello stesso ceppo potranno essere opzionali.

Le evidenze della letteratura non stabiliscono ancora in modo convincente la migliore efficacia di un approccio piuttosto che di un altro. E' consigliabile che il centro che esegue la sorveglianza attiva dei contatti si affidi a uno dei protocolli sopra descritti, valutando anche la fattibilità/disponibilità dei diversi test nello specifico contesto.





4. Metodiche microbiologiche molecolari di screening

- **Test di screening/conferma molecolare direttamente su tampone rettale**

Sono commercialmente disponibili sistemi molecolari che permettono di rilevare la presenza, direttamente dal tampone rettale, di microrganismi produttori di carbapenemasi, individuando i principali determinanti di resistenza eventualmente presenti (KPC, VIM, NDM, IMP, OXA-48, e/o altri determinanti di resistenza).

Questo approccio rappresenta contemporaneamente uno screening ed un test di conferma molecolare, con risultati disponibili nella stessa giornata o dopo 24 ore, sulla base dell'organizzazione e dei flussi di lavoro del laboratorio.

Vantaggi: costi contenuti e i pazienti colonizzati sono rapidamente individuati, con interventi più tempestivi dell'*infection control*.

Limiti: i campioni risultati positivi devono essere coltivati, preferibilmente su un terreno cromogeno selettivo per la rilevazione di CPE, per una corretta identificazione di specie e l'eventuale esecuzione di un antibiogramma, utile sia a fini epidemiologici sia di *antimicrobial stewardship*.





Appendice 2: Sorveglianza e controllo della trasmissione delle infezioni da CRE

Le strategie di controllo adottate hanno gli obiettivi di identificare tempestivamente e isolare efficacemente i pazienti con infezione/colonizzazione da CRE, al fine di prevenire o limitare focolai epidemici.

Di seguito vengono descritti i principali interventi che ogni azienda deve porre in atto per la prevenzione delle infezioni correlate al processo assistenziale.

1. Isolamento del paziente colonizzato/infetto da CRE in stanza singola possibilmente con bagno dedicato, fortemente raccomandato in caso di: polmoniti con presenza di secrezioni, pazienti con tracheostomia, allettamento protratto con presenza di decubiti in stadio 3-4, estese lesioni cutanee purulente, secrezioni gastriche (vomito) non contenute, secrezioni fecali (diarrea) non controllabili anche con uso di assorbenti per incontinenza, cateteri vascolari e drenaggi multipli, presenza di peg, grave deterioramento cognitivo (test mini mental < 18).

Qualora l'isolamento in stanza singola non sia immediatamente possibile, i pazienti devono essere raggruppati in ambienti dedicati dell'ospedale (isolamento in coorte o "cohorting" dei pazienti) per limitare la loro assistenza in un'unica area e prevenire il contatto con altri pazienti, mantenendo separati tra loro pazienti colonizzati o infetti da CRE differenti e caratterizzati da meccanismi di resistenza diversi (ad esempio con produzione di carbapenemasi o no, portatori di una carbapenemasi piuttosto che un'altra, etc.); solo nel caso in cui non sia possibile procedere all'isolamento in stanza singola o al cohorting, è possibile, solo temporaneamente, prevedere l'isolamento funzionale del paziente infetto/colonizzato, all'interno di una stanza non dedicata, con adeguata gestione delle precauzioni da contatto. L'isolamento funzionale può essere eseguito solo nel caso in cui gli spazi fisici (ad es. dimensione della stanza) garantiscano il rispetto dell'implementazione delle misure di prevenzione previste per i pazienti ricoverati in regime di isolamento da contatto.

Tali interventi deve essere fortemente supportati dalle Direzioni Aziendali.

2. Precauzioni da contatto devono essere considerate, sempre, lo standard dell'assistenza per i pazienti colonizzati/infetti da CRE. Tali precauzioni includono: il posizionamento appropriato del paziente; l'uso, da parte del personale, di dispositivi di protezione individuale, compresi guanti e camici; la limitazione del trasporto e del movimento del paziente; l'utilizzo di apparecchiature per l'assistenza al paziente monouso o dedicate; la priorità alla pulizia e alla disinfezione delle stanze dei pazienti.

3. Corretta igiene delle mani (uso appropriato di gel idroalcolico o lavaggio con sapone) eseguita secondo le raccomandazioni dell'OMS, prima e dopo il contatto con ogni paziente, disponendo erogatori di soluzione idroalcolica accanto al letto di ogni paziente.

4. Pulizia ambientale, con particolare attenzione alle superfici che sono immediatamente vicine al letto del paziente, incluse le superfici toccate frequentemente dagli operatori sanitari durante la cura del paziente, come tastiere, monitor, manopole/pulsanti e altre superfici ad elevata frequenza di manipolazione. La pulizia accurata delle zone dei pazienti colonizzati o infetti da CRE deve essere eseguita dopo aver pulito le altre zone del paziente (cioè, le aree di isolamento devono essere pulite dopo le aree non isolate), così come la pulizia delle aree dei pazienti colonizzati o infetti da CRE deve essere eseguita dopo aver pulito le aree dedicate ai pazienti non colonizzati o infetti da CRE. Le soluzioni e le attrezzature per la pulizia devono essere smaltite/lavate immediatamente dopo aver pulito le aree contaminate/con sospetta contaminazione da CRE. La pulizia ambientale deve prevedere anche la corretta gestione degli effetti lettereschi, dei rifiuti





sanitari pericolosi a rischio infettivo e il ricondizionamento, dopo ogni utilizzo, di tutti gli ausili e le attrezzature fruiti da più pazienti (es. sollevatore, standing, attrezzature di palestra, apparecchiature elettromedicali).

5. **Promozione delle buone pratiche** di gestione dell'ambiente per pazienti, familiari che forniscono assistenza (caregiver) e visitatori occasionali (ad esempio, non lasciare sulle superfici della stanza di degenza ciò che non è strettamente necessario al paziente, anche per consentire un'adeguata pulizia giornaliera da parte degli addetti).

- monitoraggio, audit e feed-back delle azioni di controllo delle CRE con restituzione dei dati (da eseguire con cadenze temporali adeguate al tipo di diffusione del germe: ravvicinate in caso di epidemia - per es. settimanali, meno frequenti in caso di situazione endemica - per es. ogni trimestre);
- attività di formazione periodica per il personale sul controllo delle ICA e specifica sui CRE;
- implementazione dei programmi di antimicrobial stewardship, al fine di assicurare una appropriata prescrizione antibiotica. Questi programmi devono mirare a migliorare l'efficacia clinica del trattamento antibiotico e a limitare lo sviluppo di *AMR* riducendo la pressione selettiva;
- adozione di un protocollo per la diagnosi e la sorveglianza dei CRE, seguendo i principi della diagnostic stewardship;
- predisposizione di materiale informativo per i pazienti in dimissione o in trasferimento presso struttura non ospedaliera, e i loro familiari;
- preparazione di materiale clinico informativo di accompagnamento del paziente in trasferimento presso altra struttura assistenziale, assicurando, altresì, una comunicazione diretta con il personale sanitario della struttura ricevente.

