



Università Politecnica delle Marche
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Corso di Dottorato in Scienze Biomediche
XXXII ciclo

La resistenza agli antibiotici in *Pseudomonas aeruginosa*: studio molecolare ed epidemiologico in un nosocomio marchigiano

Dottorando

Dr.ssa Sefora Castelletti

Tutor

Prof. Andrea Giacometti

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	p.3
2. SCOPO DELLA TESI.....	p. 18
3. MATERIALI E METODI.....	p.18
4. RISULTATI.....	p. 21
5. CONCLUSIONI.....	p.40

1. INTRODUZIONE

Fin dalla sua comparsa sulla terra l'uomo è stato costretto a combattere una guerra impari con un nemico invisibile ed insidioso: i microrganismi patogeni.

Fino al 1928, anno della scoperta della penicillina, la sussistenza del genere umano era gravata da un'elevata mortalità legata alle malattie infettive; dal quel momento si apriva una nuova opportunità per il genere umano.

Per molti anni a venire gli antibiotici, che si sono susseguiti alla prima penicillina, hanno aiutato a combattere e controllare le infezioni batteriche; tuttavia, il loro esteso impiego, non sempre razionale, sia in ambito sanitario che veterinario ha favorito la comparsa di batteri mutati, in grado di resistere ai principali meccanismi inibenti di quasi tutti questi farmaci.

Secondo la definizione di Magiorakos sono considerati batteri multiresistenti (multi drug resistant – MDR) quei microrganismi che non sono sensibili ad almeno un farmaco di tre o più classi di antimicrobici ¹.

I tassi di mortalità associati alle infezioni da MDR sono molto elevati: si stima che in Europa ogni anno i decessi ammontino a 33000 persone (dati ECDC 2018). In termini economici, l'antibioticoresistenza impone spese considerevoli: nella comunità europea il subset dei microrganismi antibiotico resistenti è associato ad un costo sanitario extra e ad una perdita di produttività di circa 1-1.5 miliardi di euro all'anno ².

In questo quadro generale sono particolarmente rilevanti le infezioni causate da *Staphilococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA), stafilococchi coagulasi –negativi meticillino resistenti (MR-ConS) e da enterococchi vancomicina-resistenti (VRE), nell'ambito dei batteri gram positivi, e quelle causate da *Acinetobacter baumannii* multi-drug resistant (MDR), *Klebisella pneumoniae* resistente ai carbapenemi, *Escherichia coli* produttore di betalattamasi a spettro esteso (ESBL), *Pseudomonas aeruginosa* MDR.

Pseudomonas spp. è un batterio gram negativo, appartenente alla famiglia delle Pseudomonaceae, ubiquitario, considerato patogeno opportunista nell'uomo. Le specie conosciute sono: *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluoresces*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas syringae*, *Pseudomonas luteola*; di queste l'unica in grado di determinare infezione nell'uomo è *P.aeruginosa*.

P.aeruginosa è un microrganismo ubiquitario, in grado di crescere su quasi ogni terreno di coltura, anche in condizioni ambientali estreme ed è, attualmente, responsabile di infezioni ospedaliere ad elevata mortalità. I meccanismi di virulenza sono molteplici e sono costituiti da componenti

strutturali (adesine e capsula polisaccaridica), tossine (endotossine, esotossina A, esotossina S), enzimi (elastasi, fosfolipasi C, proteasi alcalina), pigmenti (piocianina) e ramnolipidi (emolisina).

Vediamo tali fattori nello specifico:

- Adesine (flagello e pili di tipo IV): il flagello, unico, permette la motilità del batterio e il cambio di direzione. I pili di tipo IV sono importanti adesine che partecipano alla formazione del biofilm e, insieme al flagello, permettono lo spostamento del batterio (twitching). Inoltre, favoriscono l'aggregazione cellulare e la formazione di microcolonie, come meccanismo di protezione dal sistema immunitario dell'ospite.
- Capsula polisaccaridica: costituita da alginato (esopolisaccaride mucoide), favorisce l'adesione alla superficie di proteasi vascolari e contribuisce alla formazione del biofilm. È responsabile dell'attività antifagocitaria ed inibisce la penetrazione degli antibiotici.
- Lipopolisaccaride: è composto da tre domini. Lipide A, che ancora la molecola alla membrana esterna della cellula ospite, core polisaccaridico e polisaccaride O, ad alta variabilità genica, implicato nella risposta adattativa del batterio allo stress immunitario.
- Enzimi: gli enzimi prodotti sono elastasi, proteasi alcalina, lipasi e fosfolipasi. *P.aeruginosa* produce due tipi di elastasi, LasA e LasB, che contribuiscono alla necrosi del tessuto polmonare. La proteasi alcalina è una serin-proteasi che degrada i complementi proteici, le immunoglobuline, il fibrinogeno e il surfactante ed inibisce l'interazione con i macrofagi alveolari. Le lipasi e le fosfolipasi distruggono le catene di surfactante e i fosfolipidi di membrana, concorrendo al danno tissutale e alla risposta infiammatoria.
- Tossine: si dividono in endotossine ed esotossine. Alle prime appartengono le leucocidine, in grado di distruggere i linfociti e il tessuto polmonare. Le seconde, a loro volta, si differenziano in esotossina A, in grado di inibire la sintesi proteica, ed esotossina S, che altera la struttura del citoscheletro.
- Pigmenti: il più importante è la piocianina. Questa è una sostanza fortemente chemiotattica, in grado, cioè, di stimolare la risposta infiammatoria, ed è capace di catalizzare la produzione di ossido e superossido e di pregiudicare la funzione ciliare.

Alla virulenza di *P. aeruginosa* concorre anche il sistema di secrezione tipo 3 (T3SS), che si attiva in seguito al contatto con le cellule eucariote. È composto da tre strutture: l'apparato di secrezione, l'apparato di traslocazione e le tossine ExoY, ExoS, ExoT e ExoU. Ognuna di queste tossine presenta una specifica attività: ExoS e ExoT riarrangiano la struttura del citoscheletro della cellula ospite ed inibiscono la fagocitosi; ExoU presenta attività fosfolipasica e provoca la distruzione della membrana plasmatica con conseguente necrosi cellulare; ExoY porta ad un riarrangiamento del citoscheletro actinico, inibizione della fagocitosi e aumento della permeabilità endoteliale. Tutte

queste attività concorrono a facilitare la penetrazione del batterio nella cellula ospite e, una volta dentro, ad inibire i meccanismi di difesa.

I meccanismi di resistenza, invece, determinano la resistenza del microrganismo agli antibiotici. Questi si dividono in intrinseci o naturali, cioè legati alle caratteristiche fisiche del batterio e acquisiti, cioè quei meccanismi che i batteri hanno acquisito in seguito a mutazioni del proprio DNA (resistenze ad evoluzione verticale) o a resistenze dovute a trasferimento di un gene esogeno da parte di altri batteri mediante processi di trasformazione, trasduzione o coniugazione (resistenze ad evoluzione orizzontale)³.

Ai meccanismi di resistenza intrinseca appartengono la parete batterica, il meccanismo delle pompe di efflusso e la formazione del biofilm; vediamoli nel dettaglio:

- parete batterica: circonda e racchiude completamente il batterio e gli conferisce alcune caratteristiche, come forma, protezione dalla lisi osmotica, sensibilità ai batteriofagi e agli agenti chimici.
- pompe di efflusso: sono complessi multiproteici, che hanno la capacità di estrarre sostanze tossiche, e quindi anche gli antibiotici, dalla cellula batterica. *P. aeruginosa* presenta quattro pompe di efflusso attive: MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN. L'attività di queste pompe può essere variamente regolata dall'espressione dei loro geni.
- biofilm: è una matrice composta da esopolisaccaridi (Pel e Psl), proteine, DNA/RNA extracellulare, che svolge una funzione protettiva nei confronti di fattori ambientali sfavorevoli, come variazioni improvvise di pH, shock osmotici o disidratazione. Inoltre, avvolgendo il microrganismo e riducendone la mobilità, impediscono al sistema immunitario di riconoscerlo. Un recente studio⁴ ha dimostrato come la proteina LecB, prodotta da *Pseudomonas*, svolga un ruolo funzionale nella formazione e nell'organizzazione strutturale del biofilm, aderendo al polisaccaride extracellulare Psl e permettendo, così, l'adesione tra la cellula batterica e quella ospite.

Inoltre, la produzione di LecB permetterebbe di fagocitare l'esopolisaccaride dell'organismo ospite e 'camuffare', così, il microrganismo, che non verrebbe riconosciuto dal sistema immunitario.

All'interno dei meccanismi di resistenza estrinseca, la maggior parte è mediata dall'acquisizione di geni di resistenza da altri batteri.

I meccanismi meglio conosciuti di antibioticoresistenza per *Pseudomonas* sono quattro e sono dovuti a mutazioni che: 1) attivano la produzione di AmpC beta-lattamasi, 2) riducono l'espressione della porina OprD, influenzando sulla suscettibilità ai carbapenemici, 3) alterano l'espressione dei sistemi di efflusso, 4) alterano l'attività delle topoisomerasi responsabili delle resistenze ai fluorochinoloni.

Vediamo nello specifico ogni singolo meccanismo.

- Amp-C betalattamasi: *P.aeruginosa* possiede una cefalosporinasi AmpC inducibile. I ceppi wild-type presentano bassi livelli di questo enzima, pertanto mantengono una sensibilità alle penicilline anti-pseudomonas, cefalosporine e carbapenemi⁵. Quando, invece, la produzione di AmpC viene overespressa *P.aeruginosa* sviluppa resistenza a tutti i β -lattamici, ad eccezione dei carbapenemi^{6,5}.

L'overproduzione di AmpC può essere dovuta o all'induzione del gene *AmpC* o a dei processi di derepressione che determinano elevati livelli del gene.

L'overespressione legata a pathway di induzione si verifica durante l'esposizione a β -lattamici e inibitori delle β -lattamasi (per esempio, cefoxitina, imipenem e clavulanato)^{7,8,9,10,11}, ma il processo è reversibile una volta rimossi gli agenti inducenti. Invece, la derepressione di AmpC si verifica quando le proteine coinvolte nei pathway di induzione sono compromesse da mutazioni genetiche^{12,13,14,15,16,17} e le cefalosporinasi sono prodotte in maniera costitutiva ad alti livelli, anche in assenza dell'induzione da parte dei β -lattamici^{18,19,16,20}. (Fig. 1)

FIGURA 1

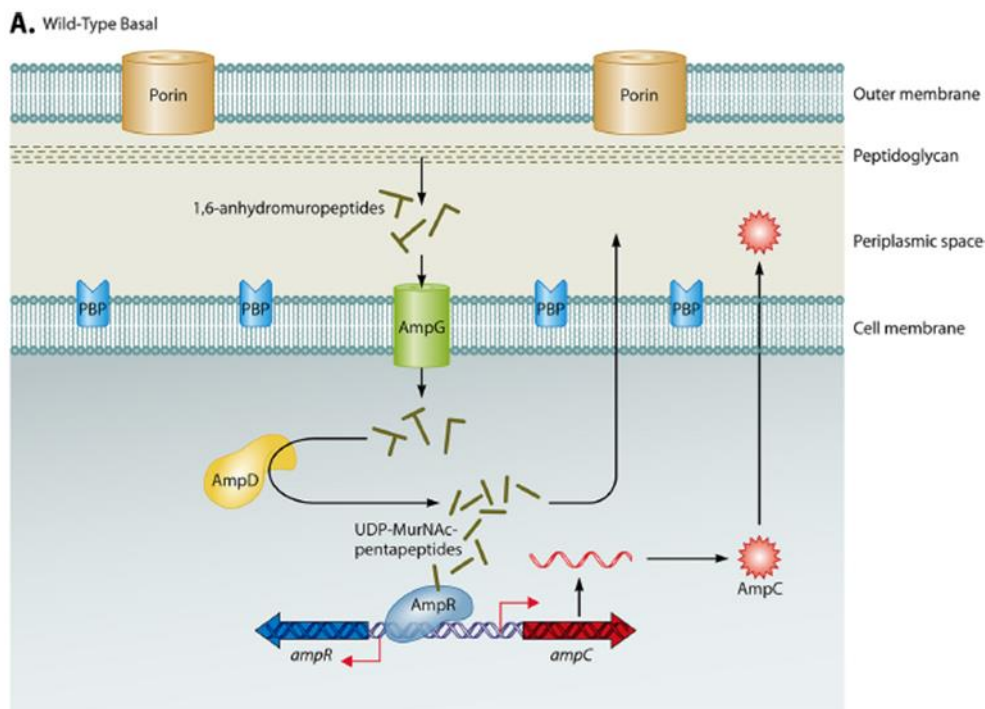
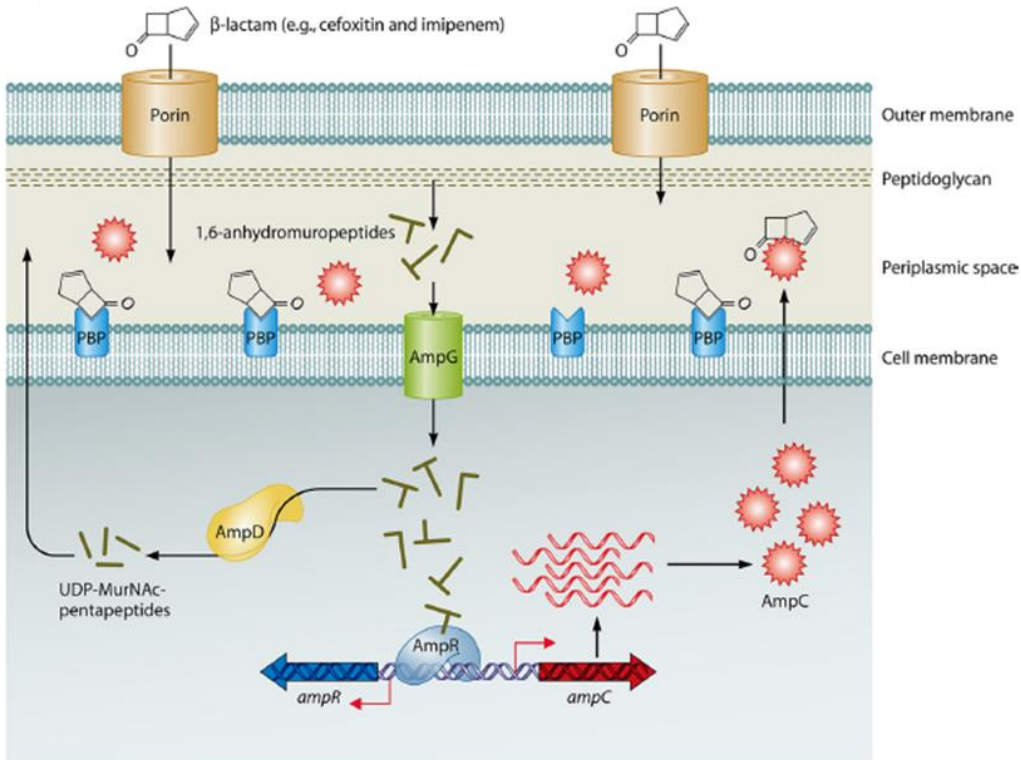
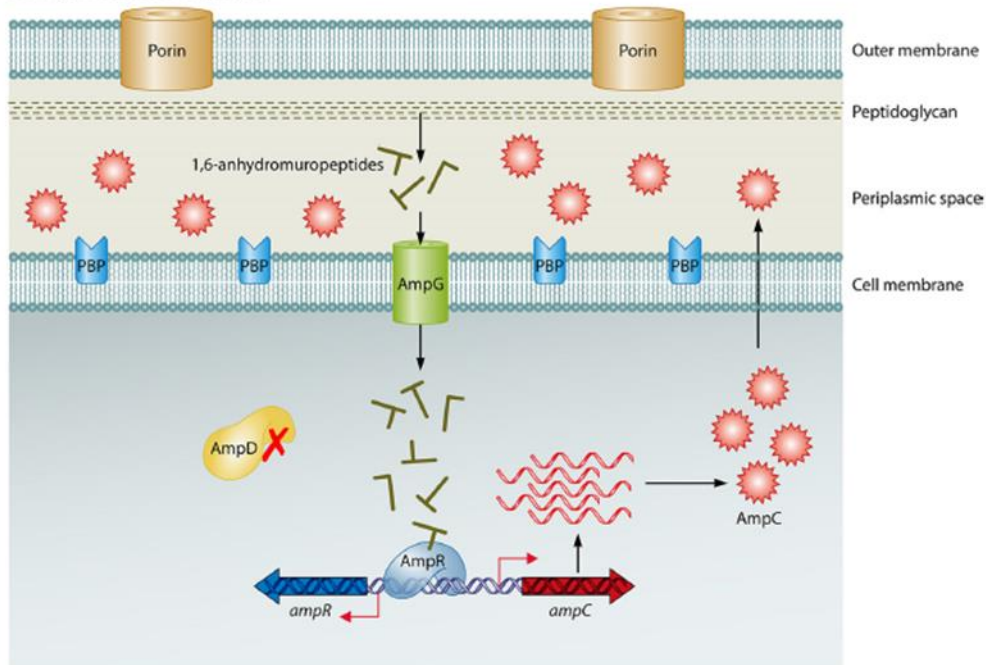


FIGURA 2:

B. β -lactam Induction



C. AmpD-Associated Derepression



Recentemente è stato dimostrato che *P.aeruginosa* può acquisire i geni delle carbapenemasi attraverso il trasferimento di plasmidi da parte di altre *Enterobacteriaceae* resistenti. Questi enzimi

appartengono, principalmente, alla classe delle metallo- β -lattamasi (VIM, IMP, SPM e GIM) e, più raramente, alla classe delle oxacillinasi (OXA40)^{21,22}.

Le metallo- β -lattamasi sono enzimi Zn-dipendenti, che costituiscono il gruppo B, uno dei maggiori gruppi di carbapenemasi. In termini di rilevanza clinica e disseminazione geografica, le famiglie più importanti sono quelle dei plasmidi che codificano per NDM, VIM, SPM e IPM. L'enzima VIM (Verona integron-encoded MBLs) è stato identificato per la prima volta nel 1996 e presenta attualmente 60 varianti alleliche; VIM-2 è la metallo- β -lattamasi più frequente a livello mondiale, presente in focolai epidemici di *P.aeruginosa*, ma non in altre Enterobacteriaceae. L'enzima São-Paulo metallo- β -lattamasi (SPM1) è unico, in quanto è rappresentato da un unico allele ospite specifico, rimanendo confinato a *P.aeruginosa*. Invece, l'enzima NDM (New Delhi Metallo- β -lattamasi) è stato identificato in ceppi di Enterobacteriaceae, *P.aeruginosa*, *A.baumannii* e altri Gram negativi non fermentanti, mostrando la più rapida e ampia diffusione a livello globale, tra le MBLs, dalla sua prima identificazione nel 2008. Questa caratteristica può essere spiegata dalla peculiare posizione di questo enzima all'interno della membrana esterna dei Gram-negativi, favorendo la sua secrezione attraverso vescicole membranose (OMV). Questo tipo di trasporto è estremamente vantaggioso, poiché protegge batteri altrimenti sensibili ai β -lattamici e favorisce la comunicazione tra ceppi resistenti e ceppi sensibili agli antibiotici. Inoltre, viene utilizzato per proteggere *P.aeruginosa* dallo stress periplasmatico, indotto dalla posizione stessa di questo enzima. Questo spiega perché NDM è secreto specificatamente attraverso queste vescicole, mentre VIM-2 e SPM-1, solo dopo un accumulo dei loro precursori, che risultano tossici per la cellula.

Questo fenomeno spiega la restrizione di queste metallo- β -lattamasi a *P.aeruginosa*, la cui fitness non è compromessa da questi enzimi. Inoltre, la sequenza genica delle metallo- β -lattamasi è cruciale non solo per definire la loro localizzazione cellulare ma anche la loro specificità per il batterio ospite. La disseminazione mondiale di NDM tra specie batteriche differenti, paragonata ad altre metallo- β -lattamasi, non è dovuta ad uno specifico pattern genetico di bla_{NDM} o ad un fenotipo di resistenza, ma solo alle sue peculiari caratteristiche strutturali, che hanno permesso a questo enzima di superare il costo della fitness e di acquisire e mantenere determinanti di resistenza anche in assenza di una pressione evolutiva^{23,24,25,26}.

Raramente *Pseudomonas* può acquisire le oxacillinasi OXA-48 like: questi enzimi inducono un'idrolisi relativamente debole delle penicilline e dei carbapenemi, ma non delle cefalosporine. Sfortunatamente, quando questi enzimi si ritrovano in combinazione con altre β -lattamasi o con modifiche delle porine determinano elevati livelli di resistenza ai carbapenemi²⁷.

- Ridotta espressione della porina OprD: la membrana esterna di *P.aeruginosa* è costituita da una barriera semipermeabile (8%), che riduce la penetrazione degli antibiotici. Per la sua sopravvivenza, comunque, *P.aeruginosa* deve permettere l'ingresso di nutrienti nella cellula e

questo si può verificare attraverso canali proteici, chiamati porine. Queste porine giocano un ruolo fisiologico importante nel trasporto di zuccheri, aminoacidi, fosfati, cationi divalenti e siderofori²⁸. Alcuni antibiotici idrofili, come β -lattamici, aminoglicosidi, tetracicline e certi fluorochinoloni, riescono ad attraversare la membrana esterna proprio tramite le porine^{29,30}. Non sorprende, quindi, che la perdita di questi canali riduca la suscettibilità di *P.aeruginosa* a questi antibiotici.

In particolare, OprD sembra essere un canale preferenziale per l'ingresso dei carbapenemi. La sua perdita riduce la sensibilità di *Pseudomonas* nei confronti dei β -lattamici, questo si traduce, clinicamente, in un aumento delle MIC degli antibiotici.

- Alterata espressione dei sistemi di efflusso: il mancato accumulo di antibiotici all'interno della cellula può essere raggiunto anche attraverso il trasporto attivo delle pompe di efflusso. Queste pompe sono state categorizzate in 5 superfamiglie, divise sulla base di sequenza aminoacidica, fonte di energia richiesta per il trasporto e specificità del substrato^{31,32}. (Fig.3)

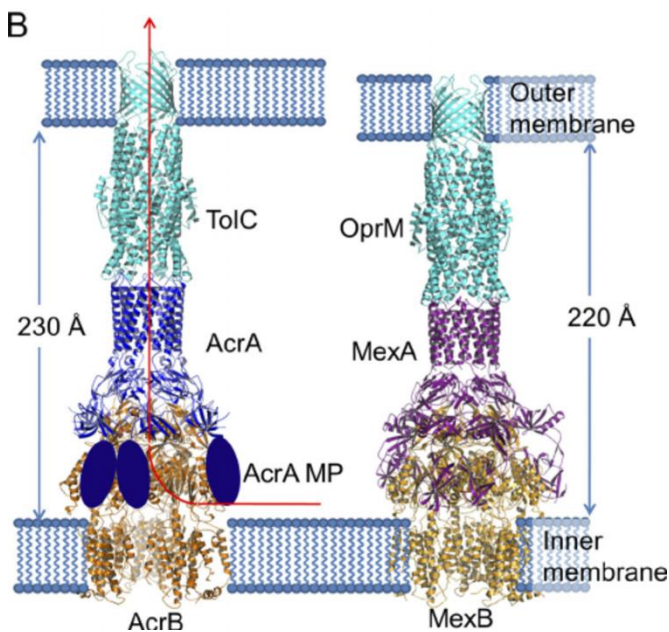


FIGURA 3

Le superfamiglie includono: 1) ATP-binding cassette, 2) small multidrug resistance, 3) major facilitator, 4) resistance nodulation division (RND) e 5) multidrug and toxic compound extrusion.

Tra queste la famiglia più importante è quella RND, che presenta un totale di 12 sistemi. La pompa RND tipicamente è formata da un sistema tripartito composto da una proteina di fusione della membrana periplasmatica (MFP), un fattore della membrana esterna (OMF) e da un trasportatore citoplasmatico di membrana (RND) (figura). Questo complesso forma un canale che attraversa completamente la membrana, permettendo il trasporto di farmaci lipofilici e amfifilici dal citoplasma e dal periplasma verso l'ambiente esterno. I geni che codificano per queste pompe sono organizzati in operoni sul cromosoma di *P.aeruginosa*. Ogni operone è composto da almeno

due geni, che codificano per MPF e RND; sei dei 12 operoni possiedono il gene OMF, completando il sistema tripartito. Diversi operoni, inoltre, possiedono, adiacente, un gene regolatore, che può essere trascritto dall'operone nello stesso verso o nel verso contrario, agendo, così, da attivatore o repressore dell'espressione delle pompe. Gli operoni possono contenere gene aggiuntivi accanto, che codificano per le pompe di efflusso.

Le dieci pompe RND di *P.aeruginosa* sono: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-OpmD, MexVW, MexPQ-OpmE, MexMN e TriABC. Mex è un acronimo per multiplo efflusso, mentre "Tri" si riferisce all'efflusso di triclosano. Molte di queste pompe condividono gli stessi substrati, come per esempio, antibiotici, biocidi, coloranti, solventi organici, idrocarburi aromatici e omoserine lattoni.

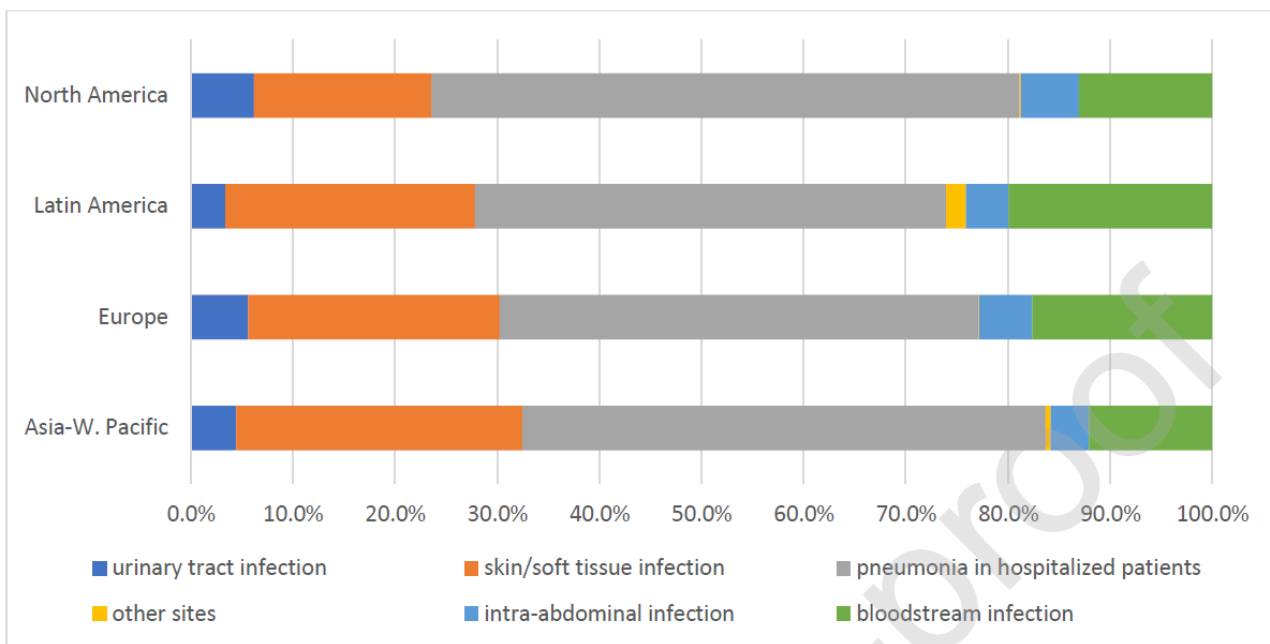
Nello specifico MexAB-OprM presenta il più ampio profilo di substrati, essendo in grado di estrarre fluorochinoloni, tetracicline, cloranfenicolo, β -lattamici (carbossipenicilline, aztreonam, cefalosporine ad ampio spettro come ceftazidime e cefotaxime), carbapenemi (meropenem), inibitori delle β -lattamasi, macrolidi, novobiocina, trimetropim e sulfamidici.

MexAB-OprM partecipa alla resistenza intrinseca di *P.aeruginosa* ai suddetti antibiotici attraverso la sua produzione costitutiva nei wild-type³³.

Abbiamo già detto che *Pseudomonas* spp. è un germe ubiquitario, prediligendo gli ambienti umidi come piscine, lavandini, sanitari, pesche idromassaggio. Può essere rilevato anche in ambiente ospedaliero, in quanto può contaminare lavandini, soluzioni antisettiche e i contenitori di raccolta delle urine, oltre i dispositivi medici come cateteri vescicali, ventilatori cateteri venosi centrali. Le manifestazioni cliniche delle infezioni da *P.aeruginosa* sono molteplici e variano da infezioni esterne minori fino a patologie gravi e potenzialmente letali; quest'ultime sono più frequenti nei soggetti immunodepressi per malattia o terapie mediche, nei pazienti oncologici, diabetici, nei neutropenici e nei soggetti che effettuano numerosi ricoveri ospedalieri.

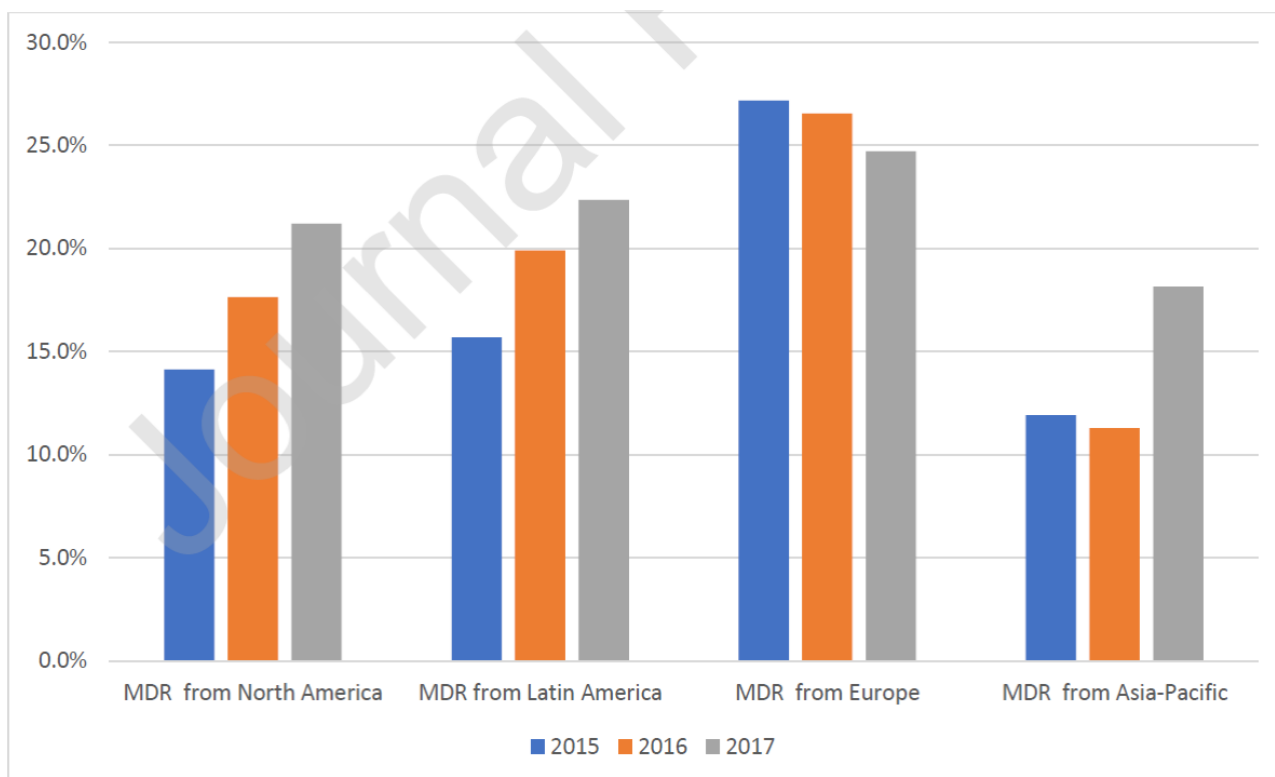
In un recente studio³⁴ condotto su 104 ospedali in 40 stati su 4 continenti, nel biennio 2015-2017, sono stati isolati 6836 ceppi di *P.aeruginosa*: gli isolamenti più frequenti sono stati polmoniti (51.6%), seguiti da infezioni di cute e tessuti molli (22.2%) e batteriemie (15.3%); altre sedi di isolamento hanno incluso infezioni intraddominali ed urinarie. Tali infezioni hanno dimostrato una diversa distribuzione geografica. (Fig.4)

FIGURA 4



Anche la percentuale di resistenze varia da continente e per anno, registrandosi la più alta percentuale in Europa (26.2%). (Fig.5)

FIGURA 5



L'International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC)³⁵, dal 2012 al 2017, ha condotto uno studio osservazionale multicentrico in 242 ospedali in 45 paesi nel mondo con l'intento di monitorare e prevenire le infezioni nosocomiali in ambito intensivo.

I risultati ottenuti mostrano una mortalità cruda del 41,6% nei pazienti affetti da batteriemie associate a cateteri venosi centrali, del 36,6% nelle polmoniti da ventilazione meccanica e 26% nelle infezioni delle vie urinarie associate a catetere. Tra i batteri identificati, i più frequentemente isolati sono stati *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *E.faecalis*, *K.pneumoniae*, *A.baumannii* ed *E.coli*; per quanto riguarda *P.aeruginosa* le percentuali di resistenza agli antibiotici variano a seconda del sito di infezione: nelle polmoniti associate a ventilatore *P.aeruginosa* risulta resistente a fluorochinoloni nel 34.6%, a piperacillina/tazobactam nel 39.2%, ad amikacina nel 24.7%, ad imipenem/meropenem nel 39.4% e a cefepime nel 40.5%. Quando, invece, viene isolato nelle infezioni delle vie urinarie associate a catetere la resistenza ai fluorochinoloni è del 40.2%, a piperacillina/tazobactam del 38.2%, ad amikacina del 26.8%, ad imipenem/meropenem del 39.3% e a cefepime del 48.1%. Infine, nelle batteriemie associate a catetere venoso centrale le resistenze sono le seguenti: fluorochinoloni 20%, piperacillina/tazobactam 33%, amikacina 21%, imipenem/meropenem 43.8%, cefepime 41.67%.

Sempre riguardo alle resistenze agli antibiotici, recentemente è stato pubblicato il MagicBullet, uno studio clinico internazionale randomizzato, intrapreso per studiare l'efficacia e la sicurezza di colitica e meropenem (entrambi in combinazione con i fluorochinoloni) nel trattamento empirico delle VAP. Sono stati arruolati 32 ospedali, suddivisi tra Grecia, Spagna ed Italia, per un totale di 53 isolati di *P.aeruginosa*: l'obiettivo era quello di caratterizzare i profili di resistenza agli antibiotici, l'epidemiologia molecolare e i meccanismi di resistenza ai carbapenemici³⁶.

Dei 53 isolati, 16 avevano un fenotipo sensibile, 2 risultavano panresistenti, 16 multiresistente e 19 estremamente resistenti. Per quanto riguarda gli antibiotici efficaci, la maggior parte dei ceppi (50/53) risultavano sensibili alla colistina, il 98.1% era resistente ad aztreonam, il 22.6% a ceftazolano/tazobactam, il 24.5% a ceftazidime/avibactam, il 64.2% ad imipenem, 58.5% a levofloxacina, 54.7% a ciprofloxacina.

Dodici ceppi presentavano carbapenemasi appartenenti alla famiglia degli enzimi VIM2, di questi 10 ceppi provenivano dalla Grecia e 2 dall'Italia. In nessun ceppo sono state rilevate carbapenemasi appartenenti alle famiglie IMP, NDM e KPC. La caratteristica importante è che questi ceppi di *Pseudomonas* esprimevano le carbapenemasi, indipendentemente dal fatto di essere stati esposti precedentemente al meropenem o alla colistina.

L'analisi molecolare ha evidenziato l'overespressione di AmpC, MexAB-OprM e MexCD-OprJ, mentre OprD risultava down-regolato

In questo quadro di frequenti infezioni da *P.aeruginosa* multiresistente, gravate da elevata mortalità si inseriscono i nuovi antibiotici appartenenti alla classe delle cefalosporine, in particolare ceftolozano-tazobactam.

Le cefalosporine sono una classe di antibiotici β -lattamici battericidi ad ampio spettro, hanno una struttura chimica ed un meccanismo d'azione simili a quelli delle penicilline; infatti, agiscono bloccando la sintesi della parete batterica, ostacolando la sintesi del peptidoglicano. L'anello diidrotiazinico 7-ACA è la struttura generale delle cefalosporine, il cui capostipite naturale è la cefalosporina C, estratta dal *Cephalosporium acremonium*. Questa cefalosporina non ebbe utilizzo in campo clinico, ma venne usata nell'industria per sintetizzare l'acido-7-aminocefalosporanico, composto bicilico provvisto di una struttura diidrotiazinicolattaminica, dalla cui acilazione si ottengono le cefalosporine semisintetiche di uso clinico.

Le cefalosporine utilizzate nella pratica clinica possono essere suddivise in cinque generazioni, che differiscono soprattutto per lo spettro d'azione antibatterico.

Le cefalosporine di I generazione sono più attive nei confronti dei batteri Gram-positivi. Appartengono a tale gruppo cefazolina, cefalexina, cefalotina, cefapirina, cefradina e cefadroxil.

La II generazione delle cefalosporine comprende cefaclor, cefamandolo, cefuroxima, cefonicid, cefprozil, ceforanide e loracarbef. Sono considerati appartenenti a questa classe anche composti dalla struttura simile quali cefmetazolo, cefoxitina e cefotetan, attivi anche contro microorganismi anaerobi. In generale, le cefalosporine di seconda generazione presentano uno spettro d'azione simile a quelle di prima generazione, ma risultano più attive contro i batteri Gram-negativi.

Le cefalosporine di III generazione come cefotaxime, ceftriaxone, cefixime, ceftizoxime, cefoperazone, ceftazidime si caratterizzano, rispetto alle generazioni precedenti, per una maggiore attività verso ceppi di *Haemophilus* e *Neisseria*, oltre che verso *Citrobacter*, *Serratia marcescens* e *Providencia*. Alcuni di questi composti, in particolare ceftazidime e cefoperazone, sono attivi anche contro *Pseudomonas aeruginosa*. In genere i composti più recenti sono meno suscettibili di inattivazione da parte di β -lattamasi batteriche, e maggiormente attivi nei confronti di alcuni batteri Gram-negativi. Una problematica associata all'utilizzo di questi composti è legata al fatto che questi sono induttori di β -lattamasi cromosomiche di tipo I, in batteri gram-negativi.

Passando dalla prima alla terza generazione si assiste ad una relativa perdita di attività sulle specie Gram positive ed un incremento del potere biologico sulle specie Gram-negative.

Le cefalosporine di IV generazione, come il cefepime, sono molto simili ai farmaci di terza generazione, dai quali però differiscono per la maggiore resistenza all'idrolisi provocata dalle β -lattamasi batteriche di origine plasmidica, rimangono però sensibili a quelle cromosomiche e alle KPC (*Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase*). Ciò conferisce a questo gruppo una maggiore efficacia nel trattamento delle infezioni da *Enterobacter*, frequentemente produttore di β -lattamasi cromosomiche, nonché nei confronti di *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* e *Neisseria*.

Le cefalosporine di V generazione (ceftarolina e ceftobiprololo) sono efficaci anche nei confronti di ceppi MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina) e nei confronti di *P. aeruginosa* e di altri Gram-negativi difficili.

A quest'ultima generazione appartiene ceftolozano-tazobactam (C/T), una nuova combinazione di cefalosporina e inibitore delle β -lattamasi attiva nei confronti di *P.aeruginosa* multiresistente. Ceftolozano è noto per la sua potente attività contro *P. aeruginosa*, con un'alta affinità per le proteine leganti la penicillina PBP1b, PBP1c, PBP2 e PBP3 e la sua stabilità in presenza di AmpC β -lattamasi. L'attività di Ceftolozano non è influenzata dall'espressione della pompa di efflusso o dalla delezione della proteina di membrana OprD; queste caratteristiche rendono la sua attività contro *P. aeruginosa* superiore a quella di altri beta lattamici, anche in presenza di ceppi produttori di biofilm. Ceftolozano, invece, non è stabile se sottoposto all'azione delle betalattamsi ad ampio spettro (ESBL), motivo per cui è stato formulato in combinazione con il tazobactam, un inibitore di questa categoria di enzimi.

Lo spettro di azione di C/T è orientato verso i gram negativi, compresi i ceppi resistenti a ceftazidime: *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus*, *Moraxella* e anche contro alcuni ceppi di *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia* e altri Gram-negativi non fermentanti, ma resta da stabilire l'utilità clinica di questo antibiotico per le infezioni causate da questi ultimi. Tra i Gram-positivi, C/T è attivo contro gli streptococchi β -emolitici (*Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*) ed mostra una certa attività anche contro gli pneumococchi, mentre non è attivo contro gli stafilococchi e gli enterococchi. Infine, C/T non ha attività contro la maggior parte dei batteri anaerobi, incluso il *Clostridium difficile*, con la possibile eccezione di alcuni ceppi di *Bacteroides spp.*

Numerosi studi di sorveglianza, sia europei che americani, hanno confermato questo spettro di azione, rivelandosi C/T attivo anche contro le infezioni polmonari da Gram negativi e contro ceppi di *P.aeruginosa* resistenti a cefalosporine, carbapenemi e piperacillina/tazobactam³⁷

In volontari sani³⁸, la farmacocinetica di C/T è dose-dipendente e lineare con tutti i dosaggi utilizzati (fino alla dose massima di 3000 mg / 1500 mg) con emivita ($t_{1/2}$) di circa 2,5 ore per ceftolozano e 1 ora per tazobactam. Sia ceftolozano che tazobactam sono escreti principalmente nelle urine, entrambi come farmaci immodificati; una piccola quota di tazobactam (20%) viene escretata come metabolita inattivo M1. Non esiste alcuna interazione farmaco-farmaco tra ceftolozano e tazobactam quando somministrati insieme.

Per quanto riguarda le caratteristiche farmacodinamiche, C/T mostra una mediana % fT> MIC

(percentuale dell'intervallo di dosaggio in cui la concentrazione libera del farmaco nel plasma supera la concentrazione minima inibente [% fT> MIC]) del 24,8% e del 32,2% per raggiungere,

rispettivamente, la batteriostasi e la killing di 1 log contro i bacilli gram-negativi nel modello murino, paragonabile ai carbapenemi³⁹.

Un obiettivo alternativo di circa 40 % fT > MIC è stato anche riportato per killing di 1 e 2 log contro *P. aeruginosa* resistente ai farmaci⁴⁰.

Essendo un farmaco escreto principalmente per via urinaria immodificato, numerosi studi si sono focalizzati sulle eventuali modifiche della farmacocinetica e dinamica di C/T, e, conseguentemente sul dosaggio più appropriato per raggiungere l'efficacia clinica senza sperimentare la tossicità da accumulo^{41,42,43}.

La dose raccomandata, sulla base della clearance della creatinina è la seguente se CLCr > 50 mL/min:

Tipo di infezione	Dose	Frequenza	Tempo di infusione	Durata del trattamento
Infezione intra-addominale complicata*	1 g ceftolozano / 0,5 g tazobactam	Ogni 8 ore	1 ora	4-14 giorni
Infezione complicata del tratto urinario Pielonefrite acuta	1 g ceftolozano / 0,5 g tazobactam	Ogni 8 ore	1 ora	7 giorni
Polmonite acquisita in ospedale, inclusa polmonite associata a ventilazione meccanica**	2 g ceftolozano / 1 g tazobactam	Ogni 8 ore	1 ora	8-14 giorni

Invece, se i pazienti presentano un'insufficienza renale, il dosaggio varia a seconda della gravità:

CrCL stimata (mL/min)*	Infezioni intra-addominali complicate, infezioni complicate del tratto urinario e pielonefrite acuta**	Polmonite acquisita in ospedale, inclusa polmonite associata a ventilazione meccanica**
Da 30 a 50	500 mg ceftolozano / 250 mg tazobactam per via endovenosa ogni 8 ore	1 g ceftolozano / 0,5 g tazobactam per via endovenosa ogni 8 ore
Da 15 a 29	250 mg ceftolozano / 125 mg tazobactam per via endovenosa ogni 8 ore	500 mg ceftolozano / 250 mg tazobactam per via endovenosa ogni 8 ore
Malattia renale allo stadio terminale in emodialisi	Una dose di carico singola da 500 mg ceftolozano / 250 mg tazobactam, seguita dopo 8 ore da una dose di mantenimento di 100 mg ceftolozano / 50 mg tazobactam, somministrata ogni 8 ore, per il restante periodo di trattamento (nei giorni dell'emodialisi la dose deve essere somministrata il prima possibile dopo il completamento dell'emodialisi)	Una dose di carico singola da 1,5 g ceftolozano / 0,75 g tazobactam, seguita dopo 8 ore da una dose di mantenimento di 300 mg ceftolozano / 150 mg tazobactam, somministrata ogni 8 ore, per il restante periodo di trattamento (nei giorni dell'emodialisi la dose deve essere somministrata il prima possibile dopo il completamento dell'emodialisi)

Lo studio ASPECT-cUTI⁴⁴ randomizzato, doppio cieco, ha dimostrato la non inferiorità di C/T nei confronti di levofloxacina nel trattamento delle pielonefriti, registrandosi una percentuale di guarigione nel gruppo C/T del 76.9% contro 68.4% della levofloxavina. Inoltre, CI 95% è risultato

superiore allo 0 per C/T, riuscendo a dimostrare addirittura la superiorità versus lo standard of care.

L'ASPECT-cIAI⁴⁵, invece, ha indagato la non inferiorità della combinazione C/T e metronidazolo nei confronti di meropenem nei soggetti affetti da infezioni addominali complicate. Questo studio, prospettico, doppio cieco, randomizzato ha dimostrato la non inferiorità di C/T, determinandosi una percentuale di guarigione clinica dell' 83% contro l' 87% del gruppo che utilizzava il carbapenemico. C/T ha evidenziato un'elevata attività nei confronti di *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, and *Streptococcus salivarius*.

Inoltre, C/T è risultato clinicamente e microbiologicamente efficace nei confronti di ceppi di *E.coli* e *Klebsiella* ESBL produttori, anche nella sottopopolazione che produceva enzimi CTX-M14/M15, altamente resistenti agli antibiotici, con una percentuale di efficacia clinica del 100%.

In uno studio su volontari sani, C/T, al dosaggio standard di 1.5 gr tre volte die, ha dimostrato di penetrare nel liquido del rivestimento epiteliale polmonare (ELF, considerato il sito di infezione nei pazienti con polmonite nosocomiale) e le concentrazioni di ELF nell'intervallo di dosaggio hanno superato le MIC della maggior parte dei comuni patogeni gram-negativi⁴⁶.

Un'ulteriore studio, l'ASPECT-NP⁴⁷ ha valutato la non inferiorità di C/T ad elevato dosaggio nei confronti di meropenem nei pazienti affetti da polmoniti associate a ventilatore e/o polmoniti nosocomiali. Il 33% della popolazione arruolata presentava una APACHE II score ≥ 20 e il 92% era ricoverato in terapia intensiva. In questo scenario C/T ha dimostrato una percentuale di guarigione del 54% contro il 53% di meropenem, confermando la non inferiorità.

Un recente studio multicentrico⁴⁸ retrospettivo ha arruolato 90 pazienti affetti da polmonite nosocomiale, di cui il 36,7% associate a ventilatore per studiare la dose migliore di C/T in questi quadri clinici, stratificando in base alla MIC di *P.aeruginosa* per C/T. I pazienti ricevevano il dosaggio standard (SD) di 1.5 gr tre volte die o aumentato (HD) di 3 gr tre volte die a discrezione del medico; l'end-point primario era la mortalità a 30 giorni.

E' stato dimostrato che il gruppo di pazienti infetti da *P.aeruginosa* con MIC <2 mg/L per C/T e che ricevevano il dosaggio aumentato avevano minori probabilità di morire (16.2%). Tale percentuale aumentava all'aumentare della MIC per C/T e se veniva utilizzato il dosaggio standard (29% con MIC < 2 mg/L e SD, 41% con MIC > 2 mg/L e HD, 60% con MIC >2 mg/L e SD). La presenza di shock settico, un elevato Charlson Comorbidity Index e MIC per C/T > 2 mg/L erano variabili indipendenti che influenzavano la mortalità.

La Food and Drug Administration americana (FDA) e, successivamente, l'European Medicine agency (EMA) hanno approvato il suo utilizzo endovena per il trattamento delle infezioni urinarie e addominali complicate al dosaggio standard (1 gr/0.5 gr/8ore) e per il trattamento delle polmoniti

nosocomiali associate a ventilatore (VAP) al dosaggio aumentato (2 gr/1 gr/8 ore). l'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA) ha autorizzato la prescrivibilità solo per le infezioni complicate intraddominali e urinarie e per le pielonefriti acute al dosaggio standard (1,5 gr ogni 8 ore); è in via di approvazione l'utilizzo del farmaco per le VAP. (Fig.6)

FIGURA 6

Scheda cartacea per la prescrizione della specialità medicinale ZERBAXA (ceftolozano-tazobactam)

Indicazioni terapeutiche: Zerbaxa è indicato per il trattamento delle seguenti infezioni negli adulti:

- Infezioni intra-addominali complicate
- Pielonefrite acuta
- Infezioni complicate del tratto urinario

Devono essere considerate le linee guida ufficiali sull'uso appropriato degli agenti antibatterici.

La rimborsabilità è limitata alla pielonefrite acuta, alle infezioni complicate del tratto urinario sostenute da batteri gram-negativi resistenti ai trattamenti di prima linea e alle infezioni addominali complicate, la cui etiologia documentata o sospetta è dovuta a batteri gram-negativi resistenti ai trattamenti di prima linea.

Azienda Sanitaria: _____	
Unità Operativa Richiedente: _____	Data: ___/___/___
Paziente (nome, cognome): _____	
Data di nascita: ___/___/___	Sesso: F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/>
Codice Fiscale o Tessera Sanitaria dell'Assistito: _____	

Diagnosi	
Infezione intra-addominale complicata (cIAI) con eziologia documentata/sospetta da batteri Gram-negativi, resistente ai trattamenti di prima linea (se si sospetta la presenza di patogeni anaerobi Zerbaxa dovrà essere associato a metronidazolo)	<input type="checkbox"/>
Pielonefrite acuta con eziologia documentata da batteri Gram-negativi resistenti ai trattamenti di prima linea (Allegare antibiogramma)	<input type="checkbox"/>
Infezione complicata del tratto urinario (cUTI) con eziologia documentata da batteri Gram-negativi resistenti ai trattamenti di prima linea (Allegare antibiogramma)	<input type="checkbox"/>

PROGRAMMA TERAPEUTICO

Farmaco	Specialità	Dose	Durata prevista
Zerbaxa	1g./0,5g. polvere per concentrato per soluzione per infusione		

Il dosaggio standard in soggetti con CrCl>50 ml/min è 1 g. ceftolozano/0,5 g. tazobactam ogni 8 ore (tempo di infusione: 1 h.) per una durata di 4-14 giorni nel trattamento delle cIAI e di 7 giorni nel trattamento della pielonefrite acuta e delle cUTI.

Nome e cognome del Medico*: _____

Recapiti del Medico*: _____

** La prescrivibilità è riservata allo specialista infettivologo o, in sua assenza, ad altro specialista con competenza infettivologica ad hoc identificato dal Comitato Infezioni Ospedaliere (CIO) istituito per legge presso tutti i presidi ospedalieri (Circolare Ministero della Sanità n. 52/1985).*

TIMBRO E FIRMA DEL MEDICO RICHIEDENTE

.CAPITOLO 2- SCOPO DELLA TESI

Lo scopo del nostro studio è stato quello di eseguire una sorveglianza attiva delle prescrizioni di C/T, effettuate all'interno degli Ospedali Riuniti di Ancona-presidio Umberto I da Novembre 2016 ad Aprile 2019, e, successivamente, di caratterizzare i pattern di resistenza dei ceppi di *P.aeruginosa* contro gli antibiotici di uso comune e C/T, i meccanismi insiti e la loro prevalenza. Inoltre, è stata analizzata la distribuzione dei ceppi resistenti fra le diverse tipologie di pazienti in base alla fonte d'isolamento e in base al reparto di provenienza.

CAPITOLO 3- MATERIALI E METODI

Per quanto riguarda la parte clinica, è stato condotto uno studio retrospettivo di coorte su tutti i pazienti di età ≥ 18 anni, ricoverati c/o il presidio Umberto I-Ospedali riuniti di Ancona da Novembre 2016 ad Aprile 2019, per cui è stata effettuata una prescrizione di C/T nei confronti di qualsiasi infezione da Gram negativi. I pazienti sono stati valutati una sola volta al momento della prima prescrizione dell'antibiotico; successive prescrizioni per lo stesso paziente sono state considerate fallimento terapeutico.

Le informazioni sono state raccolte consultando le cartelle cliniche e i dati riportati dal Laboratorio Centrale del nostro nosocomio.

Le variabili legate al paziente, che sono state prese in considerazione, sono stati i dati demografici (età, sesso), la presenza di comorbidità sia considerate singolarmente (diabete, BPCO, tumori ematologici e solidi, epatite cronica, patologia cardiovascolare, neurologica, gastrointestinale, insufficienza renale cronica, HIV, neutropenia, trapianto di organo solido) che valutate tramite il Charlson score. Inoltre, sono state valutate le singole comorbidità insorte in acuto, tra le quali la presentazione con shock settico, la presenza di polmonite, insufficienza renale acuta, la perforazione gastrointestinale e altre.

Come variabili legate all'ospedalizzazione, oltre l'aver definito un'infezione come nosocomiale o legata alle cure, abbiamo valutato il tipo di reparto in cui si è effettuata la prescrizione di C/T (reparto chirurgico, intensivistico, medico oppure case di cura private). Abbiamo riportato la presenza o meno di catetere venoso centrale (CVC) e di altri devices (tracheostomia, sondino naso-gastrico, drenaggi, catetere vescicale), l'aver effettuato delle manovre invasive nelle 72 ore precedenti, tra cui il posizionamento di sondino naso-gastrico, l'intubazione, la broncoscopia, l'esofagogastroduodenoscopia, la colonscopia, la ventilazione meccanica, la rimozione o la sostituzione dei drenaggi e la tracheostomia, la CVVH, la somministrazione di terapia steroidea o immunosoppressiva nei 30 giorni precedenti, intervento chirurgo nei 3 mesi precedenti, la presenza di altre infezioni batteriche concomitanti o insorte nei 30 giorni precedenti.

Le variabili legate al trattamento antibiotico prese in considerazione in questo studio sono state infine l'aver effettuato una terapia antibiotica nei 30 giorni precedenti la prescrizione di C/T e le classi antibiotiche effettuate, se il C/T è stato somministrato a dosaggio standard o aumentato e quale criterio di prescrivibilità AIFA era stato rispettato o se il farmaco era stato prescritto off-label.

L'outcome è stato definito come fallimento se insorgeva morte entro 30 giorni correlata all'infezione in atto, se si verificava una recidiva o non risposta microbiologica.

3.1 METODICHE LABORATORISTICHE

Per gli esperimenti microbiologici sono stati selezionati tutti gli *P. aeruginosa* isolati presso il laboratorio di microbiologia clinica degli "Ospedali Riuniti" di Ancona in un periodo compreso fra Ottobre 2018 e Marzo 2019. Gli isolati sono stati identificati tramite MALDI-ToF (Biomerieux, Francia). La sensibilità agli antibiotici è stata valutata tramite VitekII system (Biomerieux, Francia).

DETERMINAZIONE DELLE MIC

La minima concentrazione inibitoria (MIC) al C/T è stata determinata tramite microdiluizione in brodo e confermata mediante e-test seguendo le indicazioni della "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST). Sono state saggiate diverse concentrazioni di ceftolozano mantenendo una concentrazione fissa di 4mg/L di tazobactam. La MIC è stata determinata come la più piccola diluizione di antibiotico e inibitore delle betalattamasi in grado di inibire la crescita visibile del ceppo batterico. L'e-test è stato eseguito utilizzando le MIC test strip (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi), seguendo le istruzioni del produttore. I breakpoint utilizzanti per l'interpretazione delle MIC sono disponibili al sito https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.

TEST AMP-C

Il test fenotipico per la produzione di AmpC è stato eseguito utilizzando il kit "AmpC disks kit" (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi), seguendo le istruzioni del produttore.

PULSED FIELD GEL ELECTROPHORESIS

La tipizzazione degli isolati è stata eseguita mediante Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) tramite CHEF Mapper XA (Biorad, USA). Le plug sono state preparate seguendo il protocollo elaborato da Hu e Manos (In book: Pulse Field Gel Electrophoresis Methods and Protocols Edition: 1st Chapter: Pulsed-Field Gel Electrophoresis of *Pseudomonas aeruginosa* Publisher: Humana Press Editors: Kieran Jordan and Marion Dalmasso). Le plugs sono state digerite con 30U di enzima SpeI (ThermoFisher Scientific, USA). I parametri di corsa utilizzati sono i seguenti: 6.0 v/cm, angolo di incidenza 120°, switch iniziale 1s, switch finale 30s, durata della corsa 22h, ramping factor lineare. Il gel è stato colorato con soluzione al bromuro d'etidio (0,5mg/L) e fotografato tramite "Moonlight" (Diatech, Jesi). La classificazione dei pulstotipi ha seguito i criteri stabiliti da Tenover et al. (J Clin Microbiol. 1995 Sep; 33(9): 2233–2239. Interpreting chromosomal

DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.)

ESTRAZIONE DEL DNA

L'estrazione del DNA è stata eseguita mediante il kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific, USA), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. Il DNA estratto è stato conservato a -20°C per i successivi esperimenti.

PCR

La presenza di geni codificanti ESBL o carbapenemasi è stata confermata tramite reazioni di PCR e di RealTime-PCR. Le PCR sono state eseguite con l'enzima "DreamTaq Polymerase" (ThermoFisher Scientific, USA), utilizzando primer e condizioni di corsa descritte precedentemente (*Galani Eurosurveillance 2017). Il test è stato eseguito sui geni *bla_{ampC}*, *bla_{KPC}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{GES}*. La presenza dei geni è stata confermata mediante Real-Time utilizzando il "GoTaq qPCR system" (Promega, USA) e sonde TaqMan (ThermoFisher Scientific, USA).

NGS E ANALISI GENOMA

Il genoma dei ceppi di *P. aeruginosa* resistenti al C/T è stato completamente sequenziato, selezionando un ceppo per ogni pulsotipo identificato. Il sequenziamento del genoma è stato eseguito mediante piattaforma Illumina (Illumina Inc, USA) con reads 2x150bp. L'assemblaggio delle reads è stato eseguito con il software SPAdes v.3.11.1 (<http://spades.bioinf.spbau.ru/>). Per l'annotazione delle ORF, l'assegnazione del sequence type (MLST), l'identificazione degli SNP e la costruzione dell'albero filogenetico è stato utilizzato il sito del "Centre for Genomic Epidemiology" (<http://www.genomicepidemiology.org/>). L'identificazione delle mutazioni a carico di *ampC*, *ampR* e *oprD* è stata eseguita mediante BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) utilizzando come genoma di riferimento *P. aeruginosa* PAO1 (acc. No. NC_002516.2). L'analisi dei meccanismi di patogenicità è stata eseguita utilizzando myDbFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MyDbFinder-1.2/>) e costruendo un database custom ricavato dal sito <http://www.mgc.ac.cn/VFs/>.

CAPITOLO 4- RISULTATI

4.1 RISULTATI CLINICI

Da novembre 2016 ad aprile 2019, all'interno dell'Azienda Ospedaliera Umberto I di Ancona, C/T è stato prescritto in 34 pazienti. Le caratteristiche generali dei pazienti sono riportate in Tabella 1.

TABELLA 1

	All
Variables	34
Patients variables	
Sex n° (%)	
• Male	14 (41%)
• Female	20(59%)
Age (years) mean	63
Charlsons CI >3, n° (%)	18 (53%)
Comorbidities, n° (%)	
• Diabetes	5 (14%)
• BPCO	3 (9%)
• Ematological malign	6 (18%)
• Solid tumors	1 (3%)
• Chronic Hepatitis	2 (6%)
• CV Dis	11 (32%)
• Neurological dis	13 (38%)
• CRI	3 (9%)
• HIV	1 (3%)
• Neutropenia	5 (14%)
• GI dis	3 (9%)
• SOT	1 (3%)
• Others	6 (18%)
Acute comorbidities, n° (%)	
• Septic shock	2 (6%)
• Pneumonia	11 (32%)
• AKF	2 (6 %)
• GI perforation	0
• Pulmonary embolism	2 (6 %)

• Hemorrhage	2 (6 %)
Hospitalization variables	
Nosocomial infection, n° (%)	29 (85%)
HC-Related infection, n° (%)	5 (15%)
Words submitting index culture n° (%),	
• ICU	10 (20 %)
• Surgery	12 (15%)
• Medicine	22 (65%)
Pre-infection variables	
CVC, n° (%)	12 (35%)
SNG, n° (%)	4 (12%)
Surgical drainage, n° (%)	3 (9%)
Urinary catheter, n° (%)	9 (26%)
Endoscopy, n° (%)	3 (9%)
Mechanical ventilation, n° (%)	3 (9%)
CVVH, n° (%)	0
Steroid therapy n° (%),	6 (18%)
Immunosuppressive therapy,	5 (15%)
Previous Surgery, n° (%)	7 (21%)
• GI surgery	4 (12%)
• CV surgery	1 (3%)
• Urologic surgery	0
• Neurosurgery	1 (3%)
• Ortopedic surgery	0
• Plastic surgery	0
• Thoracic surgery	1 (3%)
Microbiologic variables	
Isolation, n° (%)	
• Pseudomonas aeruginosa	19 (56%)
• Escherichia coli ESBL	5 (14%)
• Klebsiella spp	2 (6%)
• Empirical use	8 (24%)
Sites of isolation, n° (%)	
• Urinary tract	9 (26%)

• Bronchial / pleural fluid	12(35%)
• abdominal fluid	0
• wounds	6 (18%)
• blood	7 (21%)
Other infections, n° (%)	
• Previous infections	12 (35%)
• Concomitant	9 (26%)
Treatment variables	
Previous antibiotic therapy, n° (%)	18 (53%)
• Penicillins	4 (12%)
• Cephalosporins	4 (12%)
• Carbapenems	7 (21%)
• Fluoroquinolones	2 (6%)
• Macrolides	2 (6%)
• Aminoglycosides	4 (12%)
• Tygeciline	3 (9%)
• Colistin	0
• Others	10 (29%)
Days of antibiotic therapy, (median)	10
Monotherapy, n° (%)	29 (85%)
Standard dosage, n° (%)	31 (91%)
Mortality of 30 days, n° (%)	6 (18%)

I pazienti erano in prevalenza di sesso femminile (59%), con un età media di 63 anni. Nel 53% dei casi i pazienti presentavano un Charlsons Comorbidity Index ≥ 3 . Le comorbidity croniche rilevate erano le seguenti: BPCO (3/34, 9% dei casi), diabete (5/34, 15% dei casi), patologie cardiovascolari (11/34, 32% dei casi), patologie neurologiche (13/34, 38%), insufficienza renale cronica (3/34, 9% dei casi), neutropenia (5/34, 14% dei casi), diabete (5/34, 14% dei casi), patologie gastrointestinali (3/34, 9% dei casi). Inoltre 1 paziente presentava tumore d'organo solido (epatocarcinoma), 1 paziente era affetto da HIV e 1 paziente era stato sottoposto a trapianto di fegato.

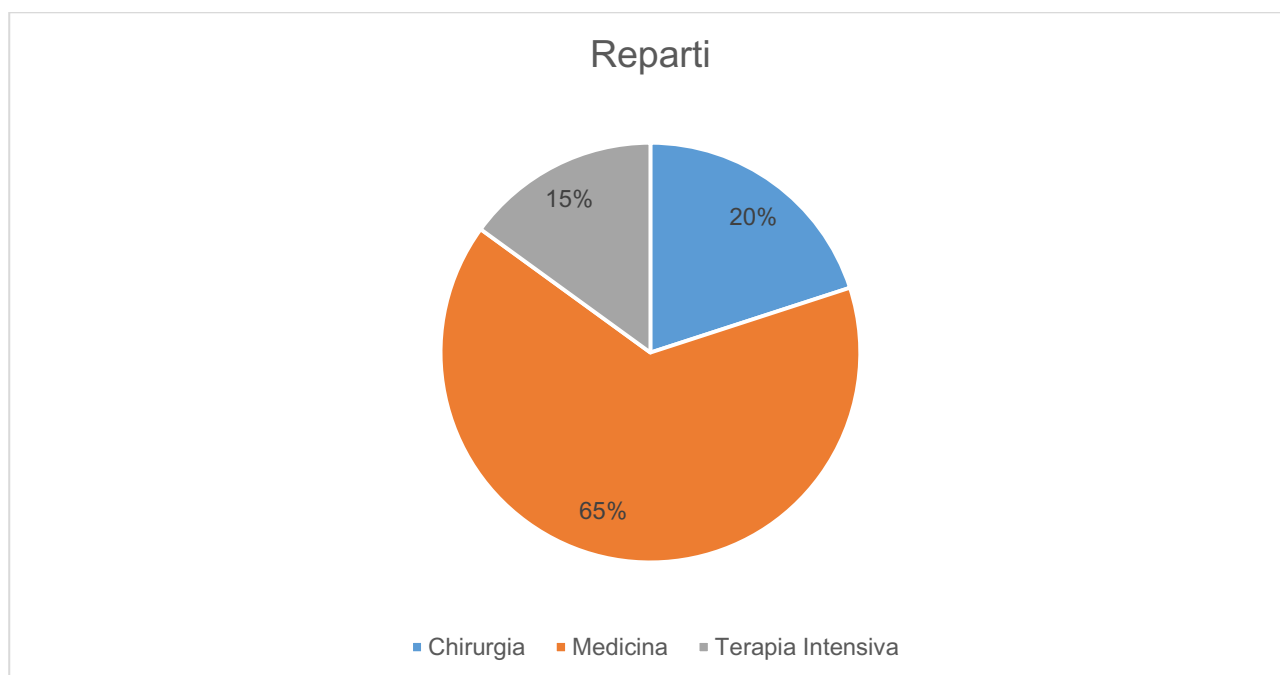
Sette pazienti (21%), inoltre, erano stati sottoposti ad intervento chirurgico nei 3 mesi precedenti l'infezione, di cui 4 ad intervento gastrointestinale, 1 ad intervento toracico, 1 ad intervento

neurochirurgico ed 1 ad intervento cardiovascolare. 12 pazienti (35%) erano portatori di CVC e 9 (26%) di catetere vescicale. Nelle 72 ore precedenti l'insorgenza dell'infezione in 4 pazienti era stato posizionato un sondino nasogastrico ed in 3 un drenaggio chirurgico, 3 pazienti erano stati sottoposti a ventilazione meccanica. Nel mese precedente invece 6 (18%) pazienti avevano assunto terapia steroidea e 5 (15%) terapia immunosoppressiva.

Per quanto concerne le comorbidità acute, 11 pazienti (32%) presentavano una polmonite, 2 shock settico, 2 insufficienza renale acuta, 2 embolia polmonare e 2 emorragia.

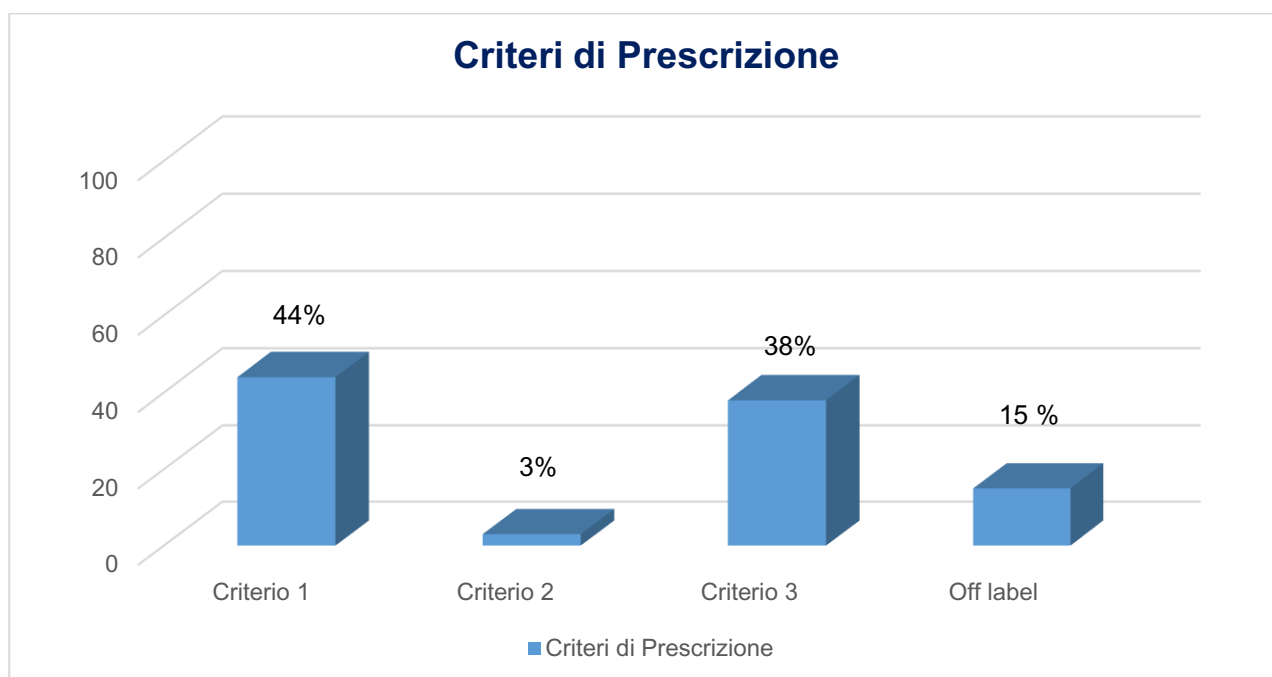
C/T è stato prescritto nel 20% dei casi in un reparto intensivistico, nel 15% dei casi in ambiente chirurgico e nel 65 % dei casi in un reparto medico. Nel particolare il farmaco è stato utilizzato nei seguenti reparti: 1 paziente in Chirurgia Vascolare, 2 in Clinica di Rianimazione, 4 in Divisione di Rianimazione, 3 in ematologia, 1 in Chirurgia dei trapianti, 10 in Clinica Malattie Infettive, 5 in Divisione Malattie Infettive, 1 in Ortopedia, 1 in Urologia, 2 in Medicina Subintensiva, 1 in Medicina Vascolare, 1 in TIPO e 1 in UTIC (Fig. 7).

FIGURA 7



In 15 casi il C/T è stato prescritto secondo il criterio 1 (44%), in 13 casi (38%) secondo il criterio 3, in 1 caso (3%) secondo i criteri 1, 2, 3 e in 5 casi (15%) l'utilizzo di tale antibiotico era off label (Fig. 8). Di questi, 3 pazienti presentavano una polmonite da *P.aeruginosa* su fibrosi cistica ed in questi casi il C/T è stato somministrato al dosaggio di 3 gr per 3 volte/die.

FIGURA 8



In 19 casi il germe isolato è stato *P.aeruginosa*, in 5 casi *E.coli ESBL*, in 2 *Klebsiella spp.* In 8 casi l'antibiotico è stato prescritto in assenza di un isolato, ma in pazienti con febbre e precedenti infezioni di ferita chirurgica o addominali recidivanti, sostenute da batteri gram negativi.

Per quanto riguarda i ceppi di *P.aeruginosa*, questi si sono dimostrati maggiormente resistenti ai carbapenemi, piperacillina/tazobactam, cefalosporine e fluororchinoloni; colistina, invece, risulta l'antibiotico più efficace (Tab.2)

TABELLA 2

Antimicrobial	Non susceptibility (%)
Amikacin	9
Cefepime	12
Ceftazidime	13
Ciprofloxacin	19
Colistin	2
Gentamicyn	10
Piperacillin/Tazobactam	18
Meropenem	19
Imipenem-cilastatin	19

Le colture positive provenivano nel 35% dei casi da broncoaspirato e liquido pleurico, nel 26% dalle vie urinarie, nel 18% da tamponi di ferite e nel 21% dei casi i germi sono stati isolati da sangue. In 2 casi è stata riscontrata successivamente resistenza a C/T, e in 1 di questi si è assistito all'exitus del paziente entro 7 giorni dall'inizio della terapia.

In 29 pazienti C/T è stato utilizzato da solo, negli altri casi in associazione ad aminoglicoside, tigeciclina e colistina. 18 pazienti avevano ricevuto una terapia antibiotica empirica precedente a C/T: gli antibiotici più utilizzati erano i carbapenemi, seguiti da cefalosporine, penicilline ed aminoglicosidi. In 9 casi è stata riscontrata un'altra infezione concomitante. Il tempo mediano di prescrizione di C/T è stato di 10 giorni.

La mortalità a 30 giorni è risultata del 18% (6 pazienti su 34 totali). Se consideriamo il fallimento terapeutico, inteso come mancanza di risposta alla terapia, recidiva dopo sospensione della terapia antibiotica e mortalità entro i 30 giorni, questo si è verificato in 9 pazienti. Abbiamo, quindi, confrontato tale gruppo con quello dei pazienti in cui il trattamento con C/T è stato associato a risoluzione del quadro clinico, al fine di identificare i fattori associati a fallimento terapeutico (Tabella 3).

TABELLA 3

	Successfull clinical outcome (25)	Clinical failure (9)	P
Variables			
Patients variables			
Sex, n° (%)			
• Male	10 (40%)	4 (44%)	1
• Female	15 (60%)	5 (66%)	
Age (years), mean (IQR)	68	65	1
Charlson's CI >3, n° (%)	10 (40%)	8 (89%)	0.02
Comorbidities , n° (%)			
• Diabetes	4 (16%)	1 (11%)	1
• BPCO	1 (4%)	2 (22%)	0.164
• Ematological malign	3 (12%)	3 (33%)	0.305
• Solid tumors	1 (4%)	0	1
• Chronic Hepatitis	2 (8%)	0	1

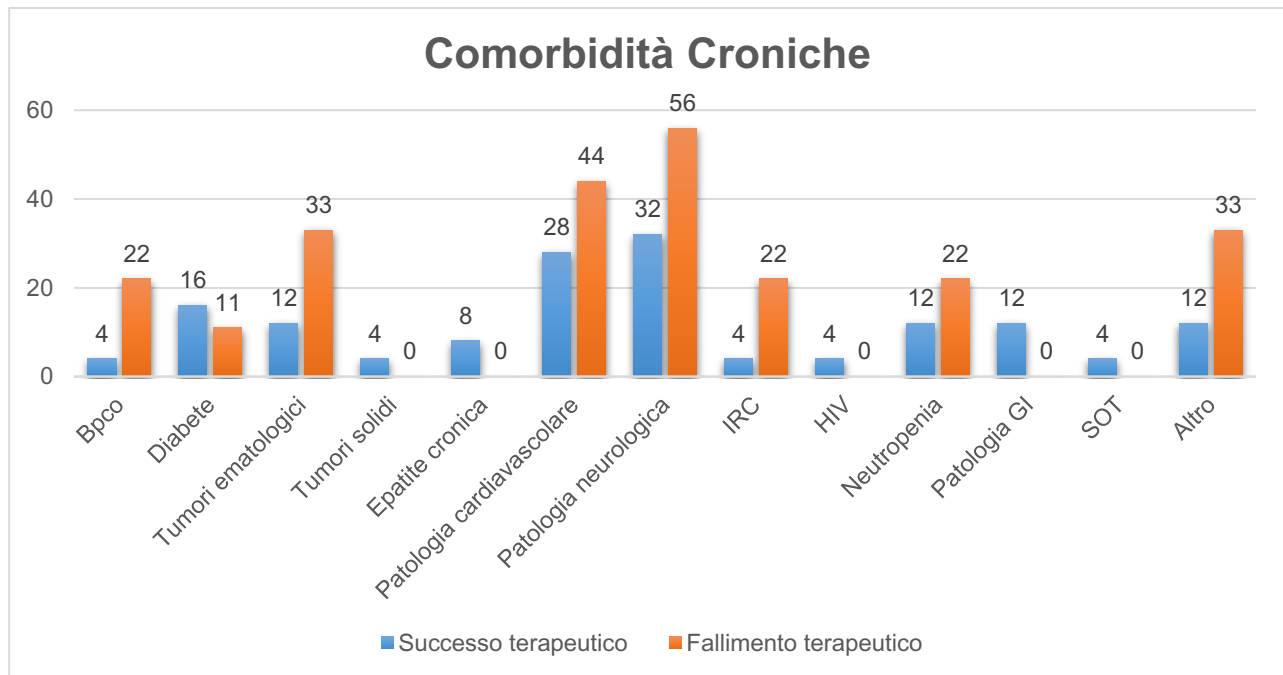
• CV Dis	7 (28%)	4 (44%)	0.425
• Neurological dis	8 (32%)	5 (56%)	0.253
• CRI	1 (4%)	2 (22%)	0.164
• HIV	1 (4%)	0	1
• Neutropenia	3 (12%)	2 (22%)	0.590
• GI dis	3 (12%)	0	0.548
• SOT	1 (4%)	0	1
• Others	3 (12%)	3 (33%)	0.548
Acute comorbidities, n° (%)			
• Septic shock	1 (4%)	1 (11%)	0.465
• Pneumonia	5 (20%)	6 (67%)	0.032
• AKF	0	2 (22%)	0.060
• GI perforation	0	0	1
• Pulmonary embolism	2 (8%)	0	1
• Hemorrhage	1 (4%)	1 (4%)	0.465
Hospitalization variables			
Nosocomial infection, n° (%)	23 (94%)	6 (67%)	0.102
HC-Related infection n° (%)	2 (6%)	3 (33%)	
Wards submitting index culture, n° (%)			
• ICU	7 (28%)	3 (33%)	1
• Surgery	12 (48%)	0	0.013
• Medicine	19 (76%)	3 (33%)	0.302
Pre-infection variables			
CVC, n° (%)	7 (28%)	5 (56%)	0.223
SNG, n° (%)	2 (6%)	2 (22%)	0.280
Surgical drainage, n° (%)	1 (4%)	2 (22%)	0.164
Urinary catheter, n° (%)	5 (20%)	4 (44%)	0.200
Endoscopy, n° (%)	2 (6%)	1 (11%)	1
Mechanical ventilation, n° (%)	1 (4%)	2 (22%)	0.164
CVVH, n° (%)	0	0	
Steroid therapy, n° (%)	2 (6%)	4 (44%)	0.035
Immunosuppressive therapy, n° (%)	3 (12%)	2 (22%)	0.590

Previous Surgery, n° (%)	4 (16%)	3 (12%)	0.348
• GI surgery	3 (12%)	1 (11%)	
• CV surgery	0	1 (11%)	
• Urologic surgery	0	0	
• Neurosurgery	1 (4%)	0	
• Ortopedic surgery	0	0	
• Plastic surgery	0	0	
• Thoracic surgery	0	1 (11%)	
Microbiologic variables			
Isolation, n° (%)			
• Pseudomonas aeruginosa	11 (44%)	8 (89%)	0.046
• Escherichia coli ESBL	4 (16%)	1 (11%)	1
• Klebsiella spp	2 (16%)	0	1
• Empirical use	8 (32%)	0	0.077
Sites of isolation, n° (%)			
• Urinary tract	7 (28%)	2 (22%)	1
• Bronchial / pleural fluid	7 (28%)	5 (56%)	0.223
• abdominal fluid	0	0	0
• wounds	5 (20%)	1 (11%)	1
• blood	6 (24%)	1 (11%)	0.644
Other infections, n° (%)			
• Previous infections	9 (36%)	3 (12%)	1
• Concomitant	7 (28%)	2 (22%)	1
Days of antibiotic therapy, (median)	11	10	0.399
Monotherapy, n° (%)	24 (96%)	5 (56%)	0.011
Standard dosage, n° (%)	11 (44%)	7 (78%)	0.125

I pazienti falliti alla terapia erano in prevalenza di sesso femminile (56%), e presentavano un'età mediana minore rispetto all'altro gruppo (65 e 68 anni rispettivamente), senza differenze significative. Per quanto riguarda le comorbidità croniche, i pazienti con fallimento terapeutico presentavano più frequentemente un Charlson Comorbidity Index ≥ 3 (89% vs 40%), con una differenza statisticamente significativa (p 0.002); BPCO (22% vs 4%), tumori ematologici (33% vs 12%), patologie cardiovascolari (44% vs 28%), patologie neurologiche (56% vs 32%), IRC (22%

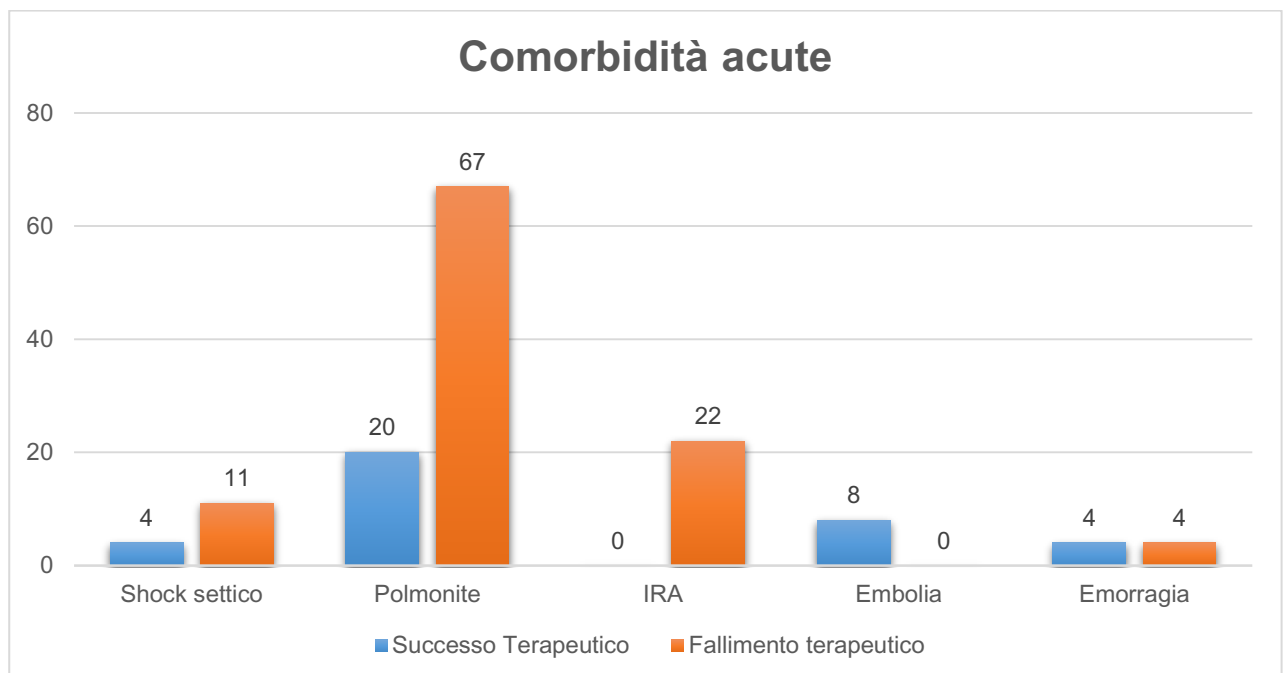
vs 4%), neutropenia (22% vs 12%). Tali differenze non sono risultate stitisticamente significative. (Fig 9)

FIGURA 9



Tra le comorbidity acute, la polmonite era significativamente più frequente nei pazienti con fallimento terapeutico (p 0.032). Anche l'insufficienza renale acuta è stata riscontrata maggiormente in questo gruppo di pazienti, ma tale dato si avvicina alla significatività statistica senza però raggiungerla (p 0.06). (Fig. 10)

FIGURA 10



L'infezione era nosocomiale in una maggior percentuale di pazienti con outcome positivo (92%) rispetto all'altro gruppo (67%), senza differenze significative. Tre dei 9 pazienti con outcome negativo, avevano un'infezione correlata alle cure mediche: 2 pazienti erano affetti da fibrosi cistica, 1 pazienti da tumore ematologico. Dei 6 pazienti che avevano contratto l'infezione in ambiente ospedaliero e che non avevano risposto al trattamento, 3 (33%) erano ricoverati in un reparto internistico e 3 (33%) in ambiente intensivistico, senza differenze statisticamente significative rispetto all'altro gruppo. Al contrario, la degenza in un reparto chirurgico era significativamente più frequente nei pazienti con outcome positivo, mentre nell'altro gruppo nessun paziente era stato ricoverato in chirurgia (p 0.013). I pazienti con fallimento terapeutico, inoltre, avevano assunto più frequentemente terapia steroidea (p 0.035) e presentavano maggiormente un'infezione sostenuta da *P. aeruginosa* (p 0.046). (Fig.11-12)

FIGURA 11

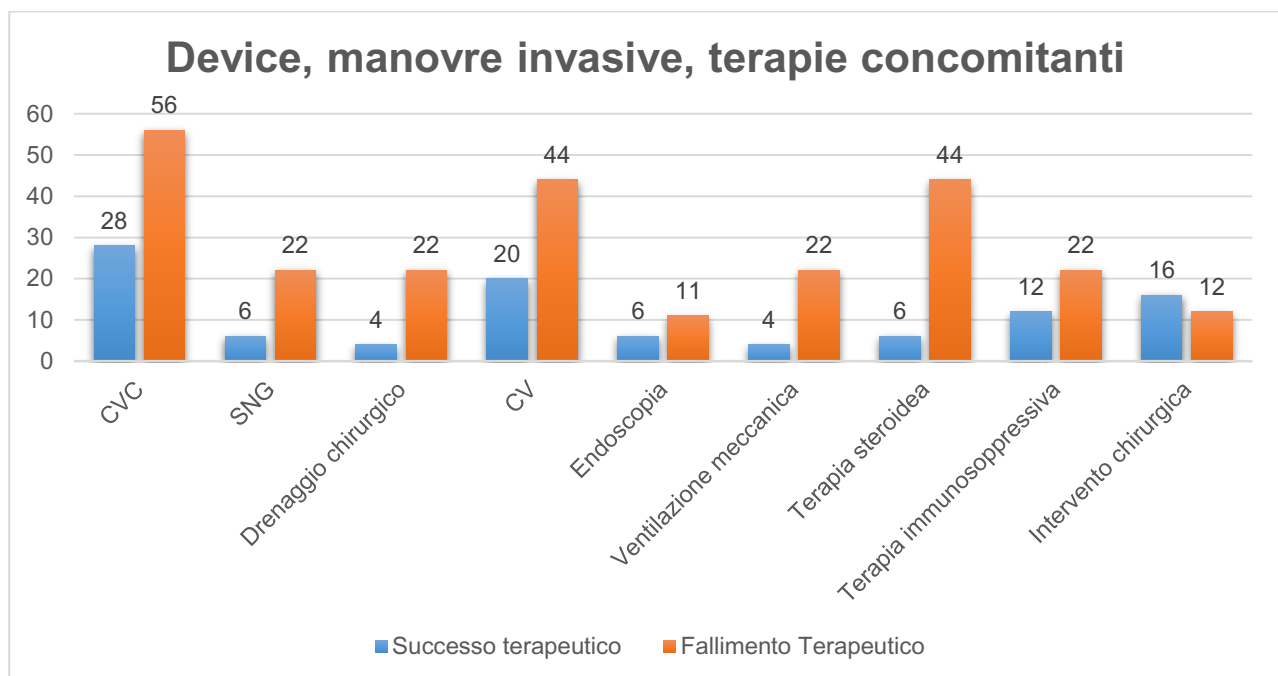
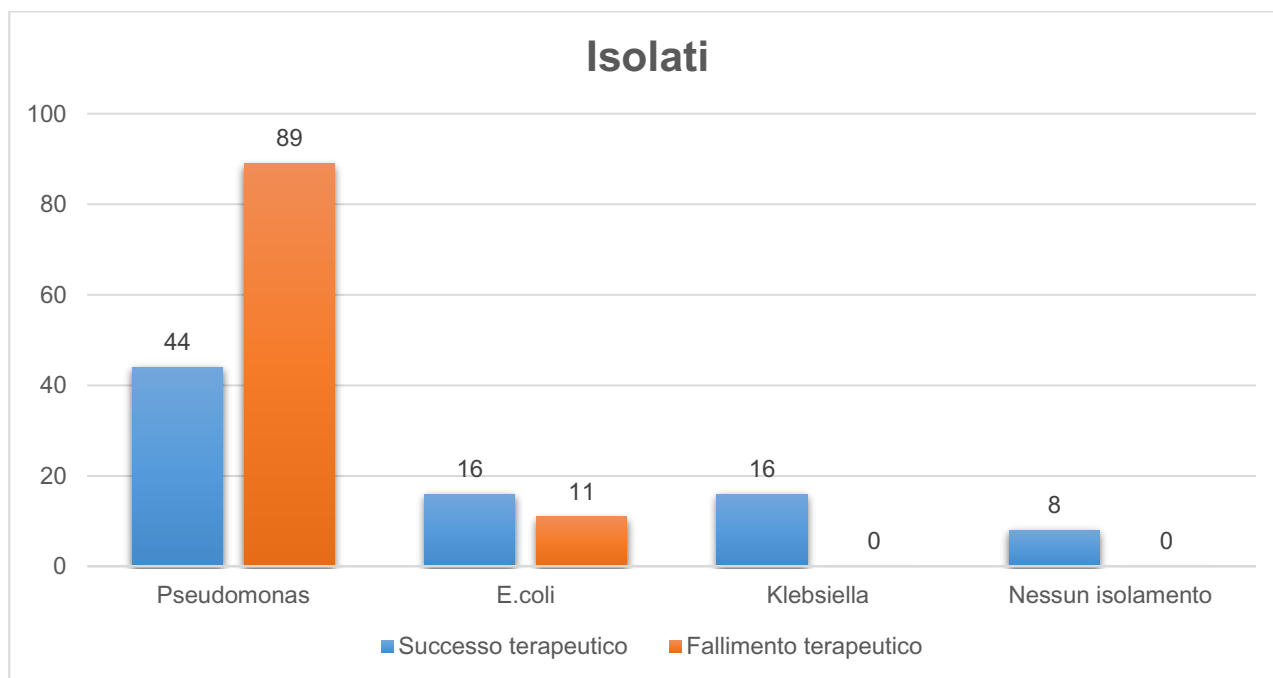
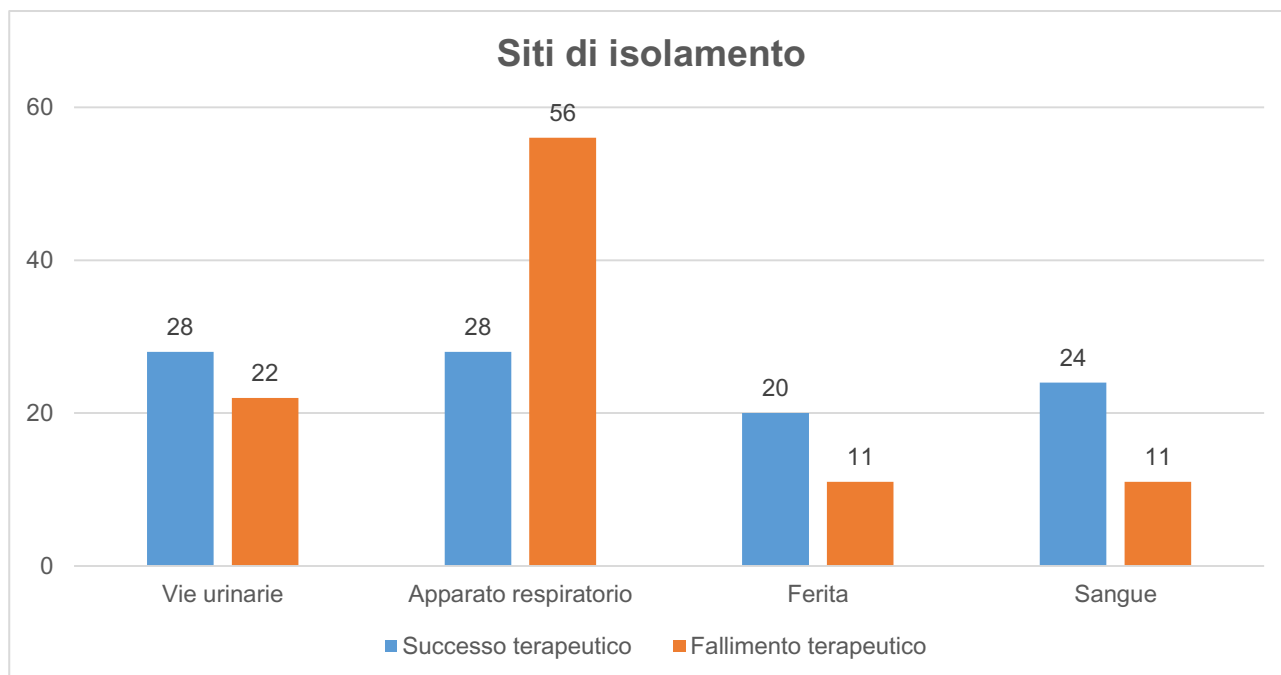


FIGURA 12



Andando a considerare il sito da cui è stato isolato il germe invece, i pazienti in cui non si è osservata una risposta clinica al farmaco, presentavano più frequentemente un isolamento microbico dalle vie respiratorie (56% vs 28%). Questa differenza tuttavia non ha raggiunto la significatività (Fig.13).

FIGURA 13



Nello specifico, abbiamo poi valutato le caratteristiche di 13 dei 19 pazienti affetti da infezioni sostenute da *P.aeruginosa*, per cui erano disponibili le cartelle cliniche

Età	Sesso	Reparto	Comorbidità	Acute Comorbidity	Terapia antibiotica ^a	Procedure invasive ^b	Device	Chirurgia ^c	Iterapia steroidea /immunosoppressiva ^d	GG di ospedalizzazione (n°) ^a	Outcome
58	M	Subintensive care unit	COPD, diabetes mellitus, , gastrointestinal and neurological diseases cardiovascular	Pneumonia, ischemic colitis	Carbapenems	PEG, Mechanical ventilation, pressure ulcer	CVC, CV	no	No	9	Dead a 30 days
74	M	Subintensive care unit	cardiovascular and neurological diseases	Pneumonia, pressure ulcer, Clostridium colitis	Carbapenems, Penicillins, Cephalosporins	No	SNG	no	corticosteroids	43	Dead a 30 days
86	M	Subintensive care unit	Chronic kidney disease, cardiovascular and neurological diseases	Pneumonia, AKF	Carbapenems	No	no	Orthopedic surgery	No	3	Survived
85	F	Subintensive care unit	Solid tumors,diabetes mellitus, cardiovascular diseases	Obstructive jaundice	Not available	Surgical Drainage	no	no	Immunossuppressive Therapy	9	Not available
65	F	UTIC	Chronic kidney disease, heart failure, hypotiroidism	Cardiac shock, multimicrobial sepsis, ictus, brian stroke	Carbapenems, Penicillins, Cephalosporins	No	CVC, CV	Cardiologic surgery	No	148	Survived at 30 days
73	M	Subintensive care unit	Gastrointestinal, neurological and cardiovascular diseases	Septic shock, pneumonia, AKF,pressure ulcer, IMA and brian stroke	Ceftlozono/tazobactam, colistin	PEG	CV	no	No	28	Survived at 15 days
75	M	ICU	Cardiovascular, neurological diseases, CRI	Brian stroke	Carbapenems, glicopeptides	Tracheostomia, PEG	CVC, CV	Cardiologic surgery	No	23	Dead
71	M	Clinic of Infectious diseases	COPD, pulmonary tumor, cardiovascular disease	pneumonia	Penicillins	no	CVC, CV	No	corticosteroids	25	Dead
36	F	Cystic fibrosis (outpatient)	Cystic fibrosis	Pneumonia	Carbapenems, aminoglycosides, Macrolides	Surgery drainage	CVC	Thoracic surgery	corticosteroids	14	Survived
67	M	Subintensive care unit	Hypertension, neurological disease, EP	Pneumonia	Not available	Tracheostomia, PEG	PICC	no	no	120	Survived after 7 days
75	M	Subintensive care unit	COPD, cardiovascular disease, neurological disease,	Pneumonia	Ceftlozono/tazobactam, Fluoroquinolones, cephalosporins, doxiciclina	no	CVC, CV	NO	corticosteroids	35	Dead at 30 days
41	F	Cystic fibrosis (outpatient)	Cystic fibrosis, Diabetes mellitus		Penicillins, Cephalosporins, aminoglycosides	no	no	no	no	14	Survived

TABELLA 4

Abbreviations: AKF: acute kidney failure; COPD, Chronic obstructive pulmonary disease.

^a During the 12 months preceding positive culture.

^b During the 72 hours preceding BSI onset.

^c During the 3 months preceding BSI onset.

^d During the 30 days preceding BSI onset.

La monoterapia con C/T, nella nostra casistica, è risultata correlata con un maggior successo terapeutico (p 0.011). Tale dato potrebbe essere influenzato da vari fattori confondenti, tra i quali il campione limitato di pazienti, la natura retrospettiva dello studio, la nostra scelta di considerare come monoterapia le terapie che non comprendessero farmaci solitamente attivi contro batteri gram negativi multiresistenti.

4.2 RISULTATI MICROBIOLOGICI

SCREENING MICROBIOLOGICO

Nel periodo Ottobre 2018 – Marzo 2019 sono stati recuperati un totale di 317 ceppi di *P. aeruginosa*. La determinazione della MIC ha rilevato che 302 ceppi su 317 erano sensibili al ceftolozano/tazobactam; la MIC₅₀ era di 0,5 mg/l mentre la MIC₉₀ era di 2 mg/L. 15 ceppi (4.73%) sono risultati resistenti alla combinazione, con MIC comprese tra 8 e >256 mg/L. I dati ottenuti sono riassunti in tabella 5.

TABELLA 5 Risultati della determinazione delle MICs al ceftolozano/tazobactam

MIC ceftolozano/tazobactam (mg/L)	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	≥8
Numero ceppi	3	13	60	136	50	24	16	15

CARATTERIZZAZIONE DEI CEPPI RESISTENTI

I 15 ceppi resistenti sono stati fenotipicamente caratterizzati e i dati ottenuti sono riportati in tabella 6. Tutti gli isolati mostravano piena resistenza al C/T ed erano risultati positivi al test di produzione di *ampC*. La determinazione delle MICs agli antibiotici ha rivelato che tutti gli isolati erano anche resistenti ai carbapenemi, in particolare al meropenem (MIC >8 mg/L). 8 ceppi su 15 mostravano sensibilità agli aminoglicosidi, mentre solamente 2 su 15 erano sensibili alla ciprofloxacina. L'antibiotico più efficace si è dimostrato essere la colistina, efficace in 14 isolati su 15. Degno di nota è il ceppo PACT-11 che risultava essere un ceppo PDR (Pan-drug resistant) ovvero resistente a tutti gli antibiotici testati. I risultati di SpeI-PFGE (Figura X) hanno dimostrato la presenza di un clone prevalente (pulsotipo B, 8 ceppi su 15), all'interno del quale sono stati individuati 3 pulsotipi strettamente correlati. I rimanenti ceppi risultavano invece non correlati fra loro. Gli esperimenti di PCR hanno evidenziato che i ceppi appartenenti al pulsotipo B possedevano il gene *bla_{VIM}*, mentre altri due ceppi erano positivi al gene *bla_{IMP}*. La PCR non ha individuato la presenza di altri geni codificanti carbapenemasi. Tramite Real-Time è stato possibile

confermare la presenza dei geni *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* e allo stesso tempo individuare il gene *bla_{GES}* in 1 isolato e il gene *bla_{PER}* in 2 ceppi.

TABELLA 6 Caratteristiche dei ceppi di *P. aeruginosa* ceftolozano/tazobactam resistenti.

Ceppo	MIC C/T	MIC MER	Sensibilità	Fenotipo ampC	PFGE	PCR						REAL-TIME
						<i>ampC</i>	<i>blaVIM</i>	<i>blaKPC</i>	<i>blaIMP</i>	<i>blaNDM</i>	<i>blaOXA-48</i>	
PACT-1	>256	64	Col	+	A	+	-	-	+	-	-	<i>bla</i> _{IMP}
PACT-2	128	128	Col	+	B1	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-3	>256	64	Col	+	B2	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-4	128	32	Col Amk	+	C	+	-	-	-	-	-	<i>bla</i> _{GES}
PACT-5	>256	64	Col Cn	+	B3	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-6	>256	64	Col Cn	+	B3	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-7	128	64	Col Cn	+	B3	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-8	32	64	Col Cn	+	B2	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-9	256	64	Col Cn	+	B3	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-10	8	32	Amk Cip Col Cn	+	D	+	-	-	-	-	-	-
PACT-11	32	16	-	+	E	+	-	-	-	-	-	-
PACT-12	>256	32	Col	ND	F	+	-	-	-	-	-	<i>bla</i> _{PER}
PACT-13	64	64	Col Cn	+	B3	+	+	-	-	-	-	<i>bla</i> _{VIM}
PACT-14	>256	16	Cip	+	H	+	-	-	+	-	-	<i>bla</i> _{IMP}
PACT-15	16	16	Col	+	I	+	-	-	-	-	-	<i>bla</i> _{PER}

Abbreviazioni: C/T, ceftolozano/tazobactam; MER, meropenem, Col, colistina; Amk, amikacina; Cn, gentamicina; Cip, ciprofloxacina; ND, non rilevabile.

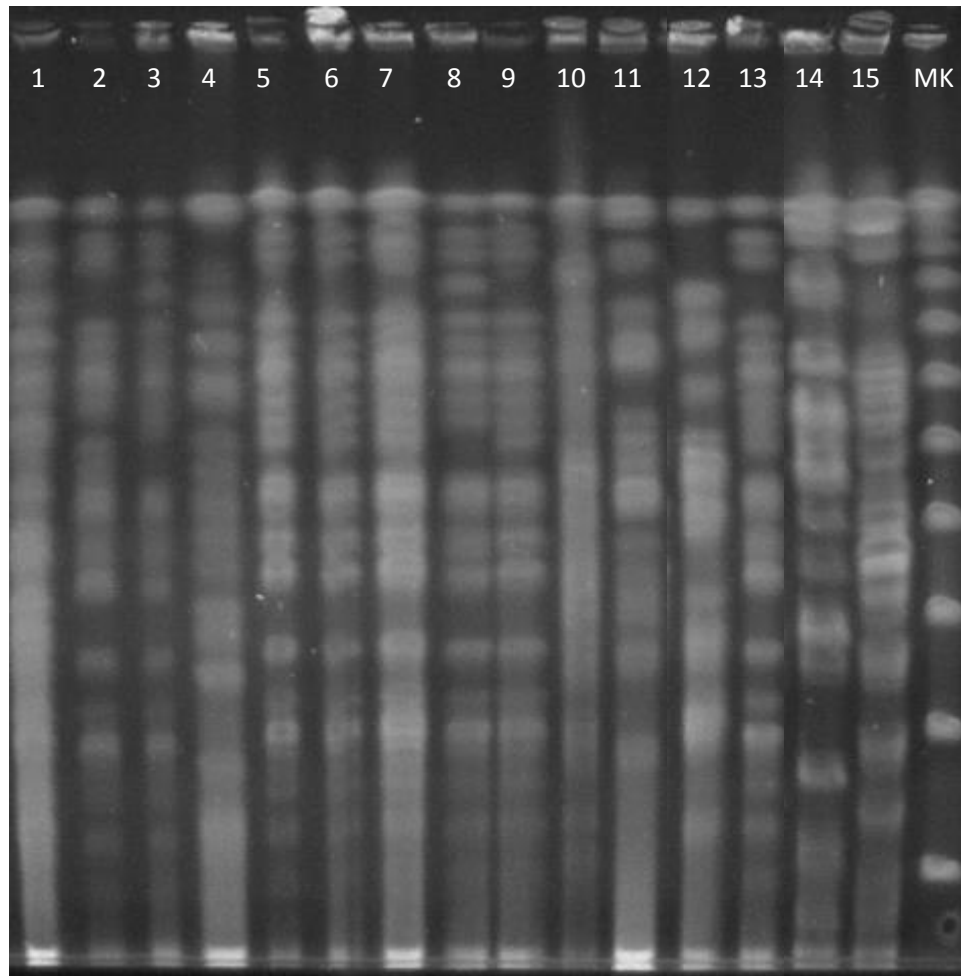


FIGURA 14 Spel-PFGE sui ceppi di *P. aeruginosa* C/T resistenti. I ceppi sono distribuiti da sinistra a destra partendo da PACT-1 fino a PACT-15. L'ultimo pozzetto del gel (MK) rappresenta il marker "high range" (biolabs).

NGS E ANALISI DEL GENOMA

Dopo aver selezionato casualmente un ceppo rappresentativo di ogni pulsotipo, questi sono stati sottoposti a sequenziamento del genoma e successiva analisi. I dati ottenuti sono riassunti in tabella 7. Sono stati riscontrati 6 sequence type (ST) differenti, dei quali 5 appartenenti a ceppi già riscontrati in ambiente ospedaliero (ST70, ST111, ST175, ST235, ST621) ed 1 completamente nuovo (ST3354), assegnato al ceppo PDR. In figura 15 è rappresentato il dendrogramma delle distanze filogenetiche fra gli isolati: come rilevato precedentemente dalla Spel-PFGE, i ceppi che mostravano il pulsotipo B risultano strettamente correlati e appartenenti allo stesso ramo filogenetico. Di questo gruppo fanno parte 8 ceppi su 15, suggerendo l'esistenza di una famiglia di isolati correlati fra loro, resistenti al C/T e responsabili di un piccolo outbreak all'interno dell'ospedale. Per quanto riguarda gli altri isolati, quelli che mostrano lo stesso ST sono inseriti all'interno dello stesso ramo. Interessante notare che il ceppo a cui è stato assegnato il nuovo ST3354 è filogeneticamente vicino al ceppo appartenente al ST70, evidenziando una vicinanza genetica fra questi due isolati.

L'analisi dei meccanismi di resistenza al C/T ha confermato la presenza dei geni di carbapenemasi e beta-lattamasi a spettro esteso identificate tramite PCR e RealTime. Il sequenziamento del genoma ha permesso di individuare la variante allelica di questi geni: i ceppi del pulsotipo B possedevano una *bla*_{VIM-2} inserita in un integrone di tipo I a livello plasmidico. Sono state identificate due varianti del gene *bla*_{IMP}: il ceppo PACT-1 possiede una *bla*_{IMP-19} (oltre ad una beta-lattamasi a spettro esteso *bla*_{PSE-1}) mentre il ceppo PACT-14 mostra una *bla*_{IMP-13}. Tre isolati invece erano produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro che conferiscono resistenza al C/T. I ceppi ST235 (PACT-12 e PACT-15) possedevano un gene *bla*_{PER-1} mentre un isolato ST175 mostrava la ESBL *bla*_{GES-1}.

Tutti i ceppi possedevano una AmpC cromosomica. L'analisi mediante BLAST ha rivelato che 13 ceppi su 15 possedevano mutazioni nella proteina AmpC: la mutazione più diffusa è la T105A, presente in tutti i 13 isolati. I due ceppi appartenenti al ST235 possedevano invece il maggior numero di mutazioni di AmpC. Per quanto riguarda invece il gene regolatore di *ampC*, ovvero *ampR*, 11 ceppi su 15 presentavano una sequenza modificata del gene stesso. La mutazione aminoacidica più diffusa era la G283E. I ceppi con gene *ampR* wild type appartenevano a ST175, ST70 e ST3354. Curiosamente, i ceppi ST175 mostravano sia AmpC che AmpR wild type.

Per quanto riguarda OprD invece, 14 ceppi su 15 possedevano mutazioni a carico di questa proteina. In questo caso le mutazioni non sono di tipo puntiforme ma riguardano piuttosto codoni di stop prematuri che portano alla produzione di proteine troncate. Solo in un ceppo la proteina conserva il numero corretto di aminoacidi, pur presentando diverse mutazioni della sua sequenza (Tab.7)

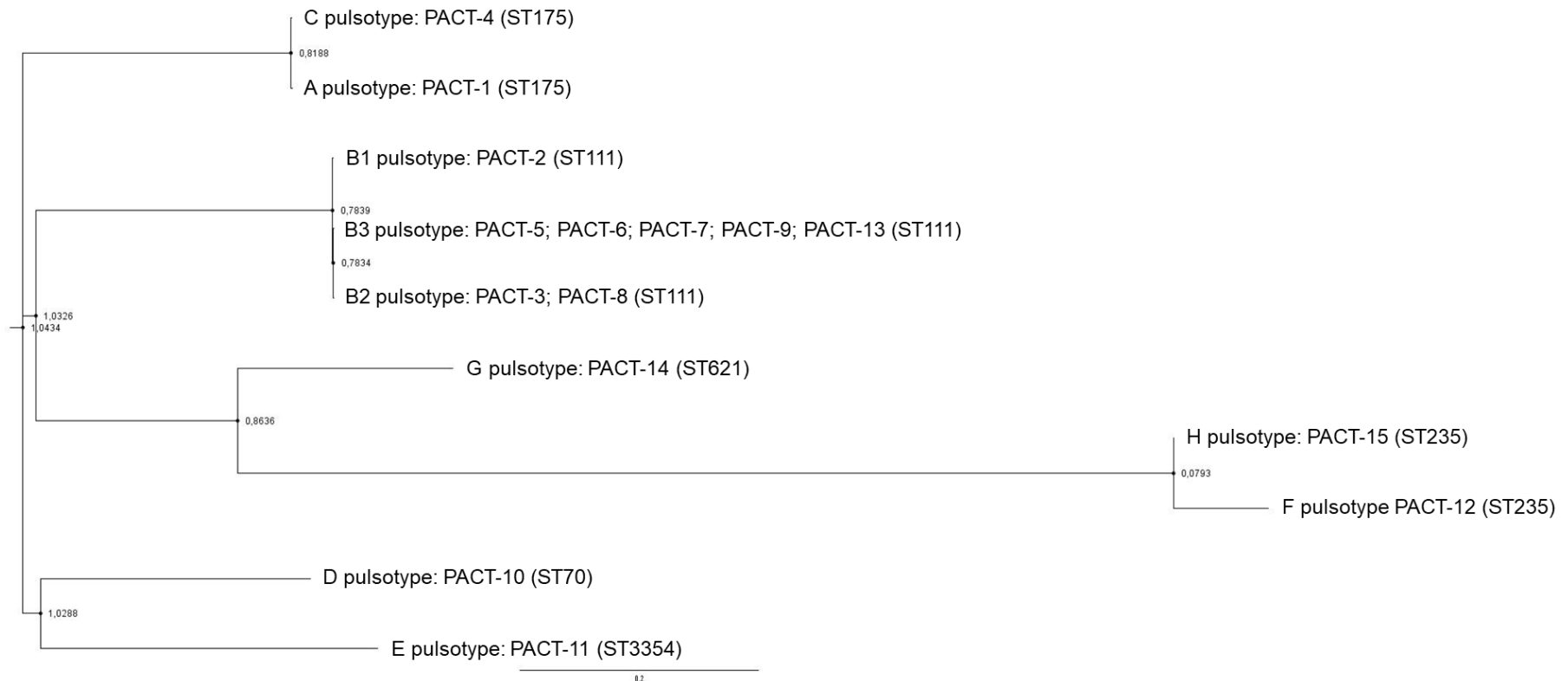


FIGURA 15 Dendrogramma delle distanze filogenetiche tra gli isolati di *P. aeruginosa*. Il genoma di riferimento utilizzato è quello di *P. aeruginosa* PAO1.

TABELLA 7

Ceppo	ST	PFGE	Carbapenemasi	ESBL	OXA	AmpC	AmpR	OprD
PACT-1	ST175	A	IMP-19	PSE-1	OXA-50	WT	WT	472 AA
PACT-2	ST111	B1	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, 3288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295, Δ296	398 AA
PACT-3	ST111	B2	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, 3288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295, Δ296	398 AA
PACT-4	ST175	C	-	GES-1	OXA-50	WT	WT	400 AA
PACT-5	ST111	B3	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, M288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295A, Δ296	397 AA
PACT-6	ST111	B3	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, M288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295A, Δ296	397 AA
PACT-7	ST111	B3	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, M288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295A, Δ296	397 AA
PACT-8	ST111	B2	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, 3288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295, Δ296	398 AA
PACT-9	ST111	B3	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, M288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295A, Δ296	331 AA
PACT-10	ST70	D	-	-	OXA-396	T105A	WT	361 AA
PACT-11	ST3354	E	-	-	OXA-396	T105A, V239A, V355I	WT	344 AA
PACT-12	ST235	F	-	PER-1	OXA-2, OXA-488	G27D, A97V, T105A, V205L, G391A	G283E, M288R	T103S, G106D, K115D, F170L, E185Q, P186G, V189T, R310E, R315G, G425A
PACT-13	ST111	B3	VIM-2	-	OXA-395	T105A	G283E, E287G, M288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295A, Δ296	397 AA
PACT-14	ST621	G	IMP-13	-	OXA-50	T105A	G283E, E287G, M288Q, A290V, V291L, A293S, R294E, G295A, Δ296	WT
PACT-15	ST235	H	-	PER-1	OXA-2, OXA-488	G27D, A97V, T105A, V205L, G391A	G283E, M288R	276 AA

5. DISCUSSIONE

Negli ultimi anni si è assistito ad un crescente emergere di resistenza agli antibiotici tra i comuni germi patogeni, soprattutto nell'ambito ospedaliero. Questo fenomeno è legato a molteplici fattori: da una parte, l'uso inappropriato degli antibiotici sia in ambito clinico che agricolo ed industriale, dall'altra dalla capacità dei microrganismi di acquisire sempre nuove resistenze grazie a meccanismi intrinseci e contributi genetici esterni.

In questo scenario, dominato da una sempre più ristretta gamma di antibiotici efficaci, l'avvento di nuovi farmaci diventa di estrema importanza per il raggiungimento del target terapeutico.

C/T si è dimostrato un farmaco di comprovata efficacia nei confronti di infezioni urinarie ed addominali complicate e nelle polmoniti associate a ventilatore, sostenute da germi gram negativi multiresistenti.

Il suo uso clinico, però, potrebbe venire intaccato dall'emergere di ceppi batterici già intrinsecamente resistenti.

In quest'ottica abbiamo voluto condurre uno studio retrospettivo monocentrico, che valutasse sia l'efficacia clinica di C/T all'interno di un'eterogenea popolazione di pazienti ospedalizzati sia le caratteristiche di resistenza di germi che, all'interno di questo stesso ospedale, circolano e proliferano.

Da Novembre 2016 ad Aprile 2019 abbiamo raccolto tutte le prescrizioni di C/T effettuate all'interno degli Ospedali Riuniti di Ancona. La maggior parte di queste sono state effettuate per infezioni intraddominali complicate, seguite da infezioni urinarie complicate. L'uso off-label, a dosaggio aumentato, per le polmoniti, in quanto AIFA non ha ancora approvato questo utilizzo, è in linea con i numerosi studi che dimostrano l'efficacia di C/T in questi pazienti, anche nei confronti di ceppi MDR. (Nunez)

Il ricovero in ambiente intensivistico si è confermato fattore prognostico negativo, anche se non ha raggiunto la significatività statistica; inaspettatamente, invece, la permanenza in ambiente chirurgico è risultato fattore protettivo. Si può spiegare questo dato con l'abitudine, da parte dei chirurghi, di riferirsi tempestivamente all'infettivologo per le terapie antibiotiche sia empiriche che mirate in corso di infezioni, riducendo l'esposizione del paziente a terapie inefficaci.

Nel nostro studio è stata registrata una bassa mortalità, confermandosi l'elevata efficacia di C/T. Quando abbiamo valutato il fallimento terapeutico, questo si è verificato nel 26% dei casi, riconoscendo nelle cause un CCT>3, il precedente uso di corticosteroidi, la polmonite nosocomiale e l'infezione da *P.aeruginosa*. Inoltre, quest'ultimo si è rivelato il germe più frequentemente isolato.

Sulla base di queste conclusioni, abbiamo deciso di studiare più approfonditamente le caratteristiche fenotipiche e genotipiche di questo batterio, effettuando una sorveglianza attiva, da

Ottobre 2018 ad Aprile 2019, sui ceppi di *P.aeruginosa* identificati nel laboratorio di Microbiologia del nostro ospedale.

Dalle analisi effettuate risulta che i ceppi presentano diversi meccanismi di resistenza agli antibiotici; il più importante dei quali è OprD in quanto coinvolge numerose molecole antibiotiche trasversalmente, come anche dimostrato dal recente studio di Feng et al⁴⁹ (cit).

Nei nostri ceppi si dimostra che questa proteina risulta troncata e, quindi, probabilmente inattiva per il trasporto interno di sostanze.

Per quanto riguarda l'efficacia degli antibiotici, colistina si conferma il farmaco con la MIC più bassa e con il tasso di resistenza minore: questo fenomeno si può spiegare sia per il ridotto utilizzo degli ultimi anni di questo antibiotico sia perché sviluppare meccanismi di resistenza non gioverebbe a *P.aeruginosa* in termini di stabilità di membrana.

Un ceppo (PACT 11) è risultato *pan-drug-resistant* senza un chiaro meccanismo di resistenza a C/T, che andrà indagato in futuro. Un'ulteriore particolarità di questo ceppo è l'assegnazione di un nuovo *sequence type* (ST3354), individuato per la prima volta nel nostro ospedale.

Dal punto di vista filogenetico, abbiamo evidenziato un cluster di 8 ceppi strettamente correlati, appartenenti al ST111, clone ad alto rischio, responsabile di epidemie nosocomiali⁵⁰. Questo suggerisce la presenza di un'endemia all'interno dell'ospedale, sostenuto da *P.aeruginosa*.

Inoltre, questo ceppo esprime il gene *bla_{VIM}*: tale metallo-β lattamasi potrebbe, in futuro, essere trasmessa ad altri batteri gram negativi che circolano all'interno dell'ospedale.

Nonostante quanto evidenziato, dobbiamo riconoscere che questo studio è limitato dall'esiguo numero di pazienti arruolati, dalla retrospettività e dall'essere monocentrico, ma può essere considerato un approccio iniziale per ulteriori futuri studi prospettici, che coinvolgano altri centri ospedalieri della Regione, per meglio definire sia l'efficacia terapeutica di C/T che l'epidemiologia di *P.aeruginosa*.

BIBLIOGRAFIA

1. Magiorakos AP et al Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268-81. Epub 2011 Jul 27.
2. European Center for Disease Prevention and Control . The bacterial challenge: time to react. 2009. European Centers for Disease Control and Prevention . Antimicrobial resistance: trackling the burden in the European Union. 2019
3. Livermore DM Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infection Dis* 2002, 34 (5), 634-40
4. Passos da Silva D The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix 2019 May 16;10(1):2183.
5. Sanders, C. C., and W. E. Sanders. 1986. Type I beta-lactamases of gram-negative bacteria: interactions with beta-lactam antibiotics. *J. Infect. Dis.* **154**:792–800.
6. Colom, K., A. Fdz-Aranguiz, E. Suinaga, and R. Cisterna. 1995. Emergence of resistance to beta-lactam agents in *Pseudomonas aeruginosa* with group 1 beta-lactamases in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:964–971.
7. Labia, R., A. Morand, and J. Peduzzi. 1986. Timentin and beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 17(Suppl. C):17–26.
8. Lindberg, F., S. Lindquist, and S. Normark. 1988. Genetic basis of induction and overproduction of chromosomal class I beta-lactamase in nonfastidious gram-negative bacilli. *Rev. Infect. Dis.* 10:782–785.
9. Lister, P. D., V. M. Gardner, and C. C. Sanders. 1999. Clavulanate induces expression of the *Pseudomonas aeruginosa* AmpC cephalosporinase at physiologically relevant concentrations and antagonizes the antibacterial activity of ticarcillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:882–889.
10. Stobberingh, E. E. 1988. Induction of chromosomal beta-lactamase by different concentrations of clavulanic acid in combination with ticarcillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:9–16.
11. Weber, D. A., and C. C. Sanders. 1990. Diverse potential of beta-lactamase inhibitors to induce class I enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:156–158
12. Honore, N., M. H. Nicolas, and S. T. Cole. 1989. Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. *Mol. Microbiol.* 3:1121–1130.
13. Juan, C., M. D. Macia, O. Gutierrez, C. Vidal, J. L. Perez, and A. Oliver. 2005. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4733–4738
14. Kopp, U., B. Wiedemann, S. Linquist, and S. Normark. 1993. Sequences of wild-type and mutant ampD genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:224–228.
15. Kuga, A., R. Okamoto, and M. Inoue. 2000. ampR gene mutations that greatly increase class C beta-lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:561–567.
16. Langae, T. Y., M. Dargis, and A. Huletsky. 1998. An ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* encodes a negative regulator of AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:3296–3300.
17. Lindberg, F., L. Westman, and S. Normark. 1985. Regulatory components in *Citrobacter freundii* ampC beta-lactamase induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:4620–4624.
18. Bagge, N., O. Ciofu, M. Hentzer, J. I. Cambell, M. Givskov, and N. Hoiby. 2002. Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in ampD. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:3406–3411

19. Honore, N., M. H. Nicolas, and S. T. Cole. 1989. Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. *Mol. Microbiol.* 3:1121–1130.
20. Langaee, T. Y., L. Gagnon, and A. Huletsky. 2000. Inactivation of the ampD gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:583–589.
21. Poirel L, Naas T, Nordmann P (2010) Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob agents chemother* 54(1):24-38
22. Potron A, Poirel L, Nordmann P (2015) Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob agents* 45(6):568-585
23. Lopez C et al. Protein determinants of dissemination and host specificity of metallo- β -lactamases. *Nat Commun.* 2019 Aug 9;10(1):3617. doi: 10.1038/s41467-019-11615-w.
24. González, L. J. et al. Membrane anchoring stabilizes and favors secretion of New Delhi metallo- β -lactamase. *Nat. Chem. Biol.* 12, 516–522 (2016).
25. King, D. & Strynadka, N. Crystal structure of New Delhi metallo- β -lactamase reveals molecular basis for antibiotic resistance. *Protein Sci.* 20, 1484–1491 (2011).
26. Rumbo, C. et al. Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3084–3090 (2011).
27. D.Van Duin 2017 *Virulence* vol 8, n 4, 460-469 The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*
28. Hancock REW 2002 Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu.Rev.Microbiol.*56:17-38
29. **Nikaido, H.** 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1831–1836.
30. Yoshimura, F., and H. Nikaido. 1985. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27:84–92.
31. Saier, M. H., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray, and H. Nikaido. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J.* 12:265–274.
32. Van Bambeke, R., E. Balzi, and P. M. Tulkens. 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60:457–470.
33. Poole, K., and R. Srikumar. 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms, and clinical significance. *Curr. Top. Med.Chem.* 1:59–71.
34. Shortridge D, Pfaller MA, Streit JM, Flamm RK, Antimicrobial Activity of Ceftolozane-Tazobactam Tested against Contemporary (2015-2017) *P. aeruginosa* Isolates from a Global Surveillance Program, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*(2019)
35. V.D. Rosenthal International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 45 countries for 2012-2017: Device-associated module American Journal of Infection control American Journal of Infection control Epub October 2019
36. Perez A. High incidence of MDR and XDR *Pseudomonas aeruginosa* isolate obtained from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial *Journal of antimicrobial chemotherapy* Jan 2019
37. Farrell DJ, Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Ceftolozane/tazobactam activity tested against Gram-negative bacterial isolates from hospitalised patients with pneumonia in US and European medical centres (2012). *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(6):533–539.
38. Miller B, Hershberger E, Benziger D, Trinh M, Friedland I. Pharmacokinetics and safety of intravenous ceftolozane-tazobactam in healthy adult subjects following single and multiple ascending doses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56 (6):3086–3091.
39. Craig WA, Andes DR. In vivo activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*, including strains with extended-spectrum beta-lactamases, in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(4):1577–1582.

40. Lepak AJ, Reda A, Marchillo K, Van HJ, Craig WA, Andes D. Impact of MIC range for *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus pneumoniae* on the ceftolozane in vivo pharmacokinetic/pharmacodynamic target. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58-(10):6311–63148
41. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jun;56(6):3086-91. doi: 10.1128/AAC.06349-11. Epub 2012 Mar 26. Pharmacokinetics and safety of intravenous ceftolozane-tazobactam in healthy adult subjects following single and multiple ascending doses. Miller B1, Hershberger E, Benziger D, Trinh M, Friedland I.
42. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jun;57(6):2809-14. doi: 10.1128/AAC.02513-12. Epub 2013 Apr 29. Pharmacokinetics-pharmacodynamics of tazobactam in combination with ceftolozane in an in vitro infection model. VanScoy B1, Mendes RE, Nicasio AM, Castanheira M, Bulik CC, Okusanya OO, Bhavnani SM, Forrest A, Jones RN, Friedrich LV, Steenbergen JN, Ambrose PG.
43. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(4):2249-55. doi: 10.1128/AAC.02151-13. Epub 2014 Feb 3. Impact of renal function on the pharmacokinetics and safety of ceftolozane-tazobactam. Wooley M1, Miller B, Krishna G, Hershberger E, Chandorkar G.
44. Wagenlehner FM Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: a randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI) *The Lancet* May 2015, vol 385, issue 9981, pp1949-1956
45. Solomkin J 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-c IAI) *Clin Inf Dis* 2015 May, 60 (10):1462-71
46. Chandorkar G, Huntington JA, Gotfried MH, Rodvold KA, Umeh O. Intrapulmonary penetration of ceftolozane/tazobactam and piperacillin/tazobactam in healthy adult subjects. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(10):2463–2469.
47. Kollef MH Ceftolozane/tazobactam vs meropenem for treatment of nosocomial pneumonia (ASPECT-NP): a randomised, controlled, double-blind, phase 3, non inferiority trial, *The Lancet* Sept 2019
48. Rodríguez-Núñez Higher MIC (>2 mg/L) predict 30-day mortality in patients with lower respiratory tract infections caused by multidrug and extensively drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* treated with ceftolozane/tazobactam *Open Forum Infect Dis.* 2019 Sep 28;6(10):ofz416
49. Feng W, Huang Q, Wang Y, Yuan Q, Li X, Xia P, Sun F. Changes in the resistance and epidemiological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* during a ten-year period. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019 Sep 30. pii: S1684-1182(19)30153-7
50. Mulet X et al Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones antimicrob agents *Chemo* Nov 2013 57, (11) 5527-35