



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**Dottorato di Ricerca in  
Malattie Infettive, Microbiologia e Sanità Pubblica**

Tesi sperimentale

**“Analisi *in vivo* e *in vitro* dell’attività del doppio  
carbapenemico nelle infezioni da *Klebsiella pneumoniae*  
produttrice di carbapenemasi”**

Relatore:  
Chiar.mo Prof.  
Claudio M Mastroianni

Dottoranda:  
Francesca Gizzi  
Matr: 944706

**Anno Accademico 2017-2018**

## INDICE

<b>Introduzione</b> .....	3
La <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	3
Manifestazioni cliniche associate a <i>K. pneumoniae</i> .....	3
Epidemiologia .....	4
Meccanismi di resistenza .....	6
Classificazione delle betalattamasi .....	8
Antibioticoterapia nelle infezioni da <i>K. pneumoniae</i> .....	10
<b>Scopo della ricerca</b> .....	16
<b>L'attività sinergica e battericida del doppio carbapenemico per le infezioni causate da <i>K. pneumoniae</i> produttrice di carbapenemasi.....</b>	<b>17</b>
<b>Materiali e metodi</b> .....	<b>17</b>
Popolazione studiata .....	17
Definizioni .....	18
Sensibilità agli antibiotici e test di sinergia .....	18
Analisi statistica .....	20
<b>Risultati</b> .....	<b>21</b>
Popolazione studiata .....	21
Sensibilità agli antibiotici e test di sinergia .....	25

Curve di killing .....	28
<b>Discussione .....</b>	<b>40</b>
<b>La terapia con doppio carbapenemico, da sola o associata alla colistina, nel trattamento delle infezioni da <i>K. pneumoniae</i> resistente ai carbapenemi .....</b>	<b>51</b>
<b>Case report: infezione batteriemia severa causata da <i>Escherichia coli</i> produttrice di KPC in paziente sottoposta a trapianto renale trattata con il doppio carbapenemico e test di sinergia <i>in vitro</i> .....</b>	<b>59</b>
Introduzione .....	59
Case report .....	60
Discussione .....	65
<b>Conclusioni .....</b>	<b>68</b>
<b>Bibliografia .....</b>	<b>69</b>

## INTRODUZIONE

### **La *Klebsiella pneumoniae***

Il genere *Klebsiella*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, comprende diverse specie, fra le quali la più importante è la *K. pneumoniae*, agente eziologico di diversi tipi di infezioni. La *Klebsiella* è un bacillo Gram negativo, asporigeno, aerobio facoltativo, immobile e dotato di fimbrie, fermentante e provvisto di una spessa capsula polisaccaridica con potere antifagocitario. Si sviluppa facilmente nei comuni terreni di coltura dopo incubazione di 18-24 ore. E' un batterio ampiamente diffuso nell'ambiente, normalmente presente nella mucosa respiratoria e intestinale dell'uomo.

### **Manifestazioni cliniche associate a *K. pneumoniae***

La *K. pneumoniae* è in grado di causare diversi tipi di infezioni nell'uomo: infezioni delle vie urinarie e delle vie biliari, polmoniti, infezioni delle ferite, celluliti, osteomieliti, infezioni di devices vascolari e di altri tipi di devices, meningiti neonatali o associate a interventi neurochirurgici.

Il tratto urinario è la sede più comune di infezione da *K. pneumoniae*; tale batterio è secondo solo a *E. coli* come causa di batteriemia originata dalle vie urinarie e quale agente eziologico di batteriemia da Gram negativi.

La polmonite da *K. pneumoniae* ha delle particolari caratteristiche ed era chiamata malattia di Friedlander: tra le sue peculiarità ci sono la particolare gravità, la

correlazione con alcolismo, diabete mellito, malattie polmonari croniche, immunodepressione e ventilazione assistita, la preferenza per i lobi polmonari superiori, la produzione di espettorato a “gelatina di ribes”, la tendenza a causare ascessi polmonari.

Le infezioni più problematiche e gravate dalla maggiore mortalità tra quelle causate da *K. pneumoniae* sono le infezioni nosocomiali, che talora divengono vere e proprie epidemie, spesso da parte di ceppi antibiotico-resistenti. Sono soprattutto i reparti di terapia intensiva e chirurgia d’urgenza quelli colpiti da tali infezioni.

## **Epidemiologia**

Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento delle *Enterobacteriaceae* che producono carbapenemasi (CPE) in tutto il mondo, in particolare in alcuni paesi, quali Stati Uniti d’America, Israele, Portorico e Colombia (soprattutto enzimi del tipo KPC), Grecia (KPC e VIM), India (NDM).

La diffusione delle carbapenemasi tra ceppi e specie batteriche diverse è dovuta alla disseminazione di elementi genetici mobili, come trasposoni e plasmidi, che trasportano i geni che codificano per questi enzimi. La diffusione di CPE può avvenire tramite il contatto sia tra pazienti che tra operatori sanitari, sia nella stessa struttura assistenziale che in strutture o addirittura paesi diversi fino alla trasmissione transcontinentale.

In Europa i dati sull’andamento dell’antibiotico resistenza sono riportati dalla European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (Figura 1). Negli ultimi anni in Italia si

è osservato un trend in drammatico aumento dei ceppi di *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi (CR-Kp): mentre nel 2009 solo l'1.3% dei ceppi isolati dal sangue era resistente, questa percentuale è salita al 33.9% nel 2016.

I fattori di rischio per le infezioni da CPE sono: eventuali comorbidità (tumori, insufficienza renale o epatica, diabete mellito, patologie cardio-vascolari e respiratorie, ecc), ricoveri ospedalieri in particolare in reparti di terapia intensiva, posizionamento di devices (protesi di vario genere, devices vascolari, catetere vescicale, sondino nasogastrico), recenti interventi chirurgici o manovre invasive (endoscopia, broncolavaggio, ventilazione assistita, nutrizione parenterale, ecc), recente somministrazione di antibiotici (cefalosporine, penicilline protette, carbapenemi, fluorochinoloni, colistina).

Nel 2011 l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) ha pubblicato un documento per la valutazione del rischio di trasmissione di CPE, contenente anche indicazioni sulle misure efficaci per contenerla. Le misure di controllo suggerite da molte linee guida internazionali comprendono: l'identificazione tempestiva dei pazienti infetti, la sorveglianza dei pazienti colonizzati attraverso lo screening con tampone rettale, l'isolamento di tutti i soggetti infetti o colonizzati e l'adozione da parte del personale sanitario delle precauzioni da contatto nella gestione di questi pazienti.

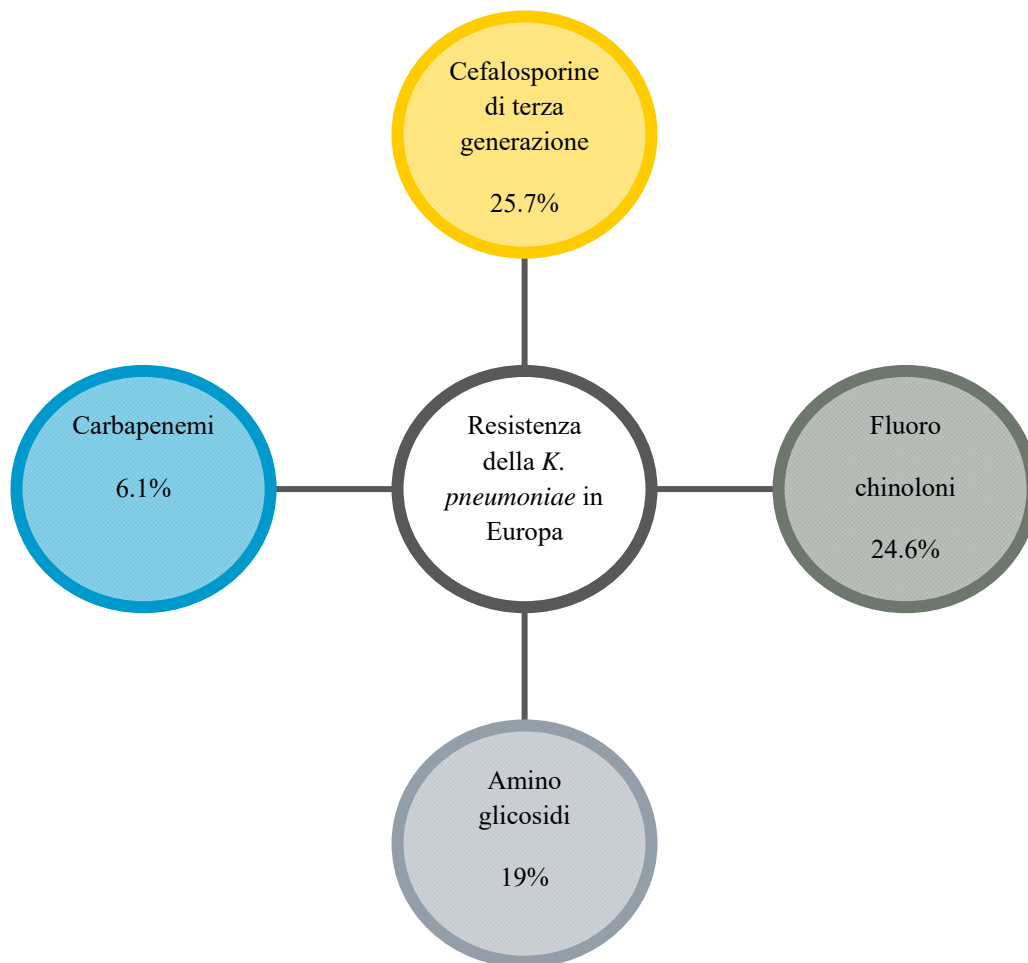


Figura 1. Percentuali di resistenza media agli antibiotici della *K. pneumoniae* in Europa (ECDC, 2016).

## Meccanismi di resistenza

La resistenza batterica agli antibiotici può essere distinta in naturale e acquisita. La resistenza naturale consiste nella resistenza costituzionale di un microrganismo verso un determinato antibiotico dovuta al meccanismo d'azione del farmaco o alla particolare struttura della cellula batterica. Questo tipo di resistenza è immutabile e geneticamente

determinato ed è presente in tutti i batteri della stessa specie. La resistenza acquisita è invece associata all'uso degli antibiotici e può essere cromosomica o extracromosomica. La prima è geneticamente trasmissibile e si manifesta per l'insorgenza di mutazioni spontanee o indotte dalla pressione selettiva causata dall'antibiotico. La resistenza extracromosomica costituisce il 90% di tutte le resistenze; si origina per acquisizione di nuovo materiale genetico da altri microrganismi che penetra nella cellula mediante coniugazione, trasformazione e traduzione. Spesso riguarda più antibiotici contemporaneamente determinando l'insorgenza di germi multiresistenti ai farmaci. Questo tipo di resistenza è a trasmissione orizzontale e può avvenire anche tra specie batteriche diverse; è dovuta a geni presenti su plasmidi e trasposoni.

La principale causa dell'aumento della resistenza batterica agli antibiotici è rappresentata dalla pressione selettiva esercitata dall'uso dei farmaci che negli ultimi anni è considerevolmente aumentata, includendo in gran parte antibiotici a largo spettro. I batteri Gram negativi possiedono una membrana esterna e una membrana interna o citoplasmatica: tra le due si estende lo spazio periplasmico, dove si trova la parete cellulare che viene modellata dalle "proteine leganti la penicillina" (PBP). Le PBP sono il bersaglio degli antibiotici betalattamici, che inibiscono tali proteine: per agire questi antibiotici non hanno bisogno di penetrare nella membrana citoplasmatica ma solo nello spazio periplasmico. Molti farmaci per agire devono entrare nella membrana esterna tramite proteine canale chiamate porine; in condizioni appropriate alcuni batteri possono ridurre l'espressione di queste porine. Esistono poi nella cellula batterica delle pompe di



efflusso che espellono sostanze tossiche (tra cui anche antibiotici), la cui espressione può invece essere aumentata in determinate condizioni.

La *K. pneumoniae* ha differenti meccanismi di resistenza nei confronti delle diverse classi di antibiotici:

- per i betalattamici la produzione di betalattamasi e la riduzione delle porine;
- per i fluorochinoloni l'alterazione o la protezione del target (DNA girasi) e l'aumento delle pompe di efflusso;
- per gli aminoglicosidi l'inibizione enzimatica e l'alterazione del target (metilazione ribosomiale).

## **Classificazione delle betalattamasi**

Il meccanismo d'azione degli antibiotici betalattamici si basa sull'inibizione della sintesi del peptidoglicano della parete batterica, interferendo nella formazione dei legami peptidici tra le molecole del peptidoglicano che conferisce alla parete rigidità e resistenza alla lisi osmotica. Le betalattamine penetrano all'interno della cellula batterica grazie all'affinità con le PBP. Le betalattamasi prodotte dal batterio si trovano nello spazio periplasmico: qui gli antibiotici devono resistere alle betalattamasi costitutive dei Gram negativi per poter esplicare la loro azione antibatterica.

Le betalattamasi si possono distinguere attraverso due classificazioni:

- la classificazione funzionale di Bush, Jacoby e Medeiros, che raggruppa le betalattamasi in 4 gruppi (numerati da 1 a 4) e in diversi sottogruppi (indicati

con lettere) basandosi sull'attività degli enzimi verso diversi substrati e sulla loro sensibilità agli inibitori (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam);

- la classificazione molecolare di Ambler, che divide le betalattamasi in 4 classi (A-D) basandosi sulla loro struttura primaria. Le classi A, C e D contengono una serina nel sito attivo, mentre gli enzimi della classe B esplicano la loro azione in presenza di un atomo di zinco.

Le betalattamasi possono inoltre essere suddivise in base all'antibiotico betalattamico che inattivano: penicillinasi, cefalosporinasi (tra cui le ESBL), carbapenemasi.

### ESBL

Le betalattamasi a spettro esteso (ESBL) conferiscono resistenza a penicilline, cefalosporine di II e III generazione, aztreonam. I ceppi produttori di ESBL restano sensibili a cefamicine e carbapenemi. I geni delle ESBL sono spesso situati su plasmidi che ospitano geni che codificano per la resistenza ad altre classi di antibiotici, quali fluorochinoloni e aminoglicosidi. Le ESBL più diffuse sono TEM, SHV, CTX-M e AmpC (che ha lo spettro più esteso).

### Carbapenemasi

Le carbapenemasi conferiscono spesso resistenza a tutti i betalattamici. Le carbapenemasi più importanti prodotte dalle *Enterobacteriaceae* sono quelle della

classe A del tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) e della classe B metallo beta-lattamasi zinco-dipendenti, rappresentate in particolare da VIM, IMP, NDM.

I geni codificanti per le carbapenemasi KPC sono tutti trasmessi attraverso plasmidi. I ceppi batterici produttori di KPC sono molto spesso resistenti anche ad altre classi di antibiotici, divenendo così multiresistenti (MDR) o panresistenti (MDRx).

In Italia i primi casi di batteri produttori di KPC sono stati osservati nel 2009 ma la velocità di diffusione di questi ceppi è stata preoccupante.

### **Antibioticoterapia nelle infezioni da *K. pneumoniae***

In linea generale l'identificazione del germe responsabile di infezione in un paziente garantisce la prescrizione della migliore terapia antibiotica possibile. Spesso nella clinica è necessario però impostare terapie antibiotiche empiriche soprattutto nei pazienti le cui condizioni cliniche risultano gravi. D'altra parte l'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro favorisce l'insorgenza di ceppi batterici multiresistenti ai farmaci.

Nelle infezioni da CR-Kp è strettamente necessario impostare il prima possibile una corretta antibioticoterapia; spesso questi batteri risultano inoltre resistenti anche ad altre classi di antibiotici oltre che ai carbapenemi. In queste infezioni risulta essenziale una terapia di combinazione: numerosi studi hanno dimostrato come regimi terapeutici di più antibiotici riducano la mortalità. Opzioni terapeutiche per la CR-Kp includono colistina, gentamicina e tigeciclina, anche se la resistenza a tali molecole risulta in aumento: in Italia oltre il 50% dei ceppi di CR-Kp risulta anche resistente alla colistina.

Inoltre l'elevata tossicità della tigeciclina e ancor di più della gentamicina e della colistina ha spinto alla ricerca di nuove associazioni terapeutiche.

Gli antibiotici più frequentemente utilizzati nelle terapie di combinazione per la CR-Kp sono i seguenti:

- meropenem, ertapenem e doripenem. Sono carbapenemi (betalattamici) che agiscono nella terza fase della sintesi del peptidoglicano della parete cellulare batterica;
- colistina. E' un antibiotico polipeptidico naturale appartenente alla famiglia delle polimixine. Il suo spettro d'azione è limitato ai batteri Gram negativi aerobi. Tale farmaco si fissa alla membrana esterna del batterio, alterandone la permeabilità e causandone così la distruzione. La colistina è un farmaco battericida, concentrazione-dipendente e con scarso effetto post-antibiotico;
- tigeciclina. Agisce in sede ribosomiale interferendo con la sintesi proteica. E' un farmaco batteriostatico con persistente effetto nel tempo;
- rifampicina. E' un farmaco battericida che appartiene alla famiglia delle rifamicine; agisce bloccando l'enzima RNA-polimerasi DNA-dipendente impedendo così la sintesi proteica;
- gentamicina. Appartiene alla famiglia degli aminoglicosidi e blocca la sintesi proteica legandosi alla subunità 30s dei ribosomi. La gentamicina esplica azione battericida dose-dipendente.

Le associazioni antibiotiche utilizzate nei confronti di CR-Kp possono includere due o tre dei suddetti farmaci.

Recentemente, oltre alla terapia con doppio carbapenemico, sono state proposte altre terapie di combinazione contenenti nuovi farmaci:

- ceftazidime-avibactam. Consiste di una cefalosporina di III generazione e di un inibitore sintetico della beta-lattamasi che *in vitro* risulta efficace contro germi produttori di ESBL e KPC. Il suo utilizzo è stato approvato nel 2015 dalla Food and Drug Administration (FDA) e nel 2016 dalla European Medicines Agency (EMA) per il trattamento di infezioni urinarie e intra-addominali complicate, polmoniti nosocomiali e, in generale, infezioni da Gram negativi in adulti con limitate opzioni terapeutiche.
- meropenem-vaborbactam. Il vaborbactam è un altro nuovo inibitore della beta-lattamasi che ripristina l'attività del meropenem contro i batteri produttori di KPC. E' stato recentemente approvato dall'FDA per il trattamento di infezioni complicate delle vie urinarie.
- relebactam. E' un inibitore della beta-lattamasi che si associa a imipenem/cilastatina. Gli studi *in vitro* indicano che la sua attività è simile a ceftazidime-avibactam. Si attendono gli studi clinici.
- plazomicina. E' un nuovo aminoglicoside in fase di sviluppo clinico. Esso sfugge all'attività degli enzimi che modificano gli aminoglicosidi e quindi è attivo contro un numero maggiore di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi rispetto a gentamicina e amikacina.

- eravaciclina. E' un nuovo fluorochinolone; *in vitro* risulta attivo contro batteri Gram positivi e Gram negativi MDR, incluse le *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi.
- cefiderocol. E' una nuova cefalosporina che sarebbe attiva contro i germi produttori di KPC e NDM.
- aztreonam-avibactam. E' una combinazione interessante a causa della capacità dell'avibactam di inibire gli enzimi KPC, ESBL, AmpC e OXA-48.

#### Ruolo del doppio carbapenemico

I primi studi sull'utilità dell'associazione tra due carbapenemi nel trattamento delle infezioni da CR-Kp sono piuttosto recenti. Il razionale delle associazioni meropenem + ertapenem e doripenem + ertapenem risiede nel fatto che l'ertapenem si comporta da inibitore "suicida" e satura gli enzimi che inattivano i carbapenemi, dando quindi la possibilità al meropenem o al doripenem di esplicare l'azione battericida.

In uno studio sulla farmacocinetica e sulla farmacodinamica del meropenem *in-vitro*, si evidenzia che tale farmaco trova applicazione nel trattamento della CR-Kp, in particolare se somministrato in infusione lenta e ad elevati dosaggi, soprattutto se la MIC non risulta particolarmente elevata (Figure 2 e 3).

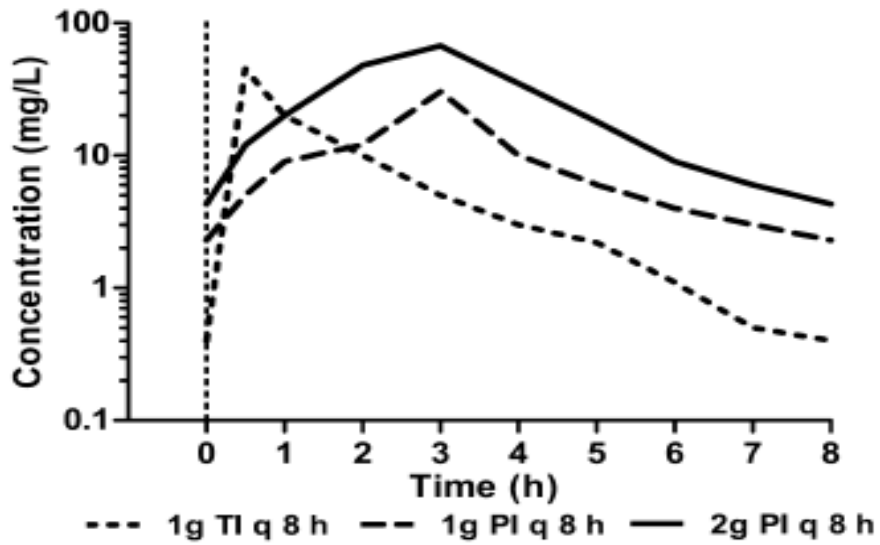


Figura 2. Profili simulati di concentrazione di meropenem somministrato con 3 differenti regimi di dosaggio. TI: infusione tradizionale in 30 minuti. PI: infusione prolungata in 3 ore. *GL Daikos et al 2011.*

Dalla figura 2 emerge che l'infusione prolungata del meropenem in 3 ore permette di mantenere concentrazioni del farmaco stabilmente elevate nel tempo rispetto alla tradizionale infusione in 30 minuti. Inoltre somministrando 2 g di meropenem ogni 8 ore invece della terapia tradizionale di 1 g ogni 8 ore, si ottengono concentrazioni più elevate del farmaco.

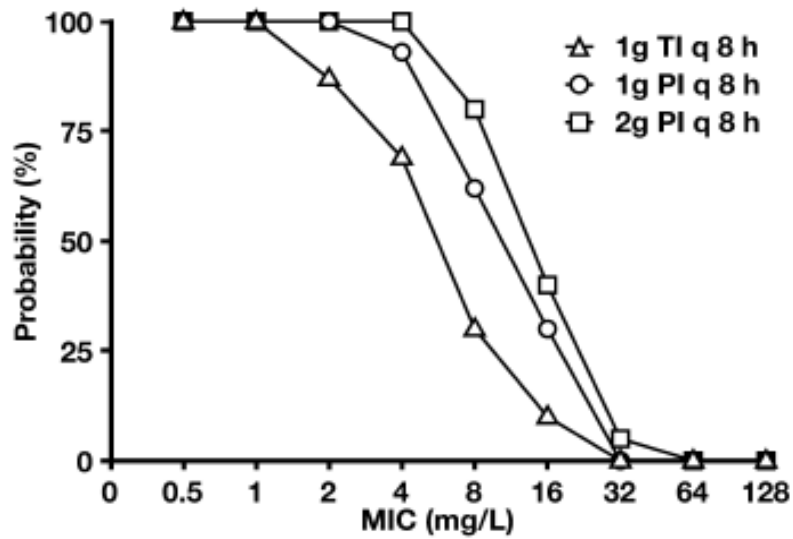


Figura 3. Probabilità simulate che la concentrazione di meropenem resti per il 50% del tempo al di sopra della MIC con 3 differenti regimi di somministrazione del farmaco. TI: infusione tradizionale in 30 minuti. PI: infusione prolungata in 3 ore. *GL Daikos et al 2011.*

Dalla figura 3 si deduce che *in-vitro*, nonostante la probabilità che la concentrazione di meropenem resti per il 50% del tempo al di sopra della MIC sia più alta se il carbapenemico viene infuso lentamente e al doppio del dosaggio tradizionale, per elevati valori di MIC la concentrazione del farmaco risulta insufficiente in qualunque modo venga somministrato. Si evince dunque che la monoterapia con meropenem, almeno *in-vitro*, risulta inefficace seppure il farmaco venga infuso lentamente e ad elevato dosaggio.

Pertanto la terapia con doppio carbapenemico va somministrata con il seguente schema: iniziale infusione di ertapenem alla dose standard di 1 g/die ev, seguita dopo 60 minuti da meropenem ad elevato dosaggio (2 g ev ogni 8 ore).



## SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo principale della nostra ricerca è stato quello di valutare l'efficacia *in-vivo* e l'attività *in-vitro* della terapia con doppio carbapenemico (meropenem + ertapenem) nei pazienti con infezione da CR-Kp nei quali la colistina era controindicata per tossicità e/o resistenza.

Scopo secondario è stato quello di confrontare l'*outcome* dei pazienti trattati con il doppio carbapenemico da solo con quello dei soggetti sottoposti alla terapia con doppio carbapenemico + colistina.

Ulteriori obiettivi del presente studio sono stati valutare l'attività sinergica degli antibiotici attraverso la metodica checkerboard e la loro attività battericida attraverso la metodica quantitativa delle curve di killing.

Verranno presentate due pubblicazioni scientifiche riguardo la suddetta ricerca.

Infine verrà invece esposto un case report sull'utilizzo della terapia con doppio carbapenemico per una sepsi causata da *Escherichia coli* produttrice di KPC in una paziente sottoposta a trapianto renale.

**L'attività sinergica e battericida del doppio carbapenemico per le  
infezioni causate da *Klebsiella pneumoniae* produttrice di  
carbapenemasi**

*Clinical Microbiology and Infection*, 2016; 22:147-153.

**MATERIALI E METODI**

**Popolazione studiata**

Il nostro studio, di tipo retrospettivo osservazionale, è stato condotto su pazienti con infezione da CR-Kp trattati con il doppio carbapenemico a causa della potenziale nefrotossicità associata alla colistina (clearance della creatinina <35 mL/min al momento dell'infezione da CR-Kp) e/o resistenza alla colistina (MIC >2 mg/L al VITEK-2). Tutti i partecipanti allo studio sono stati ricoverati presso il Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive della "Sapienza" Università di Roma. Tutti i soggetti coinvolti nello studio, dopo essere stati adeguatamente informati, hanno dato il proprio consenso al trattamento dei dati personali e all'utilizzo dei dati sanitari per finalità di ricerca.

Per ogni soggetto incluso nello studio sono state raccolte caratteristiche demografiche, dati relativi a fattori di rischio, modalità di acquisizione dell'infezione, presentazione clinica, accertamenti microbiologici, terapie effettuate e *outcome*.

## **Definizioni**

Sepsi, sepsi severa e shock settico sono stati definiti in accordo alle linee guida internazionali.

La risposta clinica e/o microbiologica in quinta giornata è stata definita rispettivamente come risoluzione dei segni e sintomi dell'infezione e/o negativizzazione delle colture ottenute dopo 5 giorni di trattamento antimicrobico.

La ricaduta è stata definita come recrudescenza dell'infezione da CR-Kp dopo un'iniziale risposta. Il follow-up è stato seguito fino a 60 giorni dopo il completamento della terapia antibiotica. I pazienti sono stati valutati clinicamente nel periodo di follow-up, mentre esami culturali sono stati condotti solo nei soggetti in cui si sospettava un'infezione.

Il regime antibiotico consisteva di ertapenem 1 g infuso in un'ora, seguito da alte dosi di meropenem (2 g ogni 8 ore infuso in 3 ore).

## **Sensibilità agli antibiotici e test di sinergia**

I campioni prelevati dai pazienti sono stati sottoposti ai test microbiologici utilizzati nella pratica clinica quotidiana. Il VITEK-2 (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, Francia) è stato usato per identificare e valutare la sensibilità dei ceppi batterici. Nel caso di isolamento di *K. pneumoniae* è stata poi eseguita la determinazione fenotipica del tipo di carbapenemasi.

Analisi microbiologiche aggiuntive, tra cui la macrodiluizione in brodo (BMD) e i test di sinergia, sono state condotte su 14 ceppi batterici. In caso di campioni multipli raccolti dallo stesso paziente, le analisi microbiologiche sono state effettuate sul ceppo proveniente dal sito di infezione più rilevante da un punto di vista clinico.

Le MIC (minima concentrazione inibente) di ertapenem e meropenem sono state determinate con il metodo della BMD su terreno Mueller Hinton.

Il sinergismo è stato studiato con il metodo a scacchiera o checkerboard utilizzando piastre da 96 pozzetti contenenti diverse concentrazioni di meropenem da solo, ertapenem da solo e meropenem + ertapenem (0.064, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 e 4 x MIC per ciascuno antibiotico) con un inoculo batterico di circa  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

E' stato quindi calcolato il FIC index (indice di concentrazione inibente frazionale): se tale valore è  $\leq 0.5$  vi è pieno sinergismo; tra 0.5 e 1 vi è sinergismo parziale; tra 1 e 2 vi è additività;  $\geq 2$  vi è antagonismo.

L'attività del meropenem, da solo e in combinazione con l'ertapenem, è stata inoltre studiata con le curve di killing usando un inoculo iniziale di circa  $5 \times 10^5$  CFU/mL e valutando la fase di crescita logaritmica. Sono state utilizzate le seguenti concentrazioni antibiotiche:

Tubo 1: 1 x MIC di ertapenem

Tubo 2: 1 x MIC di meropenem

Tubo 3: 0.5 x MIC di meropenem + 0.5 x MIC di ertapenem

Tubo 4: 0.5 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem

Tubo 5: 1 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem

Tubo 6: 2 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem

Si definisce sinergico l'effetto di un aumento dell'uccisione batterica superiore di 2 logaritmi<sub>10</sub> (100 volte) nelle 24 ore. Si osserva invece un effetto battericida dell'associazione antibiotica se l'uccisione batterica è superiore di 3 logaritmi<sub>10</sub> (1000 volte) nelle 24 ore.

Tutti gli esperimenti *in vitro* sono stati eseguiti due volte.

### **Analisi statistica**

Le variabili categoriche sono espresse come percentuali. Le variabili continue sono espresse come media  $\pm$  DS (Deviazione Standard) o come mediana (range). La carica batterica è espressa come media  $\pm$  SEM (Errore Standard della Media) del logaritmo<sub>10</sub> delle CFU/mL.

La determinazione della significatività statistica delle varianti considerate è stata eseguita con il software GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA 92037 USA) con i seguenti metodi:

- test chi quadrato ( $\chi^2$ ) per variabili nominali di campioni numerosi;
- test F di Fisher per variabili nominali di campioni poco numerosi;
- test *t* di Student per confrontare variabili quantitative che seguono una distribuzione normale in 2 gruppi;
- test U di Mann-Whitney per confrontare variabili quantitative che non seguono una distribuzione normale in 2 gruppi;

- analisi della varianza (ANOVA) per confrontare più di 2 gruppi;
- regressione logistica multipla per valutare l'associazione di una variabile dipendente con più variabili indipendenti.

Tutti i test effettuati sono a 2 code e un *p-value* <0.05 è considerato statisticamente significativo.

## **RISULTATI**

### **Popolazione studiata**

In totale 15 pazienti sono stati inclusi nello studio. Le caratteristiche della popolazione studiata sono le seguenti (Tabella 1):

- Età media:  $60.9 \pm 10.9$  anni.
- Nazionalità: 13 pazienti italiani, 1 colombiano, 1 georgiano.
- APACHE III score medio:  $39.07 \pm 19.27$ .
- Charlson Comorbidity Index medio (probabilità media di sopravvivenza a 1 anno):  $3.8 \pm 2.9$  ( $0.54 \pm 0.39$ ).
- Modalità di acquisizione dell'infezione: 6 health care associated, 9 hospital acquired (media dei giorni di ricovero prima dell'infezione:  $30 \pm 29$ ).
- Mediana (e range) dei giorni di ricovero prima dell'insorgenza dell'infezione nei casi hospital acquired: 18 giorni (2-70).

- Fattori di rischio (nell'ultimo anno): 13 pazienti già ospedalizzati, 10 sottoposti a interventi chirurgici, 7 ricoverati in Unità di Terapia Intensiva, 10 avevano posizionato catetere vescicale, 6 catetere venoso centrale, 3 tracheostomia.
- Fattori di rischio (nelle ultime 72 ore): 1 paziente sottoposto a endoscopia intestinale, 2 avevano posizionato sondino naso-gastrico, 2 sottoposti a fibrobroncoscopia, 1 in nutrizione parenterale, 4 con CVC.
- Uso di antibiotici negli ultimi 90 giorni: 2 pazienti cefalosporine, 6 penicilline protette, 4 carbapenemi, 6 fluorochinoloni, 2 colistina, 4 aminoglicosidi, 5 daptomicina, 1 tigeciclina, 1 vancomicina (totale pazienti già sottoposti ad antibiotico terapia: 12/15, ossia 80%).
- Pazienti con sepsi grave o shock settico: 6/15, ossia 40%.
- Pazienti con sepsi: 2/15, ossia 13.3%.
- Indici di flogosi medi: VES  $86 \pm 37$  mm/h, PCR  $130.373 \pm 107.271$   $\mu\text{g/L}$ .
- Media dei globuli bianchi:  $13.107 \pm 7.598$ /mmc (neutrofili  $72 \pm 22\%$ ).
- Terapia empirica: 6 pazienti meropenem, 3 gentamicina, 4 daptomicina, 2 colistina. Mediana dei giorni di terapia empirica (range): 7 (2-24).
- Terapia mirata: doppio carbapenemico, con aggiunta di tigeciclina in 1 paziente e di gentamicina in 1 paziente. Mediana dei giorni di trattamento (range): 15 (7-150).
- Sede dell'infezione: 8 vie urinarie, 2 tessuti molli, 2 endoprotesi vascolari, 1 polmone, 1 polmone e vie urinarie, 1 polmone e endoprotesi vascolare.

- Infezioni d'organo batteriemiche: 5/15 (33.3%), di cui 3 a partenza dai tessuti molli, 1 dal polmone, 1 dalle vie urinarie.
- Tampone rettale per CR-Kp: positivo in 9 pazienti, negativo in 1 paziente, non disponibile in 5 pazienti.
- Altri isolamenti microbiologici: presenti in 10/15 pazienti (66.7%), con prevalenza di stafilococchi oxacillino-resistenti. Isolamento di *Candida spp* in 2/15 pazienti (13.3%).
- Altri isolamenti su emocolture: presenti in 5/15 pazienti (33.3%). In particolare sono stati isolati i seguenti microrganismi: *Proteus mirabilis*; *Staphilococcus haemolyticus* meticillino-resistente e *Staphilococcus epidermidis* meticillino-sensibile; *Staphilococcus hominis* e *Staphilococcus epidermidis* entrambi meticillino-resistenti; MRSA, MRSE, *Candida parapsilosis* e *Klebsiella oxytoca*; *Acinetobacter baumannii*.
- Mediana dei giorni necessari per la risposta clinica (range): 3 (2-15).
- Effetti avversi terapia: presenti in 3/15 pazienti (20%), di cui 1 caso di ipernatriemia e iperkaliemia, 1 di nausea, 1 di crisi comiziali (soggetto già sottoposto a intervento NCH per ematoma subdurale con infezione del sito chirurgicoda CR-Kp). Tali effetti collaterali non hanno comunque portato all'interruzione della terapia con doppio carbapenemico poiché controllati con terapia medica.
- Outcome a 60 giorni: 1 *exitus* (6.7%), 2 recidive (13.3%), 12 guarigioni (80%).



Caratteristiche	Pazienti (n=15)
<b>Caratteristiche demografiche</b>	
• Et� (anni), M $\pm$ DS	60.9 $\pm$ 10.9
• Sesso (M:F)	10:5
• Nazionalit�	13 IT, 1 COL, 1 GEO
• APACHE III score, M $\pm$ DS	39.1 $\pm$ 19.3
• Charlson Comorbidity Index, M $\pm$ DS	3.8 $\pm$ 2.9
• Sopravvivenza a 1 anno, M $\pm$ DS	0.54 $\pm$ 0.39
<b>Modalit� acquisizione infezione e fattori di rischio (ultimi 12 mesi), n (%)</b>	
• HCA:HA	6:9
• Durata ospedalizzazione in HA, giorni <sup>�</sup>	18 (2-70)
• Ospedalizzazione (ultimi 12 mesi)	13 (86.7%)
• Interventi chirurgici	10 (66.7%)
• Intensive Care Unit	7 (46.7%)
• Catetere vescicale	10 (66.7%)
• Catetere venoso centrale	6 (40%)
• Tracheostomia	3 (20%)
<b>Fattori di rischio (ultime 72 ore), n (%)</b>	
• Endoscopia intestinale	1 (6.7%)
• Sondino naso-gastrico	2 (13.3%)
• Fibrobroncoscopia	2 (13.3%)
• Nutrizione parenterale	1 (6.7%)
• Catetere venoso centrale	4 (26.7%)
<b>Antibioticoterapia negli ultimi 90 giorni, n (%)</b>	
• Cefalosporine e penicilline protette	12 (80%)
• Carbapenemi	8 (53.3%)
• Fluorochinoloni	4 (26.7%)
• Colistina	6 (40%)
• Altri antibiotici	2 (13.3%)
<b>Presentazione clinica, n (%)</b>	
• Sepsi	2 (13.3%)
• Sepsi grave o shock settico	6 (40%)
• Sede infezione	8 VU, 2 TM, 2 EV, 1 P, 1 VU+P, 1 P+TM
• Infezioni d'organo batteriemiche	5 (33.3%), di cui 1 TM, 2 EV, 1 P e 1 VU
<b>Colonizzazione rettale da CR-Kp, n (%)</b>	9/10 (90%)*
<b>Altri isolamenti microbiologici, n (%)</b>	10 (66.7%)
• Emocolture	5 (33.3%)
• Altri campioni <sup>�</sup>	5 (33.3%)
<b>Terapia</b>	
• Durata terapia empirica (giorni) <sup>�</sup>	7 (2-24)
• Durata terapia mirata (giorni) <sup>�</sup>	15 (7-150)
• Risposta clinica (giorni) <sup>�</sup>	3 (2-15)
• Effetti avversi, n (%)	3 (20%)
• Tipo di effetti avversi	1 iperNa e iperK, 1 crisi comiziali, 1 nausea
<b>Outcome a 60 giorni, n (%)</b>	
• <i>Exitus</i>	1 (6.7%)
• Recidiva	2 (13.3%)
• Fallimento	0
• Guarigione	12 (80%)

Tabella 1. Caratteristiche della popolazione studiata.

M: media. DS: deviazione standard. IT: italiana. COL: colombiana. GEO: georgiana. HCA: health care associated. HA: hospital acquired. VU: vie urinarie. TM: tessuti molli. EV: endoprotesi vascolari. BP: batteriemia primaria. P: polmone. \* 5/15 tamponi rettali non disponibili.

<sup> </sup> Altri campioni: urine, espettorato, tracheoaspirato, broncolavaggio, tampone, agoaspirato, drenaggio, sperma, campione intraoperatorio. <sup> </sup> Valori espressi in mediana (range).

## **Sensibilità agli antibiotici e test di sinergia**

La tabella 2 mostra la sensibilità *in vitro* di ciascun ceppo batterico studiato con la metodica VITEK-2. La tabella 3 mostra invece le MIC e le MBC per meropenem ed ertapenem ottenute con la macrodiluizione in brodo.

Tutti i ceppi erano produttori di carbapenemasi in accordo con precedenti studi che indicavano che il ceppo circolante nel nostro ospedale era KPC-3.

Le MIC<sub>50/90</sub> erano 256/512 mg/L e 256/256 mg/L rispettivamente per meropenem e ertapenem.

La sinergia tra i due carbapenemici (completa più parziale) valutata con la metodica checkerboard è stata osservata in 11/14 casi (78.6%).

	Meropenem	Ertapenem	Tigeciclina	Colistina	Gentamicina
Paziente 1	R >16	R >8	R 4	R >16	R 8
Paziente 2	R >16	R >8	R 4	S <0.5	S <1
Paziente 3	R >16	R >8	I 2	R >16	I 4
Paziente 4	R >16	R >8	I 2	S <0.5	S <1
Paziente 5	R >16	R >8	S 1	R >16	I 4
Paziente 6	R >16	R >8	S 1.5	R >16	S 2
Paziente 7	R >16	R >8	R 4	R >16	I 4
Paziente 8	R >16	R >8	S <1	S <2	R 8
Paziente 9	R >16	R >8	I 2	R >16	I 4
Paziente 10	R >16	R >8	R 4	S <0.5	I 4
Paziente 11	R >16	R >8	R 4	S <0.5	S <1
Paziente 12	R >16	R >8	R 4	R >16	I 4
Paziente 13	R >16	R >8	R 4	R 8	R 8
Paziente 14	R >16	R >8	R 4	S <0.5	I 4
Paziente 15	R >32	R >32	R 2	S 0.125	S 1

Tabella 2. MIC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) di alcuni antibiotici dei ceppi batterici dei 15 pazienti sottoposti a terapia con doppio carbapenemico, ottenuti con metodica semiautomatica (VITEK-2).

	<b>MIC/MBC meropenem</b>	<b>MIC/MBC ertapenem</b>
Paziente 1	256/256	256/256
Paziente 2	512/512	128/128
Paziente 3	512/>512	256/256
Paziente 4	512/512	256/256
Paziente 5	128/128	256/256
Paziente 6	128/256	256/512
Paziente 7	128/>512	256/256
Paziente 8	256/256	256/256
Paziente 9	32	64
Paziente 10	128/128	128/128
Paziente 11	ND	ND
Paziente 12	256/256	128/128
Paziente 13	256/256	128/256
Paziente 14	256/512	256/256
Paziente 15	128/128	128/128

Tabella 3. MIC e MBC ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) di meropenem ed ertapenem dei ceppi batterici dei 15 pazienti sottoposti a terapia con doppio carbapenemico, ottenuti con metodica della macrodiluizione in brodo. ND: non disponibile.

## Curve di killing

Lo studio sull'attività battericida dell'associazione tra meropenem ed ertapenem è stato effettuato attraverso il metodo delle time-kill curves e la loro attività è stata mostrata attraverso la creazione di grafici semilogaritmici. I grafici delle pagine 31 - 38 mostrano i risultati ottenuti nei 14 ceppi batterici testati (1 risultava non disponibile). La linea tratteggiata orizzontale presente in ogni grafico indica l'abbattimento della carica batterica di tre logaritmi<sub>10</sub> rispetto all'inoculo.

Innanzitutto si può facilmente vedere che il meropenem o l'ertapenem usati singolarmente non sono battericidi, eccetto il meropenem nei pazienti 3 e 4; si sottolinea che in questi due ceppi batterici, la MIC per meropenem era molto elevata (512 µg/mL) e corrispondeva alla MBC. In questi due pazienti non è stato possibile valutare il sinergismo antibiotico poiché la carica batterica era già azzerata dal solo meropenem.

Per quanto concerne il sinergismo antibiotico (calcolato a 24 ore), con la concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 0.5 x MIC di ertapenem si è avuto sinergismo in 2 ceppi batterici su 14 (14.2%). Con la concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem, si è verificato sinergismo nel 78.5% dei casi (11/14). Con la combinazione 1 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem il sinergismo è salito fino all'85.7% (12/14), per arrivare fino al 100% (14/14) con la concentrazione 2 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem.

Consideriamo ora la batteriocidia delle varie concentrazioni antibiotiche:

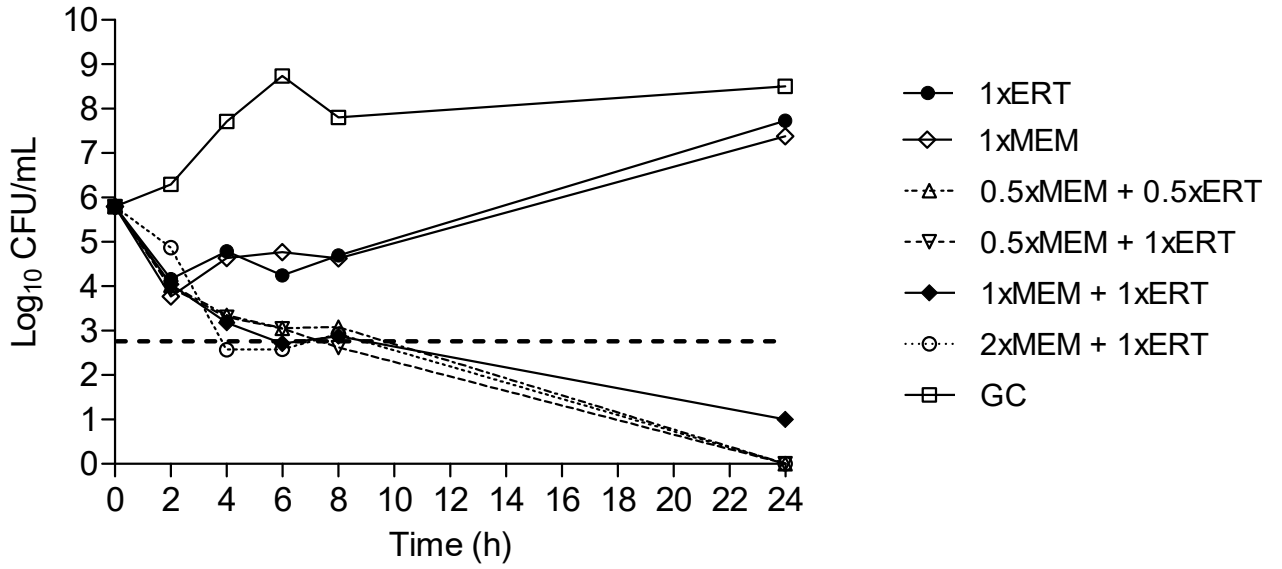
- 0.5 x MIC di meropenem + 0.5 x MIC di ertapenem. Sebbene si sia verificata batteriocidia nelle prime ore, si è assistito poi a una ricrescita batterica a 24 ore in 12/14 ceppi (85.7%).
- 0.5 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem. Con queste concentrazioni antibiotiche, si è rilevata batteriocidia ai tempi 4, 6, 8, 24 ore rispettivamente del 21.4% (3/14 ceppi), 50% (7/14), 50% (7/14), 57.1% (8/14).
- 1 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem. La batteriocidia ai tempi 2, 4, 6, 8, 24 ore è stata rispettivamente del 7.1% (1/14), 35.7% (5/14), 64.2% (9/14), 78.5% (11/14), 85.7% (12/14).
- 2 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem. Si è verificata batteriocidia ai tempi 4, 6, 8, 24 ore rispettivamente del 35.7% (5/14), 57.1% (8/14), 85.7% (12/14), 100% (14/14).

I risultati delle curve di killing sono riassunti nella Figura 4 e nella Tabella 4.

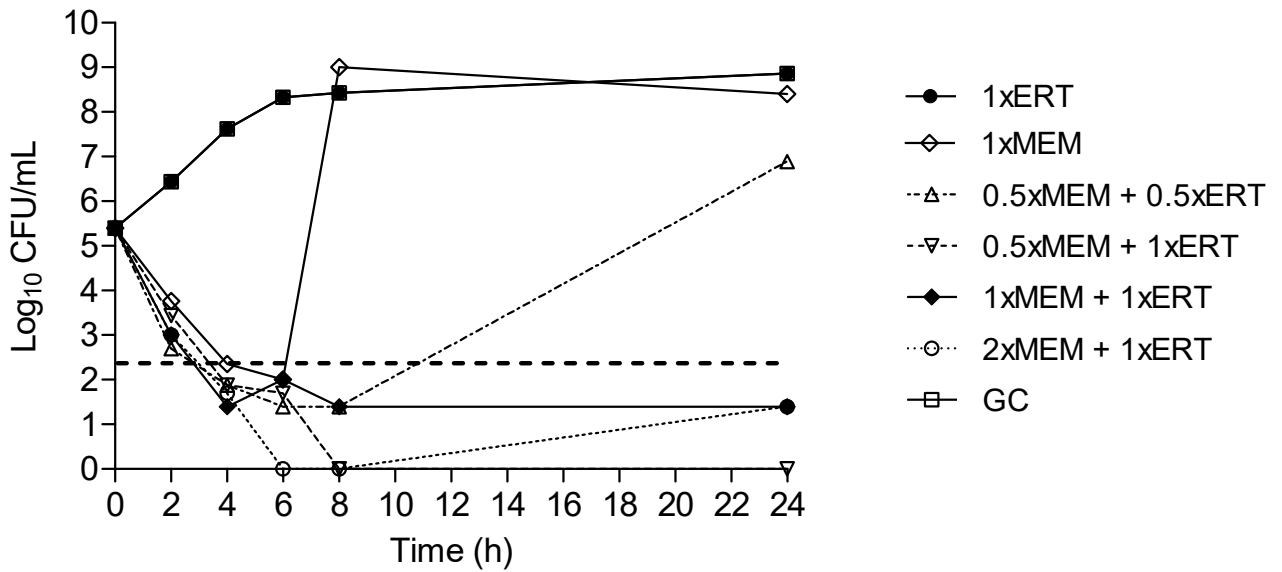
La determinazione della significatività statistica delle curve di killing è stata eseguita con il metodo ANOVA. Innanzitutto *in-vitro* non ci sono differenze statisticamente significative nell'attività del meropenem in monoterapia rispetto all'ertapenem in monoterapia ( $p=0.75$ ). Al contrario, con tutte le concentrazioni antibiotiche analizzate, sia del carbapenemico singolo sia delle associazioni, si è verificata una significativa riduzione della crescita batterica rispetto al controllo positivo ( $p<0.0001$ ). E' importante sottolineare che la concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem provoca una riduzione delle colonie batteriche significativamente maggiore rispetto alla concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 0.5 x MIC ertapenem ( $p<0.0001$ ). Al contrario

non vi è differenza statisticamente significativa tra le combinazioni 1 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem e 0.5 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem ( $p=0.82$ ). Infine la concentrazione 2 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem non determina una significativa riduzione della crescita batterica rispetto alla concentrazione 1 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem ( $p=0.23$ ).

Paziente 1

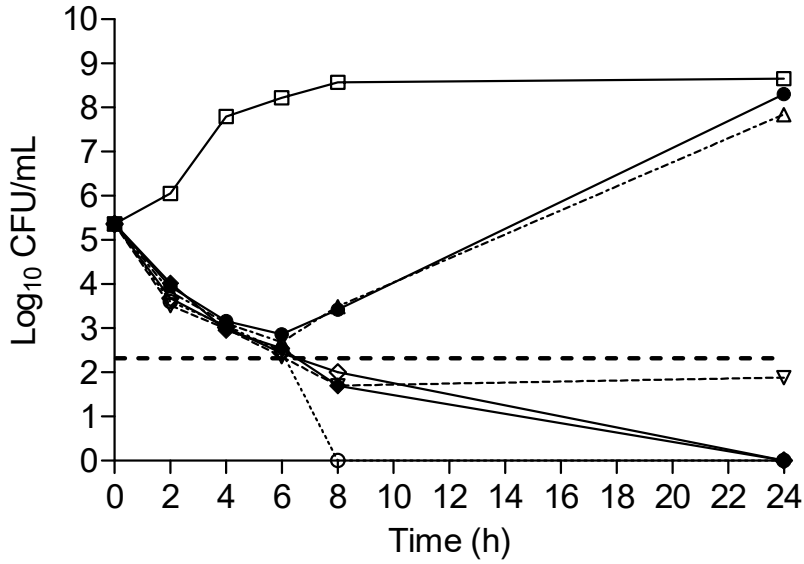


Paziente 2



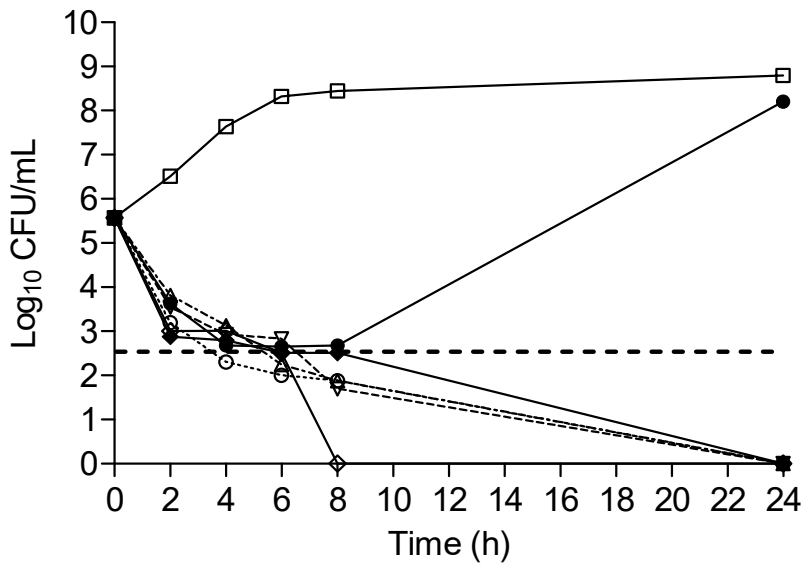


Paziente 3



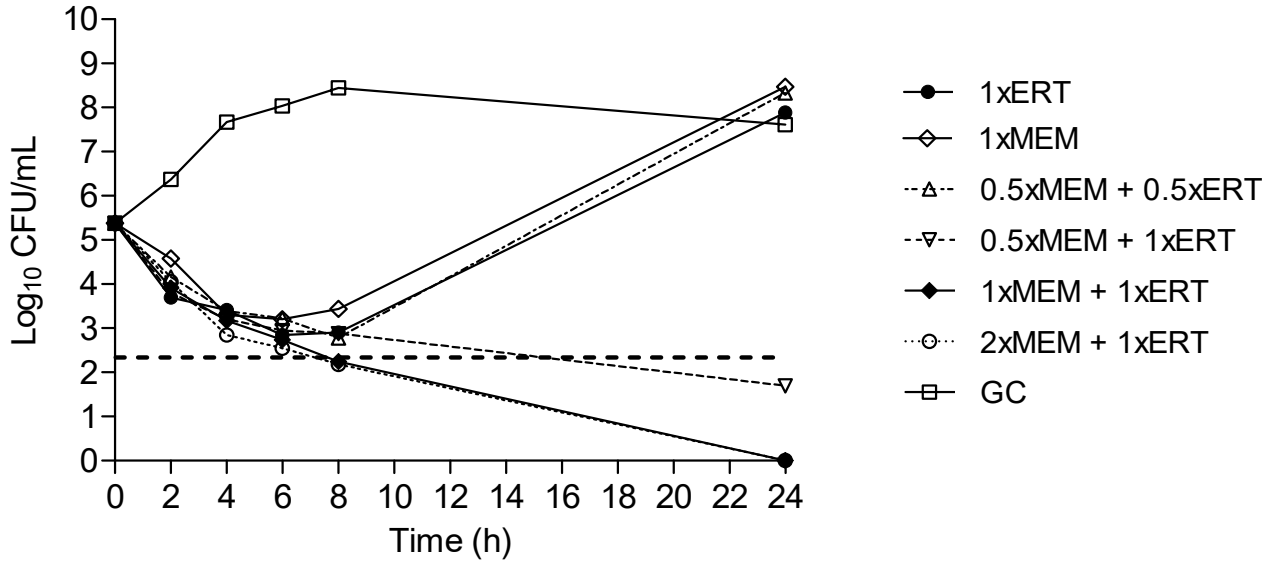
- 1xERT
- ◇ 1xMEM
- △--- 0.5xMEM + 0.5xERT
- ▽--- 0.5xMEM + 1xERT
- ◆ 1xMEM + 1xERT
- ⋯○⋯ 2xMEM + 1xERT
- GC

Paziente 4

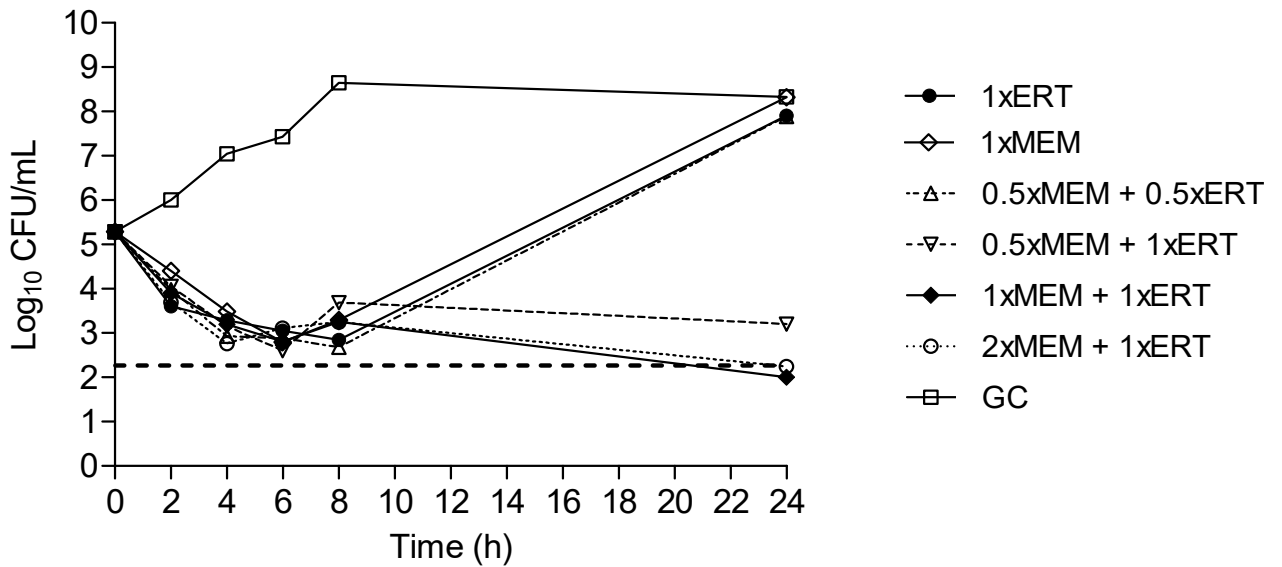


- 1xERT
- ◇ 1xMEM
- △--- 0.5xMEM + 0.5xERT
- ▽--- 0.5xMEM + 1xERT
- ◆ 1xMEM + 1xERT
- ⋯○⋯ 2xMEM + 1xERT
- GC

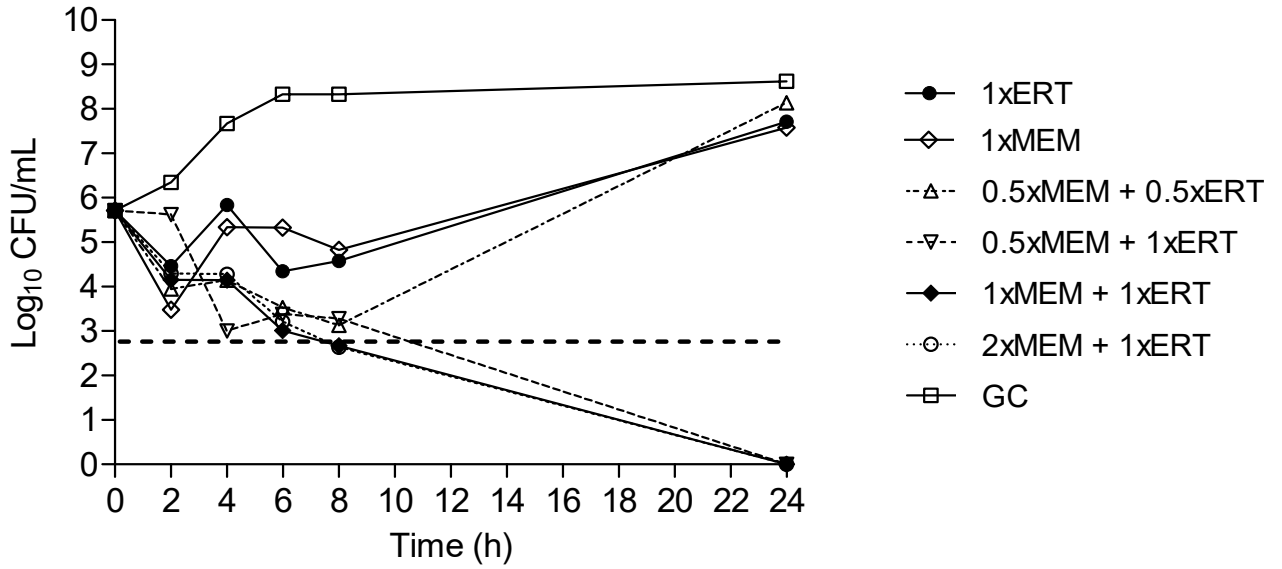
Paziente 5



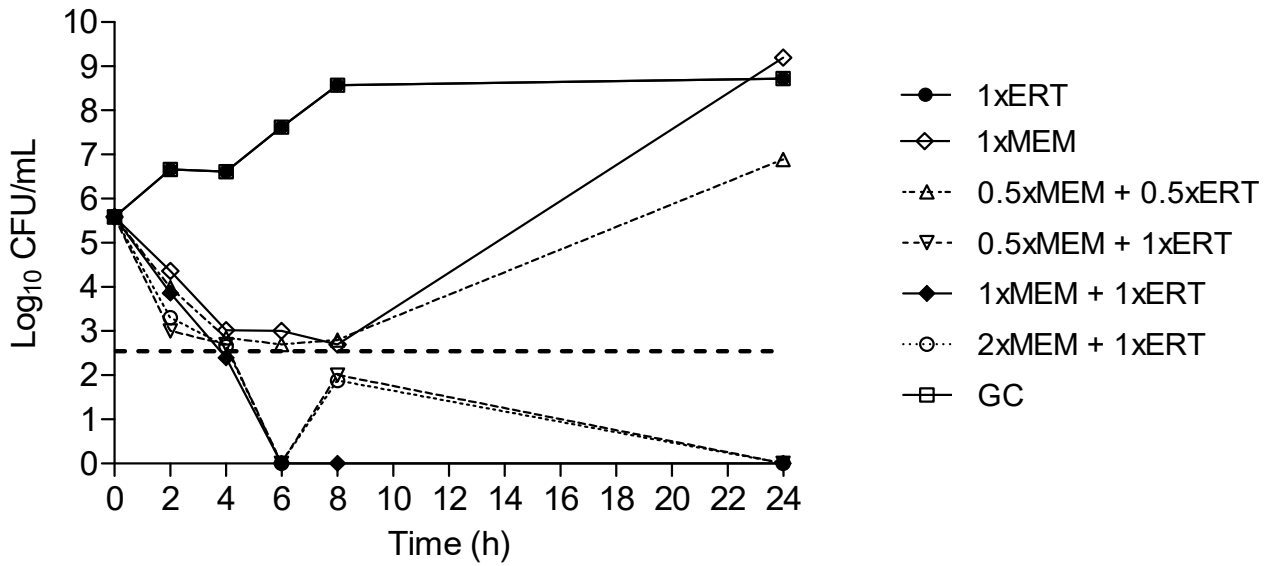
Paziente 6



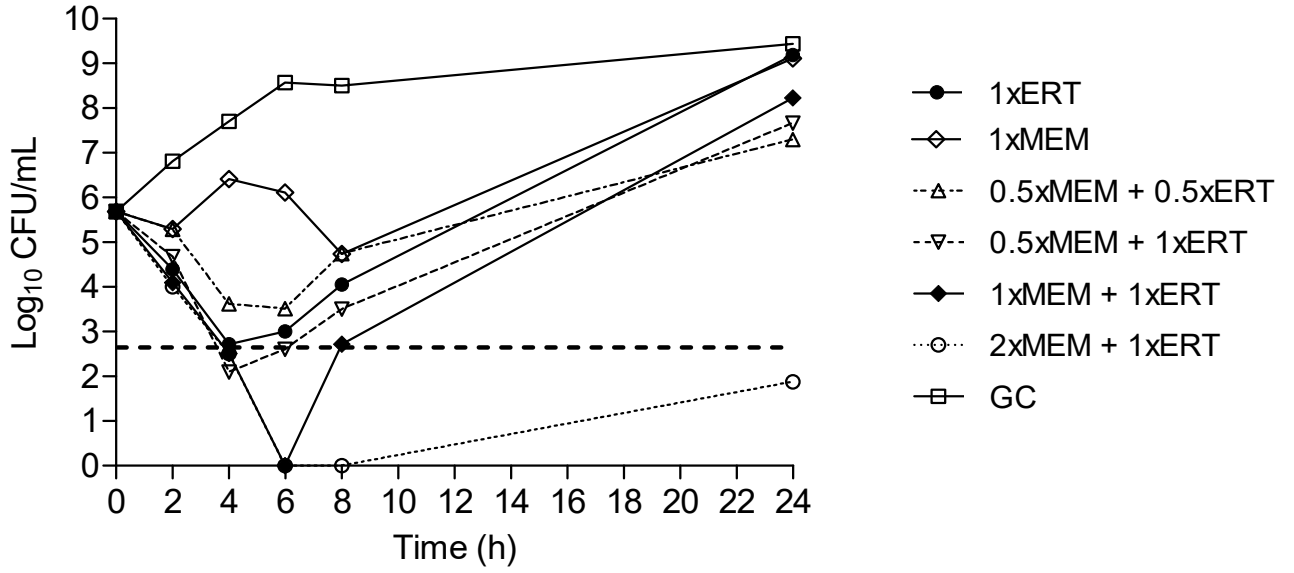
Paziente 7



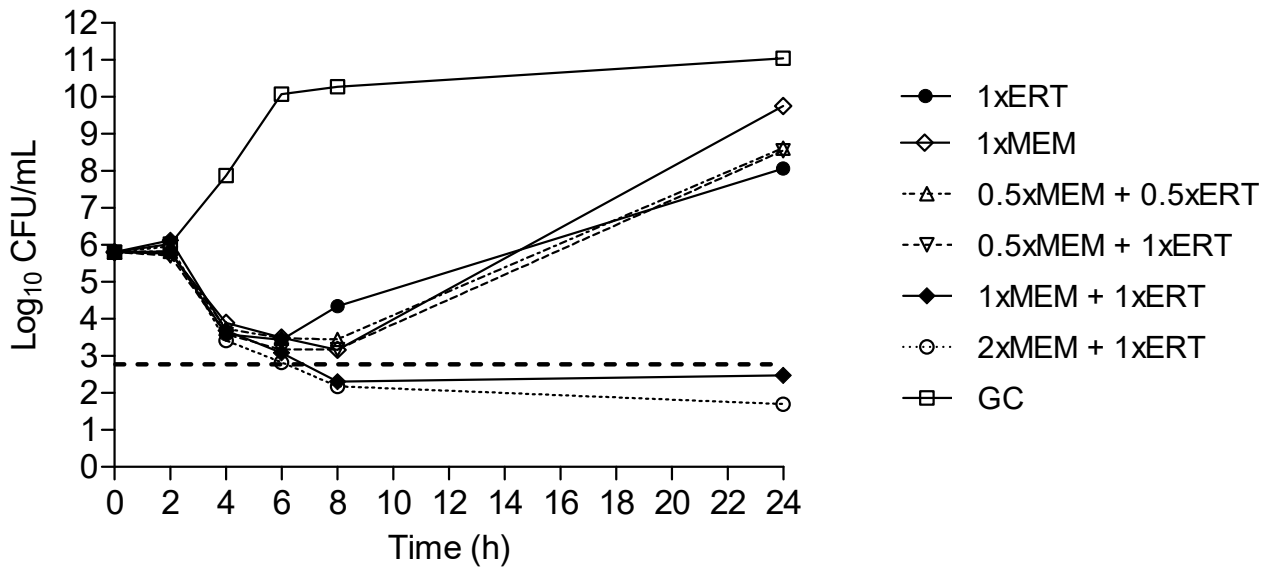
Paziente 8



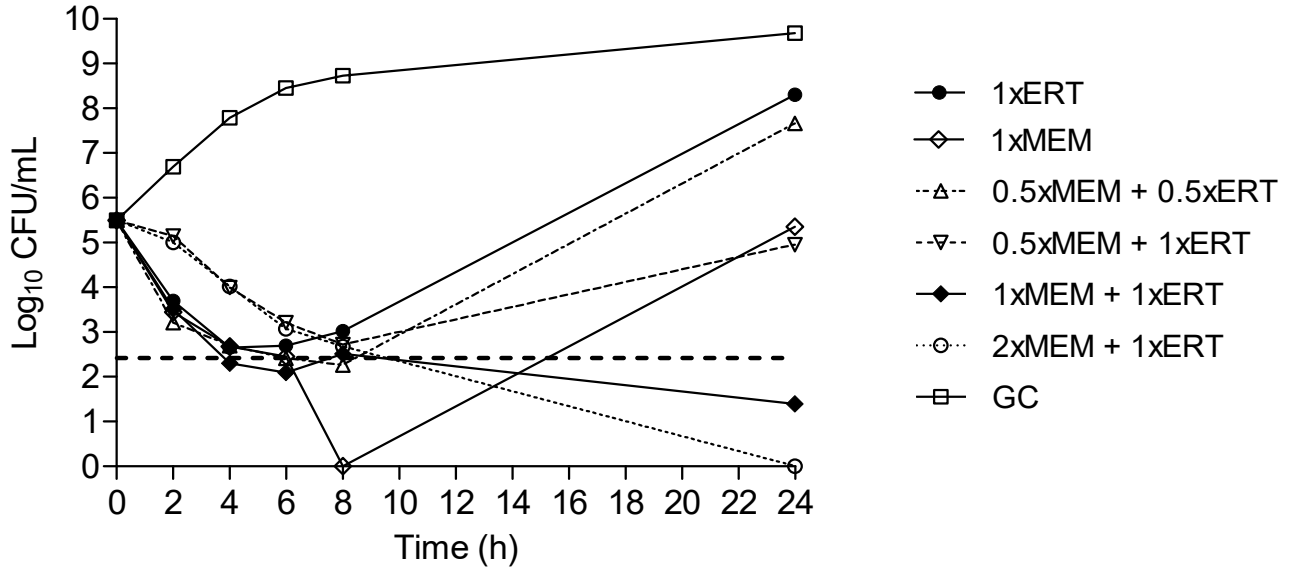
Paziente 9



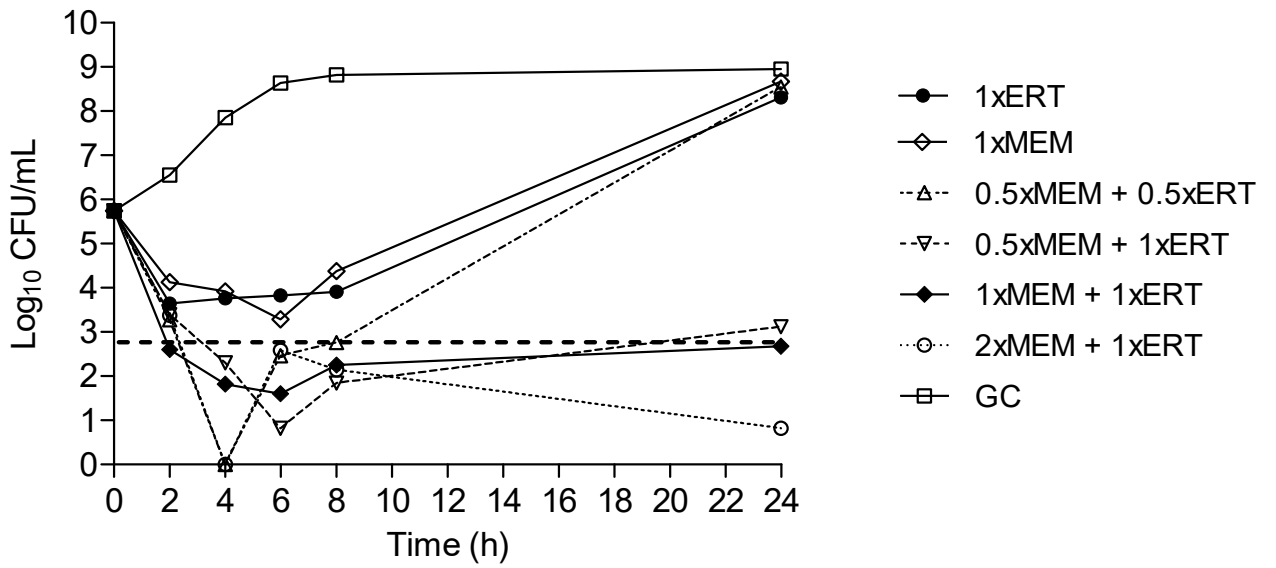
Paziente 10



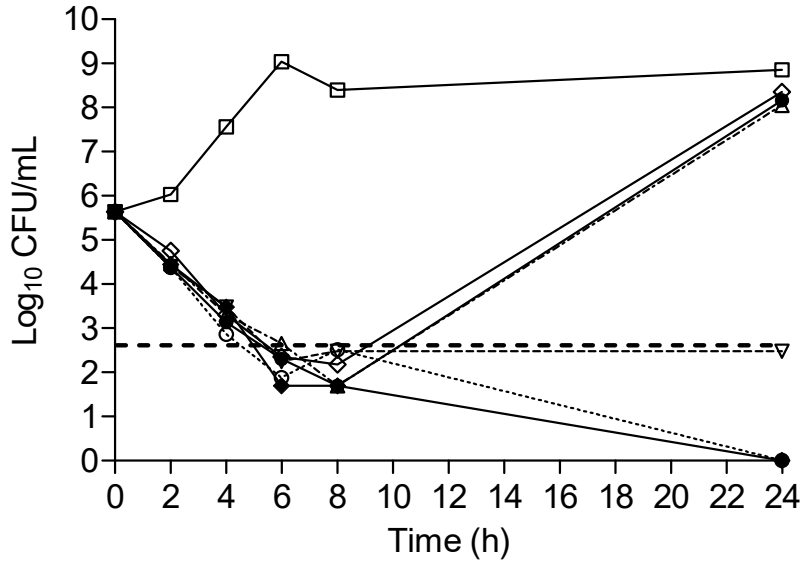
Paziente 12



Paziente 13

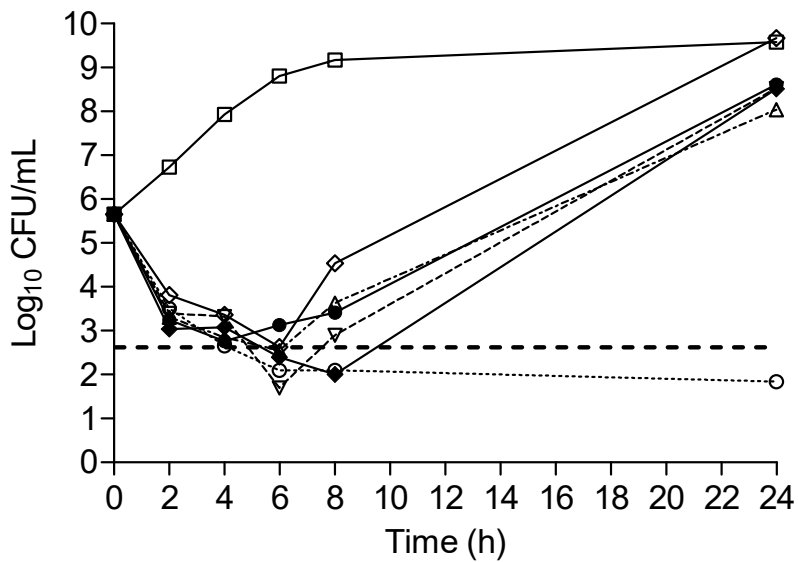


Paziente 14



- 1xERT
- ◇ 1xMEM
- △ 0.5xMEM + 0.5xERT
- ▽ 0.5xMEM + 1xERT
- ◆ 1xMEM + 1xERT
- 2xMEM + 1xERT
- GC

Paziente 15



- 1xERT
- ◇ 1xMEM
- △ 0.5xMEM + 0.5xERT
- ▽ 0.5xMEM + 1xERT
- ◆ 1xMEM + 1xERT
- 2xMEM + 1xERT
- GC

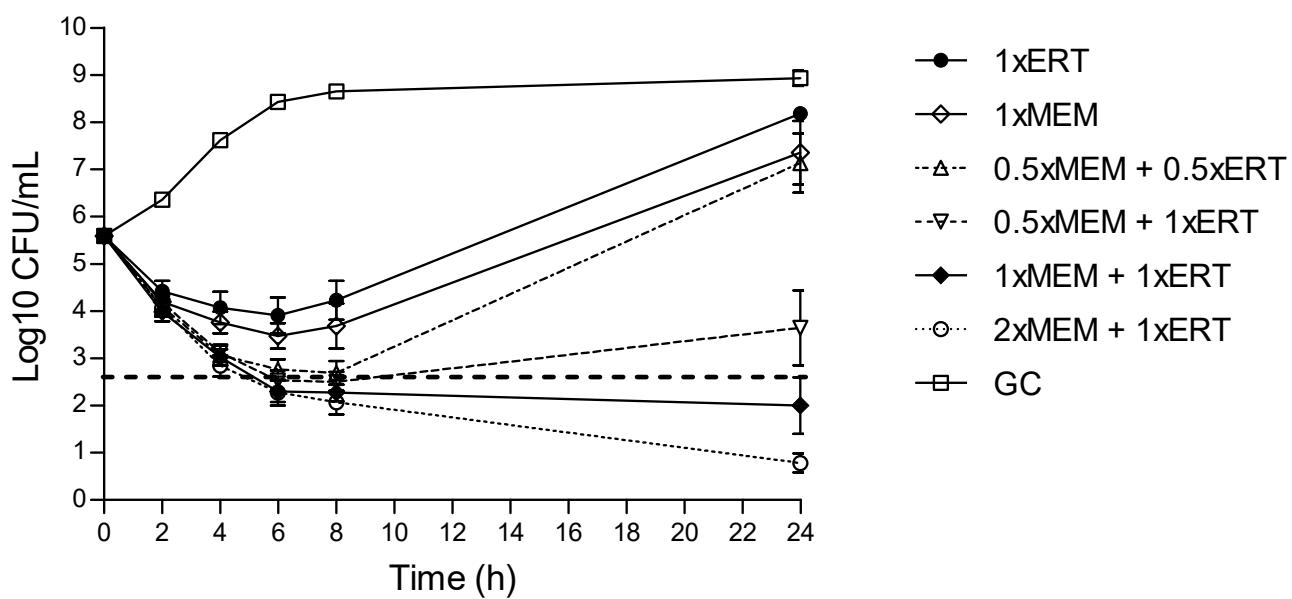


Figura 4. Curve di killing dei 14 ceppi di CR-Kp esaminati. Nell'ultimo grafico sono riassunte le curve di tutti i ceppi testati e i valori sono espressi come media  $\pm$  SEM. ERT: ertapenam. MEM: meropenem. GC: growth control.

<b>Tempo (h)</b>	<b>Killing</b> 0.5MEM+ 0.5ERT, n (%)	<b>Killing</b> 0.5MEM+ 1ERT, n (%)	<b>Killing</b> 1MEM+ 1ERT, n (%)	<b>Killing</b> 2MEM+ 1ERT, n (%)	<b>Syn</b> 0.5MEM+ 0.5ERT, n (%)	<b>Syn</b> 0.5MEM+ 1ERT, n (%)	<b>Syn</b> 1MEM+ 1ERT, n (%)	<b>Syn</b> 2MEM+ 1ERT, n (%)
4		3/14 (21.4%)	5/14 (35.7%)	5/14 (35.7%)				
6		7/14 (50%)	9/14 (64.2%)	8/14 (57.1%)				
8		7/14 (50%)	11/14 (78.5%)	12/14 (85.7%)				
24	2/14 (14.2%)	8/14 (57.1%)	12/14 (85.7%)	14/14 (100%)	2/14 (14.2%)	11/14 (78.5%)	12/14 (85.7%)	14/14 (100%)

Tabella 4. Risultati delle time-kill curves.



## DISCUSSIONE

Negli ultimi anni si è assistito ad un incremento di infezioni nosocomiali da germi multiresistenti, soprattutto da *Enterobacteriaceae* che producono carbapenemasi (CPE), in particolare KPC, VIM e NDM.

Uno dei problemi più preoccupanti è l'emergenza della *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi (CR-Kp); i dati europei mostrano che la *K. pneumoniae* è resistente alle cefalosporine di III generazione nel 25.7% dei casi, ai carbapenemi nel 6.1% dei casi, ai fluorochinoloni nel 24.6% dei casi, agli aminoglicosidi nel 19% dei casi (report ECDC 2016). In Italia si osserva un trend in drammatico aumento dei ceppi di CR-Kp: infatti, mentre nel 2009 solo l'1.3% dei ceppi isolati dal sangue era resistente, questa percentuale è salita al 33.9% nel 2016.

Recenti dati di letteratura dimostrano che la mortalità delle infezioni da CR-Kp è elevata, intorno al 40%; diversi fattori sono associati ad un aumento della mortalità, tra cui la colistino-resistenza del ceppo, la presenza di batteriemia, la degenza del paziente in Unità di Terapia Intensiva, l'immunosoppressione del paziente. Inoltre è emerso che la presenza di più siti di infezione e/o colonizzazione è associata ad un peggiore *outcome* del paziente con infezione da CR-Kp.

Diversi studi hanno dimostrato che la terapia antibiotica di combinazione è in grado di ridurre la mortalità dei pazienti con infezioni sistemiche da CR-Kp rispetto alla monoterapia. L'unico caso in cui può essere utilizzata la monoterapia è rappresentata

dalle infezioni delle vie urinarie non complicate, dove gli aminoglicosidi assumono un ruolo di rilievo.

Per quanto riguarda l'utilizzo dei carbapenemi, uno studio sulla farmacocinetica e sulla farmacodinamica del meropenem *in-vitro*, ha evidenziato che tale farmaco trova applicazione anche nel trattamento della CR-Kp, in particolare se somministrato in infusione lenta e ad elevati dosaggi, soprattutto se la MIC non risulta particolarmente elevata.

Molte terapie di combinazione per le infezioni da CR-Kp si basano sull'utilizzo della colistina, ma alla luce dell'aumento dei ceppi colistino-resistenti e considerando la nefrotossicità di questo farmaco, la ricerca si sta focalizzando su combinazioni innovative colistin-sparing, quali il doppio carbapenemico.

Il razionale dell'associazione tra meropenem ed ertapenem risiede nel fatto che l'ertapenem si comporta da inibitore suicida e satura gli enzimi che inattivano i carbapenemi, dando quindi la possibilità al meropenem di esplicare la sua azione antibatterica.

In considerazione della gravità delle infezioni sistemiche da CR-Kp e delle limitate opzioni terapeutiche, alcuni studi hanno sottolineato l'importanza delle strategie per prevenire la diffusione delle infezioni e contaminazioni da CR-Kp. In particolare, le misure di controllo suggerite come efficaci sono: l'identificazione tempestiva dei pazienti infetti, la sorveglianza attiva dei soggetti colonizzati attraverso lo screening con tampone rettale dei pazienti contatti del caso e dei soggetti ad alto rischio di colonizzazione al momento del ricovero, l'isolamento (in coorte o stanza singola) dei

pazienti infetti o colonizzati, l'adozione dei presidi di prevenzione da contatto da parte del personale di assistenza.

Considerando l'elevata mortalità delle infezioni da CR-Kp e le limitate opzioni terapeutiche, risulta necessario stabilire dei criteri oggettivi per aiutare il clinico a decidere in quali casi iniziare immediatamente una terapia empirica attiva contro tale batterio. Recentemente è stato proposto un algoritmo per guidare la gestione terapeutica combinando il Giannella risk score (GRS) che predice il rischio di batteriemia nei pazienti con colonizzazione rettale da CR-Kp e l'INCREMENT-CPE score (ICS), che predice il rischio di mortalità nei soggetti con batteriemia. Tale algoritmo suggerisce in quali casi iniziare una terapia empirica, se monoterapia o terapia di combinazione, in quali soggetti effettuare la decontaminazione intestinale e in quali effettuare solo il follow-up infettivologico.

La presente ricerca, di tipo retrospettivo ed osservazionale, rappresenta una delle prime casistiche di pazienti trattati con il doppio carbapenemico esistente in letteratura, nella quale i dati clinici sono supportati da analisi qualitative e quantitative *in-vitro*.

Abbiamo esaminato 15 pazienti con infezione da CR-Kp che hanno ricevuto la terapia con doppio carbapenemico (meropenem + ertapenem). La scelta del doppio carbapenemico è stata indotta dalla presenza di insufficienza renale o colistino-resistenza; infatti, i nostri dati rispecchiano la letteratura mostrando che il 53.3% dei ceppi di CR-Kp era resistente alla colistina (con la metodica della macrodiluzione in brodo).

Tutti i nostri pazienti avevano acquisito l'infezione in strutture ospedaliere o in strutture di lungodegenza (60% hospital acquired e 40% health care associated) e il 46.7% era transitato in Unità di Terapia Intensiva, dimostrando quindi come la permanenza in un reparto ad alto rischio sia associata all'acquisizione di germi MDR. Inoltre, nella nostra popolazione è stata trovata un'elevata prevalenza di fattori di rischio per infezioni da CR-Kp riconosciuti in letteratura, tra cui spiccano (nei 12 mesi precedenti l'infezione) l'ospedalizzazione (86.7% dei pazienti), gli interventi chirurgici maggiori (66.7%), il posizionamento di catetere vescicale (66.7%) e di catetere venoso centrale (40%).

E' altresì noto che una precedente terapia antibiotica è un importante fattore di rischio per infezioni da CR-Kp; nel nostro studio l'80% dei pazienti aveva già assunto (nei 90 giorni precedenti) diversi tipi di antibiotici, con prevalenza di penicilline e cefalosporine (53.3%), fluorochinoloni (40%) e carbapenemi (26.7%).

Nella nostra casistica la principale sede di infezione era il tratto urinario (53.4% dei pazienti); le infezioni d'organo batteriemiche erano il 33.3%.

Questo dato riflette la tipologia di infezioni in un reparto di medicina non intensivo. Tuttavia, il 13.3% dei pazienti presentava un quadro di sepsi all'esordio e il 40% sepsi grave o shock settico. L'APACHE III score medio era elevato ( $39.1 \pm 19.3$ ), il Charlson Comorbidity Index medio era  $3.8 \pm 2.9$ , riflettendo quindi la complessità dei pazienti con infezione da CR-Kp.

La mediana della durata della terapia è stata di 15 giorni (range tra 7 e 150 giorni); la mediana dei giorni necessari per una risposta clinica e/o microbiologia è stata di 3 giorni (range tra 2 e 15 giorni).

La guarigione dall'infezione è stata ottenuta nell'80% dei casi; si è avuto un solo *exitus*. Se l'associazione tra colistino-resistenza, batteriemia e peggioramento della risposta clinica/microbiologica è nota in letteratura, un dato interessante emerso dal nostro studio è l'associazione tra il numero dei siti di infezione e l'assenza di risposta clinica/microbiologica, suggerendo che quanti più siti sono coinvolti dall'infezione da CR-Kp tanto più la risposta alla terapia è ritardata. Tale dato è stato già sottolineato nello studio di Giannella in cui si affermava che la colonizzazione di più sedi da parte della CR-Kp era il principale fattore predittivo dello sviluppo di infezione sistemica in soggetti già colonizzati a livello rettale.

Dalle analisi che abbiamo condotto *in-vitro*, tutti i ceppi batterici esaminati erano resistenti ai carbapenemi con la metodica semiautomatica VITEK-2 (MIC meropenem >16 µg/mL, MIC ertapenem >8 µg/mL).

Di questi ceppi, 14 sono stati testati con la macrodiluizione in brodo: anche con questa metodica, la totalità dei ceppi risultava resistente ai carbapenemi (MICs 50/90 di meropenem 256/512 µg/mL e di ertapenem 256/256 µg/mL). Tutti i ceppi erano produttori di carbapenemasi del tipo KPC; questo suggerisce e conferma che i ceppi di CR-Kp che circolano in Italia sono produttori di KPC.

Al contrario della metodica semiautomatica, che definisce l'elevata resistenza ai carbapenemi come un valore di MIC  $\geq 16$  µg/mL, la macrodiluizione in brodo, seppur più indaginosa, è in grado di individuare il valore preciso della MIC. Questo è un concetto di fondamentale importanza anche alla luce dei dati di efficacia farmacologica presenti in letteratura. Infatti, per il clinico avere un valore preciso della MIC del

carbapenemico può avere una notevole importanza terapeutica soprattutto nello stabilire il corretto dosaggio del farmaco. I nostri dati dimostrano che, nonostante elevati valori di MIC (ben superiori a 16 µg/mL, individuato recentemente come valore soglia al di sotto del quale l'*outcome* è migliore), il regime del doppio carbapenemico è efficace *in-vivo* e *in-vitro*. Pertanto, sarebbero auspicabili ulteriori studi con la determinazione della MIC mediante la macrodiluizione piuttosto che tramite il solo VITEK. Infatti quest'ultima metodica fornisce un valore  $\geq 16$  µg/mL, ma il valore reale della MIC può variare tra 16 e 512 µg/mL e può essere conosciuto solo con la macrodiluizione in brodo.

Come ci si aspettava, nei ceppi esaminati la resistenza ai carbapenemi si accompagnava alla resistenza anche ad altri antibiotici: il 100% dei ceppi risultava ESBL positivo ed era resistente ai fluorochinoloni (MIC >4 µg/mL). Inoltre il 20% dei ceppi era resistente alla gentamicina, mentre il 53.3% aveva sensibilità intermedia a questo farmaco. Sebbene la CR-Kp ancora conservi la sensibilità agli aminoglicosidi, il riscontro che la MIC sta aumentando potrebbe rappresentare un ulteriore problema poiché limita le opzioni terapeutiche. Altro dato preoccupante è che il 40% dei nostri ceppi era panresistente.

In particolare, la colistino-resistenza crea notevoli problemi di gestione terapeutica. Come già ricordato, recenti dati di letteratura indicano che la resistenza alla colistina in Italia si aggira intorno al 40%. Il presente studio lo conferma: infatti il 53.3% dei ceppi valutati con il VITEK risultavano resistenti.

Il preoccupante aumento della resistenza agli antibiotici che sono stati descritti come parte dei regimi di combinazione contro la CR-Kp (in particolare gli aminoglicosidi e soprattutto la colistina) ha dato vita a ricerche volte a trovare le migliori associazioni terapeutiche. Tra quelle più originali e innovative rientra il doppio carbapenemico.

Il nostro studio ha preso in considerazione 15 pazienti trattati con meropenem + ertapenem; rappresenta una delle prime casistiche sull'uso del doppio carbapenemico, nella quale i dati *in-vivo* sono accompagnati da analisi *in-vitro*.

Abbiamo analizzato *in-vitro* il sinergismo antibiotico sia in modo qualitativo (con la metodica checkerboard) che quantitativo (con le curve di killing).

Con la metodica checkerboard, nel 78.6% dei casi è stato trovato sinergismo (pieno o parziale) tra i due carbapenemi, nel 21.4% dei casi vi era additività. Da notare che in nessun caso vi era antagonismo.

I dati che appaiono più interessanti sono però quelli ottenuti dalle curve di killing; mediante tale metodo è stata valutata sia la batteriocidia che la sinergia della combinazione meropenem + ertapenem a diverse concentrazioni.

E' emerso che alla concentrazione 0.5 x MIC di meropenem + 0.5 x MIC di ertapenem, sebbene in qualche caso si sia verificata batteriocidia nelle prime ore, si è assistito poi a una ricrescita batterica, per cui la batteriocidia a 24 ore è stata solo dell'14.3%. Al contrario, con la combinazione 0.5 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem si è rilevata batteriocidia ai tempi 4, 6, 8 ore rispettivamente del 21.4%, 50%, 50%, che si manteneva a 24 ore nel 57.1% dei casi.

La differenza tra queste due combinazioni in termini di batteriocidia sostiene l'ipotesi che all'interno dell'associazione meropenem + ertapenem un ruolo preminente sia svolto dall'ertapenem, che si comporta come un vero e proprio inibitore suicida. Dai nostri dati sembrerebbe che la batteriocidia ma soprattutto l'abbattimento della conta colonie si ottenga con la concentrazione 1 x MIC di ertapenem, indipendentemente dalla concentrazione di meropenem usata (0.5 x MIC o 1 x MIC di meropenem).

Con la concentrazione 1 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem la batteriocidia ai tempi 2, 4, 6, 8 ore è stata rispettivamente del 7.1%, 35.7%, 64.2%, 78.5%, che saliva all'85.7% a 24 ore. Infine, con la combinazione 2 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem si è verificata batteriocidia ai tempi 4, 6, 8 ore rispettivamente del 35.7%, 57.1%, 85.7% per arrivare al 100% a 24 ore.

Per quanto concerne il sinergismo antibiotico (calcolato a 24 ore con le curve di killing), con la concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 0.5 x MIC di ertapenem si è avuto sinergismo in 2 soli ceppi batterici (14.2%). Con la concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem si è verificato sinergismo nel 78.5% dei casi. Con la combinazione 1 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem il sinergismo è salito fino all'85.7%, per arrivare fino al 100% con la concentrazione 2 x MIC di meropenem + 1 x MIC di ertapenem. Anche questo risultato conferma il ruolo essenziale dell'ertapenem e l'efficacia *in-vitro* della combinazione.

Inoltre, se si paragono i risultati delle curve di killing (quantitativi) con quelli del checkerboard (qualitativi) si nota come in entrambe le metodiche sia assente un effetto antagonista.



Andando poi a verificare la variazione in termini di CFU/mL trattando il ceppo batterico con meropenem o ertapenem singolarmente, è emerso che sia il meropenem che l'ertapenem nelle prime ore riducevano in modo significativo le CFU/mL rispetto al controllo positivo, ma a 24 ore si osservava in tutti i ceppi una ricrescita batterica paragonabile al controllo positivo. Non si sono verificate differenze statisticamente significative nell'attività del meropenem in monoterapia rispetto all'ertapenem in monoterapia ( $p=0.75$ ). Al contrario, con tutte le concentrazioni antibiotiche analizzate di meropenem + ertapenem, si è verificata una significativa riduzione della crescita batterica rispetto al controllo positivo ( $p<0.0001$ ). È importante sottolineare che la concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem provocava una riduzione delle colonie batteriche significativamente maggiore rispetto alla concentrazione 0.5 x MIC meropenem + 0.5 x MIC ertapenem ( $p<0.0001$ ). Dato interessante è che non vi era differenza statisticamente significativa in termini di riduzione della conta colonie tra le combinazioni 1 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem e 0.5 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem ( $p=0.82$ ). Questo conferma che nella terapia con doppio carbapenemico l'ertapenem sembrerebbe avere un ruolo più importante della concentrazione del meropenem: ciò sosterrrebbe il razionale su cui si fonda l'efficacia di tale associazione. A conferma di tale considerazione, abbiamo notato che la concentrazione 2 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem non determinava una significativa riduzione della crescita batterica rispetto alla concentrazione 1 x MIC meropenem + 1 x MIC ertapenem ( $p=0.23$ ).

Pertanto l'utilizzo delle curve di killing nei pazienti con infezione da CR-Kp candidati al trattamento con doppio carbapenemico dovrebbe essere sempre preso in considerazione al fine di individuare quali soggetti possano trarre maggior beneficio dall'uso di tale associazione antibiotica, che nella nostra casistica si è dimostrata efficace *in-vivo* nell'80% dei soggetti trattati.

Dunque i nostri dati confermano come l'associazione meropenem + ertapenem possa avere un ruolo terapeutico di rilievo nell'ambito delle infezioni da CR-Kp, soprattutto in quei casi in cui la colistina non può essere utilizzata per tossicità o resistenza.

Infatti, nonostante l'efficacia delle associazioni contenenti la colistina, bisogna considerare la tossicità di tale farmaco, in particolare a livello renale. La nefrotossicità rappresenta infatti la principale motivazione per sospendere la terapia con colistina. Al contrario, gli effetti avversi della terapia con doppio carbapenemico, per quanto ancora poco conosciuti, sembrano essere minori. Infatti nei nostri pazienti sono stati solo di lieve entità: ipernatriemia e iperkaliemia in 1/15 pazienti (6.7%), crisi epilettiche in 1/15 pazienti, nausea in 1/15 pazienti. Si segnala che il soggetto che ha presentato crisi comiziali era già stato sottoposto a intervento neurochirurgico di craniotomia temporoparietale monolaterale e non aveva ancora riposizionato l'opercolo osseo; inoltre il paziente aveva già presentato crisi epilettiche prima dell'inizio della terapia antibiotica.

In conclusione, con il nostro studio è stato possibile dimostrare l'efficacia *in-vivo* e l'attività *in-vitro* della terapia con il doppio carbapenemico nei pazienti con infezione da CR-Kp, nei quali l'utilizzo della colistina era controindicato per tossicità o resistenza. In

particolare, il trattamento con il doppio carbapenemico risultava efficace anche nei pazienti con sepsi grave o shock settico all'esordio ed era generalmente ben tollerato.

Tali dati incoraggianti da un punto di vista clinico sono stati supportati dalle analisi *in-vitro*, che hanno evidenziato come questa associazione risultasse sinergica e battericida.

Pertanto, come evidente anche dalla letteratura scientifica internazionale, il doppio carbapenemico sta conquistando un ruolo di primo piano nella cura delle infezioni da *K. pneumoniae* multiresistente.

**La terapia con doppio carbapenemico, da solo o in combinazione con la colistina, nel trattamento delle infezioni da *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi (CR-Kp)**

*Journal of Infection*, Jan 2017, 74 (1): 103-106.

Nel presente studio abbiamo valutato l'efficacia clinica e l'attività *in vitro* del regime con doppio carbapenemico (DC), da solo o in combinazione con la colistina, nelle infezioni causate da CR-Kp.

Abbiamo arruolato 32 pazienti consecutivi con infezione da CR-Kp ricoverati nel Dipartimento di Malattie Infettive del Policlinico Umberto I di Roma e all'Istituto Neuromed di Pozzilli in un periodo di 3 anni (2012-2015). Tutti i pazienti, adeguatamente informati, hanno dato il consenso scritto al nostro studio. Essi sono stati suddivisi in due gruppi: i 18 pazienti del gruppo A hanno ricevuto ertapenem + meropenem, mentre i 14 pazienti del gruppo B hanno ricevuto il DC + colistina. Le caratteristiche della popolazione studiata sono riassunte nella Tabella 5.

L'utilizzo delle diverse combinazioni antibiotiche è stato deciso dallo specialista infettivologo in base alle condizioni cliniche del paziente, alla funzionalità renale e alla sensibilità del ceppo batterico.

La risposta precoce alla terapia è stata definita come risoluzione di segni e sintomi in quinta giornata di terapia antibiotica; il follow up è durato 60 giorni.

Caratteristiche	Gruppo A (n=18)	Gruppo B (n=14)	p-value
<b>Caratteristiche demografiche</b>			
• Et� (anni), M $\pm$ DS	55.6 $\pm$ 13.6	54.4 $\pm$ 17.5	0.74
• Sesso (M:F)	14:4	9:5	0.45
• APACHE III score, M $\pm$ DS	50.7 $\pm$ 28.1	83.2 $\pm$ 20.3	0.001
• $\geq 2$ comorit�	5 (27.7%)	9 (64.2%)	0.07
<b>Modalit� acquisizione infezione e fattori di rischio (ultimi 12 mesi), n (%)</b>			
• HCA:HA	6:12	0:14	0.0001
• Durata ospedalizzazione in HA, giorni <sup>Ω</sup>	14 (2-65)	23 (5-437)	0.005
• Ospedalizzazione (ultimi 12 mesi)	15 (83.3)	7 (50)	0.02
• Intensive Care Unit	10 (55.5)	12 (85.7)	0.06
• Catetere vescicale	12 (66.6)	6 (42.8)	0.12
• Catetere venoso centrale	9 (50)	2 (14.2)	0.28
<b>Fattori di rischio (ultime 72 ore), n (%)</b>			
• Sondino naso-gastrico	6 (33.3)	12 (85.7)	0.004
• Fibrobroncoscopia	4 (22.2)	10 (71.4)	0.01
• Nutrizione parenterale	4 (22.2)	10 (71.4)	0.01
• Catetere venoso centrale	7 (38.8)	13 (92.8)	0.002
<b>Antibioticoterapia negli ultimi 90 giorni, n (%)</b>			
• Beta lattamici	15 (83.3)	14 (100)	0.23
• Carbapenemi	13 (72.2)	14 (100)	0.05
• Fluorochinoloni	6 (33.3)	9 (64.2)	0.45
• Fluorochinoloni	5 (27.7)	5 (35.7)	0.71
• Colistina	4 (22.2)	5 (35.7)	0.45
<b>Presentazione clinica, n (%)</b>			
• Sepsi	3 (16.6)	2 (14.2)	0.99
• Sepsi grave o shock settico	9 (50)	12 (85.7)	0.99
• Sede infezione	8 VU, 2 EV, 4 P	1 VU, 1 EV, 5 P, 6 CVC	0.99
• Batteriemia primaria	4 (22.2)	2 (14.2)	0.67
• Infezioni d'organo batteriemiche	8 (44.4)	10 (71.4)	0.16
<b>Colonizzazione rettale da CR-Kp, n (%)</b>			
	13/14 (92)*	14 (100)	0.37
<b>Resistenza alla colistina, n (%)</b>			
	8 (44.4)	3 (21.4)	0.26
<b>Terapia</b>			
• Durata terapia mirata (giorni) <sup>Ω</sup>	18.5 (7-150)	25 (7-34)	0.04
• Risposta clinica (giorni) <sup>Ω</sup>	4 (2-15)	4 (3-12)	0.68
• Risposta microbiologica (giorni) <sup>Ω</sup>	3 (2-17)	5 (3-10)	0.43
• Effetti avversi, n (%)	3 (16.6%)	3 (21.4)	1
<b>Outcome a 60 giorni, n (%)</b>			
• <i>Exitus</i>	3 (16.6)	3 (21.4)	0.99
• Recidiva	2 (11.1)	0	0.49
• Guarigione	13 (72.2)	11 (78.5)	0.89

Tabella 5. Caratteristiche della popolazione studiata.

M: media. DS: deviazione standard. HCA: health care associated. HA: hospital acquired. VU: vie urinarie. EV: endoprotesi vascolari. P: polmone. CVC: catetere venoso centrale.

\* 4/18 tamponi rettali non disponibili. <sup>Ω</sup> Valori espressi in mediana (range).

Oltre agli esami microbiologici utilizzati nella pratica clinica quotidiana, sono stati condotti studi *in vitro* aggiuntivi tra cui la determinazione fenotipica delle carbapenemasi e le curve di killing per valutare il sinergismo delle combinazioni MEM + ERT e COL + MEM + ERT. Nella tripla combinazione abbiamo deciso di ridurre la concentrazione del meropenem piuttosto che della colistina o dell'ertapenem poiché in presenza di alte MIC per meropenem (molto al di sopra della concentrazione raggiungibile dal farmaco) c'era una più alta probabilità di ottenere la concentrazione sierica del MEM con 0.5 x MIC e 0.25 x MIC piuttosto che con 1 x MIC. E' stata calcolata l'area sotto la curva (AUC) di ogni combinazione, espressa come media  $\pm$  deviazione standard. Il numero di CFU/mL è stato espresso come media  $\pm$  errore standard della media (SEM).

Per l'analisi statistica abbiamo usato GraphPad Prism versione 5 (Graphpad Software MacKiev).

Considerando i pazienti di entrambi i gruppi, la guarigione è stata ottenuta nel 75% dei casi. La tripla terapia è stata utilizzata più frequentemente in pazienti in gravi condizioni cliniche (sepsi severa, shock settico, ecc). Non è stata evidenziata alcuna differenza statisticamente significativa nella percentuale di guarigione e mortalità tra i due gruppi presi in esame.

Le MIC 50/90 di meropenem ed ertapenem con la macrodiluizione in brodo erano in entrambi i casi 128/256  $\mu\text{g/mL}$ .

Tutti i ceppi batterici erano produttori di KPC.

Le curve di killing sono state effettuate su 28 ceppi di CR-Kp (16 del gruppo A e 12 del gruppo B) poiché 4 ceppi non erano disponibili. I risultati sono mostrati nelle Figure 5 e 6.

Nel gruppo A l'attività battericida di 1 x MIC MEM + 1 x MIC ERT è stata osservata in 12/16 casi (75%) a 8 ore e 14/16 (87.5%) a 24 ore. Nel gruppo B 1 x MIC COL + 1 x MIC MEM + 1 x MIC ERT ha mostrato una più rapida attività battericida (8/12 *versus* 6/12 a 8 ore) e questo effetto è stato confermato anche a concentrazioni sub-inibitorie dei farmaci. Inoltre la tripla combinazione era battericida a 24 ore con tutte le concentrazioni testate. E' interessante notare che l'effetto battericida è stato confermato anche in presenza di MIC per la colistina  $\geq 2$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Nel presente studio abbiamo arruolato pazienti trattati con due tipi di terapia antibiotica non convenzionale. Dalle analisi *in vitro* è emerso che l'aggiunta della colistina al regime con DC conduce a una rapida attività battericida, che si mantiene a 24 ore. Si sottolinea che l'attività di questa combinazione è stata osservata anche con concentrazioni sub-inibitorie dei farmaci senza differenze statisticamente significative nelle AUCs delle concentrazioni testate.

Basandosi sui nostri risultati, l'aggiunta della colistina al DC potrebbe essere utile nell'indurre una precoce attività antibatterica rispetto al DC da solo. Tale considerazione potrebbe essere cruciale nelle infezioni più gravi, in cui un rapido effetto battericida è auspicabile per migliorare l'*outcome* del paziente, anche quando la presenza di colistino-resistenza scoraggia il suo utilizzo. I nostri risultati farebbero ipotizzare che iniziare con una terapia aggressiva (COL + MEM + ERT) passando

successivamente a un regime meno tossico (per esempio il DC) potrebbe essere un'opzione terapeutica ragionevole nelle infezioni sistemiche da CR-Kp.

Inoltre i nostri esperimenti hanno mostrato che anche in presenza di alte MIC per la colistina ( $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ ) la combinazione di COL + MEM + ERT è altamente efficace. In particolare tutti i pazienti con ceppi colistino-resistenti sono guariti. In questi casi la proprietà detergente della colistina potrebbe avere un ruolo fondamentale nel facilitare la penetrazione di altri farmaci nei batteri.

Questi dati confermano precedenti osservazioni sull'attività sinergica di combinazioni contenenti colistina, anche (e soprattutto) nei ceppi colistino-resistenti.

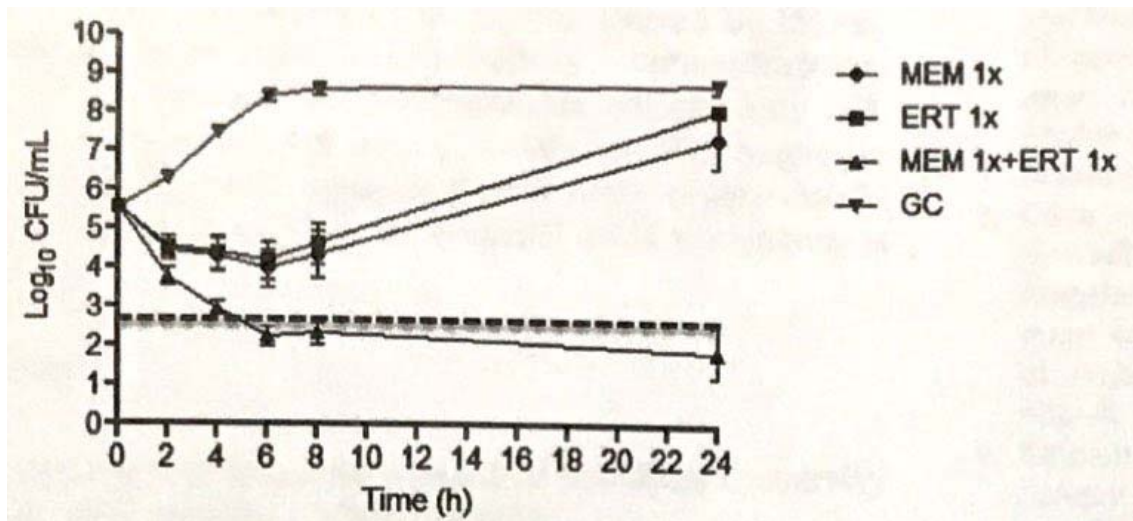
E' noto infatti che la colistina esercita un'azione detergente sulla parete batterica dei Gram negativi: alterando la permeabilità della parete permette al farmaco a cui è associata di penetrare nel batterio così da saturare gli enzimi che idrolizzano gli antibiotici e di esplicare la sua azione antibatterica. Tale azione si manifesta anche in caso di resistenza del batterio alla colistina stessa, e permette anche ad antibiotici normalmente non attivi contro i Gram negativi (come la rifampicina) di esplicare un'azione antibatterica. Su queste premesse si basano le recenti indicazioni per cui la rifampicina associata alla colistina è indicata per l'*Acinetobacter* o può far parte di combinazioni antibiotiche per la CR-Kp. Si sta ipotizzando che la colistina possa essere utilizzata anche in associazione alla vancomicina per l'*Acinetobacter*.

Una delle caratteristiche più importanti del nostro studio è la presenza di risultati soddisfacenti sia *in vivo* che *in vitro*. Poiché recentemente i comuni test per valutare la sensibilità batterica agli antibiotici non sembrano più essere sufficienti, riteniamo che



gli studi di sinergia *in vitro* potrebbero rappresentare un utile strumento aggiuntivo per guidare le decisioni del clinico e predire la potenziale efficacia clinica della combinazione antibiotica scelta.

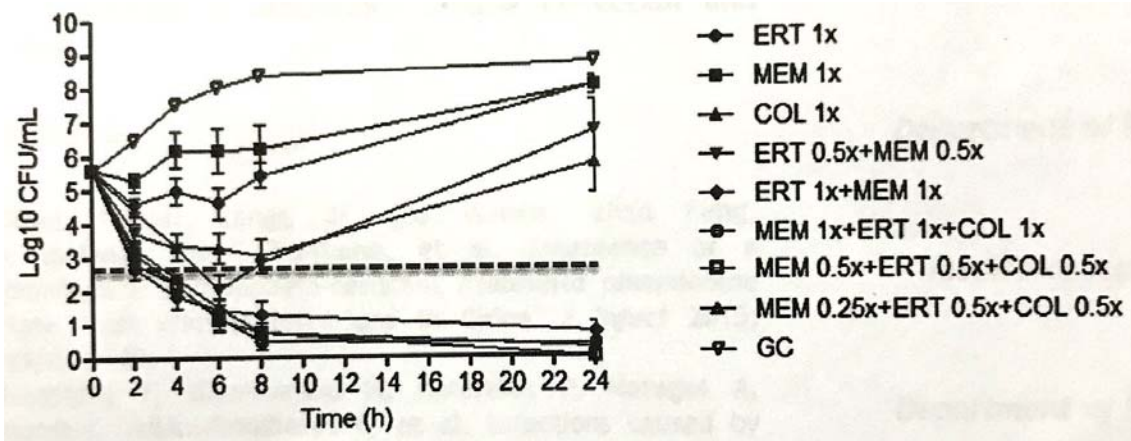
In conclusione, siamo stati in grado di dimostrare che il regime con doppio carbapenemico, da solo o associato alla colistina, è efficace nel trattamento delle infezioni da CR-Kp sia dal punto di vista clinico che microbiologico. Il DC associato alla colistina risulta efficace anche a concentrazioni sub-inibitorie dei farmaci. Il DC da solo può essere una valida opzione terapeutica nei casi in cui la colistina risulta poco indicata (pazienti con insufficienza renale per esempio), mentre la combinazione MEM + ERT + COL può essere particolarmente utile nei soggetti in condizioni cliniche gravi (pazienti in shock settico per esempio), quando una precoce risposta clinica è fondamentale.



DC group (n=18)*	Bactericidal activity <sup>a</sup> (2h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (4h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (6h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (8h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (24h), n (%)	Synergistic activity <sup>b</sup> (24h), n (%)	AUC, mean ± SD**
1xMICMEM+1xMICERT	1 (6.2)	5 (31.2)	8 (50)	12 (75)	14 (87.5)	14 (87.5)	59.9±25.5

\*: killing studies were performed on 16 strains. \*\*: AUC of GC (growth control) was 199.4±11.7.

Figura 5. Risultato delle curve di killing dei 16 ceppi di CR-Kp dei pazienti del gruppo A. I valori sono espressi come media ± SEM. ERT: ertapenem. MEM: meropenem. AUC: area under the curve. GC: growth control. DC: doppio carbapenemico.



DC+COL group (n=14)*	Bactericidal activity <sup>a</sup> (2h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (4h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (6h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (8h), n (%)	Bactericidal activity <sup>a</sup> (24h), n (%)	Synergistic activity <sup>b</sup> (24h), n (%)	AUC, mean ± SD**
0.5xMIC MEM +0.5xMIC ERT	0	1 (8.3)	4 (33.3)	6 (16.6)	2 (16.6)	2 (16.6)	103±29.1
1xMIC MEM +1xMIC ERT	4 (33)	6 (50)	10 (83.3)	10 (83.3)	11 (91.6)	11 (91.6)	34.9±25.4 <sup>§</sup>
1xMIC MEM+1xMIC ERT+1xMIC COL	4 (33)	8 (66.6)	9 (75)	12 (100)	12 (100)	n.a.	25.6±18.7 <sup>§</sup>
0.5xMICMEM+0.5xMIC ERT+0.5xMIC COL	2 (16.6)	8 (66.6)	8 (66.6)	11 (91.6)	12 (100)	n.a.	25.2±12.6 <sup>§</sup>
0.25xMICMEM+0.5xMIC ERT+0.5xMIC COL	2 (16.6)	9 (75)	11 (91.6)	11 (91.6)	12 (100)	n.a.	28.7±15.5 <sup>§</sup>

\*: killing studies were performed on 12 strains. <sup>a</sup>: the difference among tested concentrations were not statistically significant. \*\*AUC of GC (growth control) was 195.9±6.9.

Figura 6. Risultato delle curve di killing dei 12 ceppi di CR-Kp dei pazienti del gruppo B. I valori sono espressi come media ± SEM. ERT: ertapenem. MEM: meropenem. AUC: area under the curve. GC: growth control. DC: doppio carbapenemico. COL: colistina.

**Case report: infezione batteriemica severa causata da *Escherichia coli* produttrice di KPC in paziente sottoposta a trapianto renale trattata con il doppio carbapenemico e test di sinergia *in vitro***

*Medicine*, 2016 Feb; 95 (7).

## **INTRODUZIONE**

I soggetti che ricevono un trapianto sono ad alto rischio di infezioni causate da microrganismi multiresistenti ai farmaci (MDR: multidrug resistant) a causa dei molteplici contatti con strutture sanitarie prima e dopo il trapianto e della necessità di terapia immunosoppressiva per tutta la vita. Il rischio di infezioni cambia a seconda del tempo trascorso dal trapianto ed in funzione dello stato immunitario del soggetto. Infatti i pazienti in attesa di trapianto possono subire una colonizzazione da parte di germi nosocomiali e successivamente sviluppare infezioni sistemiche dovute a questi patogeni aggressivi precocemente dopo il trapianto.

Come già ampiamente discusso in questa tesi, la diffusione di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE) o panresistenti rappresenta una grande sfida per il clinico. In questo preoccupante quadro, l'approccio innovativo costituito dalla terapia con doppio carbapenemico si è dimostrato efficace contro la *Klebsiella pneumoniae* produttrice di carbapenemasi. In questo case report, descriviamo un caso di infezione

batteriemica causato da un ceppo di *Escherichia coli* produttore di carbapenemasi in una paziente sottoposta a trapianto renale trattata con il DC.

## CASE REPORT

Una donna di 61 anni con rene unico congenito aveva iniziato l'emodialisi nel 2004 per insufficienza renale terminale. Nel Luglio 2014 era stata sottoposta a trapianto renale da donatore cadavere. Nello stesso intervento aveva anche subito il posizionamento di uno stent ureterale e un'endoarteriectomia dell'arteria iliaca sinistra per una grave stenosi. Il decorso post-operatorio era stato complicato da un linfocele peri-renale e da un sanguinamento dell'arteria iliaca sinistra. La paziente assumeva terapia immunosoppressiva con tacrolimus, la cui concentrazione sierica veniva monitorata regolarmente. In X giornata post-operatoria la paziente iniziò ad avere febbre con cuspidi fino a 38.5°C preceduta da brivido, dispnea e dolore alla palpazione dei quadranti addominali inferiori. La lastra del torace mostrò la presenza di addensamenti polmonari bilaterali e la coltura del lavaggio broncoalveolare (BAL) era positiva per *Stenotrophomonas maltophilia* e *Escherichia coli* sensibile a tutti gli antibiotici testati. La TC dell'addome dimostrò un ematoma prevescicale (9 x 5 x 7 cm) che richiese il posizionamento di un drenaggio. Il DNA del Cytomegalovirus (CMV) era 44400 copie/mL (limite di rilevazione <200 copie/mL). In base alla clearance della creatinina (37 mL/min) e all'antibiogramma, fu instaurata una terapia con meropenem (MEM) 1 g

ogni 12 ore, trimetoprim/sulfametossazolo (TMP/SMX) 320/1600 mg diviso ogni 8 ore e levofloxacin 750 mg ogni 48 ore con risposta clinica (defervescenza) e radiologica (risoluzione degli addensamenti polmonari). Inoltre fu iniziata una terapia endovenosa con ganciclovir 150 mg ogni 24 ore con rapida soppressione della viremia del CMV.

Tuttavia in XXII giornata post-operatoria la paziente divenne nuovamente febbrile con cuspidi fino a 39°C; all'esame obiettivo risultava in condizioni generali mediocri e con sensorio obnubilato. Gli esami ematochimici mostravano: globuli bianchi 6820 cellule/mmc (valori di riferimento 4000-10000) con 86% di neutrofili (40-70%), urea 52.7 mg/dL (12-25), creatinina 1.4 mg/dL (0.4-1.0), proteina C-reattiva 84000 µg/L (0-6000), VES 72 mm/h (0-20). La lastra del torace rivelò la presenza di un nuovo addensamento polmonare. Nel sito del recente drenaggio addominale era presente secrezione purulenta. L'urinocoltura risultò negativa mentre venne isolata *E. coli* resistente ai carbapenemi (CRE) in due emocolture, nel BAL e nel liquido del drenaggio addominale (l'antibiogramma è riportato nella tabella 6). Fu dunque posta diagnosi di infezione del sito chirurgico e polmonite nosocomiale con concomitante batteriemia causata da *E. coli* MDR. Sebbene il ceppo batterico fosse sensibile agli aminoglicosidi e alla colistina, la paziente era considerata ad alto rischio di nefrotossicità iatrogena. Pertanto, in accordo con la clearance della creatinina (32 mL/min), fu iniziata la terapia con ERT 500 mg ogni 24 ore (infuso in un'ora) seguito da MEM 2 g ogni 12 ore (infuso in 3 ore) senza effetti collaterali. La paziente, dopo essere stata adeguatamente informata, diede il consenso scritto a tale approccio terapeutico non convenzionale. Dopo 96 ore della suddetta terapia, le condizioni cliniche della paziente erano

migliorate e non vi era più febbre. Tre emocolture e la coltura del liquido di drenaggio risultarono sterili. Purtroppo si verificò però un'ostruzione meccanica dello stent ureterale e una perdita a livello dell'anastomosi tra vescica e uretere sinistro. Il valore della creatinina salì a 2.4 mg/dL e l'urea a 78.6 mg/dL, quindi fu necessario effettuare una nefrostomia percutanea. Tre giorni dopo la paziente peggiorò improvvisamente: la pressione arteriosa era 70/40 mm Hg, la frequenza cardiaca era 130 battiti/min, la frequenza respiratoria 35 atti/min, i globuli rossi risultavano 2900000 cellule/mmc (valori di riferimento 4000000 – 5400000) e l'emoglobina 6.5 g/dL (11-14). Gli esami radiologici rivelarono un massivo sanguinamento a livello dell'anastomosi chirurgica. Nonostante il trattamento con vasopressori e inotropi, la paziente morì in XXXI giornata post-operatoria. Uno schema riassuntivo del caso è rappresentato nella figura 7.

Le concentrazioni minime inibenti (MIC) di ERT e MEM furono determinate con il metodo della macrodiluzione in brodo in terreno di Mueller-Hinton. Fu inoltre effettuata la determinazione fenotipica della carbapenemasi e lo studio molecolare. L'attività di MEM e ERT, da soli e in combinazione, fu poi studiata con le curve di killing usando un inoculo iniziale di circa  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Il numero di CFU fu poi contato a 2, 4, 6, 8 e 24 ore. Furono testate le seguenti concentrazioni antibiotiche: 1 x MIC ERT, 1 x MIC MEM, 2 x MIC MEM, 0.5 x MIC MEM + 0.5 x MIC ERT, 0.5 x MIC MEM + 1 x MIC ERT, 1 x MIC MEM + 1 x MIC ERT, 2 x MIC MEM + 1 x MIC ERT. Fu definito sinergico l'effetto di un aumento dell'uccisione batterica superiore di 2 logaritmi<sub>10</sub> (100 volte) nelle 24 ore e battericida l'effetto dell'associazione antibiotica se l'uccisione batterica era superiore di 3 logaritmi<sub>10</sub> (1000 volte) nelle 24 ore.

Le MIC per ERT e MEM erano rispettivamente 16 e 32 µg/mL. Le analisi fenotipiche e molecolari dimostrarono che il ceppo batterico era produttore di KPC.

Con le curve di killing, sebbene si verificò un'iniziale riduzione delle CFU, si assistette poi ad una ricrescita batterica a 24 ore con le concentrazioni 1 x MIC MEM e (in misura minore) 1 x MIC ERT; al contrario 2 x MIC MEM provocò assenza di crescita a 24 ore. Quando fu testata la combinazione col doppio carbapenemico, l'attività battericida fu raggiunta a 4, 6, 8 ore e mantenuta a 24 ore con assenza di crescita batterica con tutte le concentrazioni antibiotiche considerate.

<b>Antibiotico</b>	<b>MIC (µg/mL)</b>	<b>Antibiotico</b>	<b>MIC (µg/mL)</b>
Amikacina	8	Ertapenem	≥ 8 (16)
Amox/Clavul	≥ 64	Fosfomicina	≥ 25
Cefepime	≥ 64	Gentamicina	≤ 1
Cefotaxime	≥ 64	Meropenem	> 16 (32)
Ceftazidime	≥ 64	Piper/Tazobactam	≥ 16
Ciprofloxacina	≥ 4	Tigeciclina	4
Colistina	<0.5	TMP/SMX	> 320

Tabella 6. MIC di *Escherichia coli* KPC+ ottenute con la metodica VITEK-2. I valori tra parentesi si riferiscono alle MIC ottenute con la macrodiluizione in brodo.



		2004	Insufficienza renale terminale
		2014	Trapianto da cadavere Stent ureterale Endoarteriectomia A. iliaca sx
		II giorno PO	Linfocele perirenale Sanguinamento A. iliaca sx
Meropenem + TMP/SMX + Levofloxacina	BAL: <i>S. maltophilia</i> , <i>E. coli</i>  BAL: negativo	X giorno PO	Febbre, dispnea Addensamenti polmonari bilat. Ematoma prevescicale – drenaggio
		XVII giorno PO	Defervescenza RX torace negativo
		XXII giorno PO	Febbre, sensorio obnubilato Addensamento polmonare sx Secrezione purulenta drenaggio
Doppio carbapenemico	Emocolture (2), BAL, drenaggio: <i>E. Coli</i> KPC+  Emocolture (3), drenaggio: negativi	XXIV giorno PO	Defervescenza
		XXVIII giorno PO	Afebrile RX torace negativo
		XXXI giorno PO	Afebrile Ostruzione stent – nefrostomia Sanguinamento massivo <i>Exitus</i>

Figura 7. Schema riassuntivo del case report. PO: post-operatorio.

## DISCUSSIONE

Il presente case report è il primo in letteratura riguardante un'infezione batteriemica grave causata da *E. coli* produttrice di KPC in una paziente sottoposta a trapianto renale trattata con il regime del doppio carbapenemico, la cui efficacia è stata dimostrata con studi *in vitro*.

Negli ultimi anni la diffusione di CRE sta diventando molto preoccupante considerati gli alti livelli di resistenza a molteplici classi di antibiotici. Sebbene diversi meccanismi possano provocare resistenza ai carbapenemi, la causa principale dell'aumento delle CRE è la diffusione della *K. pneumoniae* produttrice di carbapenemasi. Recenti dati epidemiologici riguardanti l'emergenza di gravi infezioni da *E. coli* produttrice di KPC suggeriscono che possa avvenire il trasferimento orizzontale di geni blaKPC tra le *Enterobacteriaceae* che colonizzano l'intestino dell'uomo.

Nei soggetti che hanno ricevuto un trapianto l'impatto di infezioni causate da batteri Gram negativi MDR, che solitamente avvengono nel primo mese post-operatorio, è molto preoccupante a causa dell'alto tasso di mortalità. Inoltre le opzioni terapeutiche sono limitate poiché gli antibiotici possono provocare tossicità o avere interazioni con gli agenti immunosoppressivi. In questo difficile scenario, che sembra essere ancora più complicato dall'aumento del tasso di colistino-resistenza delle CRE, sono stati proposti approcci innovativi, tra cui il regime con doppio carbapenemico, come valida opzione terapeutica nelle infezioni gravi causate da *K. pneumoniae* KPC+.

Nel presente case report, il ceppo batterico era sensibile *in vitro* sia alla colistina che agli aminoglicosidi. Tuttavia, sebbene in presenza di infezioni gravi causate da batteri MDR la potenziale nefrotossicità di questi farmaci non rappresenti una controindicazione assoluta dato il regolare monitoraggio della funzionalità renale e l'aggiustamento della dose in base ad essa e data un'adeguata idratazione, nel nostro caso l'utilizzo di colistina e aminoglicosidi fu considerato troppo rischioso. La paziente fu dunque ritenuta eleggibile per l'innovativo approccio terapeutico col doppio carbapenemico.

Nonostante le MIC elevate per ERT e MEM, i nostri studi *in vitro* dimostrarono che la combinazione ERT + MEM aveva attività sinergica e battericida contro l'*E. coli* KPC+. In particolare la combinazione 0.5 x MIC MEM + 1 x MIC ERT risultò altamente battericida suggerendo che anche concentrazioni sub-inibitorie di MEM (16 µg/mL, che poteva essere raggiunta nel siero dopo l'infusione lenta di alte dosi di MEM) potrebbero essere sufficienti per esercitare l'attività antibatterica.

Il razionale dell'utilizzo del regime con doppio carbapenemico è basato sull'alta affinità delle carbapenemasi per l'ertapenem, che lega tali enzimi permettendo all'altro carbapenemico di agire. Inoltre dati recenti supportano l'ipotesi che alte dosi di carbapenemi potrebbero dare adeguate concentrazioni sieriche tali da raggiungere il loro target farmacocinetico anche contro batteri produttori di carbapenemasi. Sebbene nel nostro caso alte concentrazioni di MEM da solo (2 x MIC, 64 µg/mL) avessero *in vitro* un effetto battericida simile alla combinazione 0.5 x MIC MEM + 1 x MIC ERT, abbiamo potuto dedurre che, dopo l'infusione lenta di alte dosi di MEM, la

concentrazione sierica del MEM è probabilmente più vicina a 16 µg/mL piuttosto che a 64 µg/mL, che corrispondono rispettivamente alle concentrazioni 0.5 x MIC MEM e 2 x MIC MEM *in vitro*.

Nel nostro caso il regime col doppio carbapenemico risultò efficace sia dal punto di vista clinico (defervescenza) che microbiologico (negativizzazione delle emocolture e della coltura del drenaggio a 96 ore). Il presente studio ha ovviamente alcune limitazioni. Innanzitutto l'inclusione del MEM nel trattamento dell'infezione causata da *S. maltophilia* e da *E. coli* pan-sensibile potrebbe avere contribuito allo sviluppo di resistenza ai carbapenemi. Inoltre, sebbene l'*outcome* clinico fu favorevole con rapida risoluzione della batteriemia, la paziente morì 9 giorni dopo la diagnosi per altre cause. Pertanto non fu possibile valutare l'andamento dell'infezione a medio e lungo termine.

In conclusione il presente studio ha dimostrato l'efficacia della terapia con doppio carbapenemico in una paziente sottoposta a trapianto renale e con una grave infezione batteriemia da *E. coli* KPC+. Questo approccio non convenzionale potrebbe essere considerato come terapia di salvataggio in quei soggetti in cui altre combinazioni antibiotiche falliscono o quando si preferisce non utilizzare la colistina. Infine questo caso evidenzia che fare test di sinergia *in vitro* rappresenta un'utile strategia per selezionare la migliore combinazione antibiotica, specialmente nei casi di infezioni in individui ad alto rischio come i soggetti trapiantati.

## CONCLUSIONI

Con il nostro studio è stato possibile dimostrare l'efficacia *in-vivo* e l'attività *in-vitro* della terapia con il doppio carbapenemico nei pazienti con infezione da CR-Kp, nei quali l'utilizzo della colistina era controindicato per tossicità o resistenza. I dati clinici sono stati supportati dalle analisi *in-vitro*, che hanno evidenziato come questa associazione risulti sinergica e battericida.

Siamo inoltre stati in grado di dimostrare che il regime con doppio carbapenemico associato alla colistina risulta efficace anche a concentrazioni sub-inibitorie dei farmaci. Il DC da solo può essere una valida opzione terapeutica nei casi in cui la colistina risulta poco indicata, mentre la combinazione MEM + ERT + COL può essere particolarmente utile nei soggetti in condizioni cliniche gravi, quando una precoce risposta clinica è fondamentale.

Il nostro case report ha invece dimostrato l'efficacia della terapia con DC in una paziente sottoposta a trapianto renale e con una grave infezione batteriemia da *E. coli* KPC+. Questo approccio non convenzionale potrebbe essere considerato come terapia di salvataggio in quei soggetti in cui altre combinazioni antibiotiche falliscono o quando si preferisce non utilizzare la colistina. Infine questo caso evidenzia che fare test di sinergia *in-vitro* rappresenta un'utile strategia per selezionare la migliore combinazione antibiotica, specialmente nei casi di infezioni in individui ad alto rischio come i soggetti trapiantati.

## BIBLIOGRAFIA

1. A Cano, J Torre-Cisneros et al. Risks of infection and mortality among patients colonized with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: validation of scores and proposal for management. Clin Infect Dis, 2018, 66: 1204-1210.
2. RA Bonomo, LF Westblade et al. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge. Clin Infect Dis, 2018, 66: 1290-1296.
3. M Giannella, EM Treccarichi et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. Clin Microbiol Infect 2014; 20: 1357-62.
4. B Gutierrez-Gutierrez, E Salamanca et al. Investigators from the REIPI/ESGBIS/INCREMENT group. A predictive model of mortality in patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Mayo Clin Proc 2016; 91: 1362-71.
5. JA Ramos-Castaneda, EV Lemos-Luengas et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: systematic review and meta-analysis. J of Infection 2018 (76): 438-448.
6. M Tumbarello, P Viale et al. Efficacy of ceftazidime-avibactam salvage therapy in patients with infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Clin Infect Dis, 9 June 2018.
7. I Machuca, J Torre-Cisneros et al. Mortality associated with bacteremia due to colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* with high level meropenem resistance:

importance of combination therapy without colistin and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2017: Vol 61, Issue 8.

8. J Rodriguez-Bano, A Pascual et al. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microb Reviews*, 2018: Vol 31, Issue 2.

9. L Xu, X Sun, X Ma. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2017; 16: 18.

10. M Tumbarello, P Viale, M Bassetti et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infec Dis*, 2012, 55 (7): 943-50.

11. ZA Qureshi, Y Doi et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012: 2108-2113.

12. GL Daikos and A markogiannakis. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect*, 2011; 17: 1135-1141.

13. M Tumbarello, P Viale et al. Predictive models for identification of hospitalized patients harboring KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014: 3514-3520.

14. A Oliva, V Vullo et al. Therapeutic strategy for pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* severe infections: short-course treatment with colistin increases the *in vivo*

and *in vitro* activity of double carbapenem regimen. Intern J Infect Dis 33 (2015) 132-134.

15. A Oliva, V Vullo et al. Synergistic activity and effectiveness of a double carbapenem regimen in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. J Antimicrob Chemother, 2014: 1718-1720.

16. M Giannella, M Tumbarello et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection among rectal carriers: a prospective observational multicentre study. Clin Microbiol Infect, Dec 2014; 20 (12): 1357-1362.

17. G Ceccarelli, M Venditti et al. Successful ertapenem-doripenem combination treatment of bacteremic ventilator-associated pneumonia due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, June 2013: 2900-2901.

18. GL Daikos, A Skoutelis et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. Antimicrobial agents and chemotherapy, Feb 2014: 2322-8.

19. M Tumbarello, P Viale et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: differences in therapy and mortality in a multicentre study. J Antimicrob Chemother, Apr 2015.

20. KK Perez, JM Musser et al. Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. J Infect, 2014 (69): 216-225.



21. A Capone, N Petrosillo et al. High rate of colistin-resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect, Jan 2013; 19 (1): E 23-30.
22. GB Orsi, M Venditti et al. Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients. J Hosp Infect, May 2011; Vol 78, Issue 1: 54-58.
23. LB Rice. Emerging issues in the management of infections caused by multidrug-resistant gram-negative bacteria. Cleveland Clin J of Med, Aug 2007; Vol 74, Suppl 4.
24. PP Cook and M Gooch. Long-term effects of an antimicrobial stewardship programme at a tertiary-care teaching hospital. Int J Antimicrob Agents, Mar 2015; 45 (3): 262-7.
25. MJD Dautzenberg, LPG Derde et al. The association between colonization with carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and overall ICU mortality: an observational cohort study. Critical Care Medicine, Jun 2015; 43 (6): 1170-1177.
26. C Tascini, F Menichetti et al. Oral gentamicin gut decontamination for prevention of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: relevance of concomitant systemic antibiotic therapy. AAC 2014; 58:1972.
27. N Girometti, P Viale et al. *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. Medicine (Baltimore), Oct 2014; 93 (17): 298-309.
28. K Bush and GA Jacoby. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy, Mar 2010: 969-976.

29. K Bush. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin in Micorbiol*, 2010, 13: 558-564.
30. MJ Satlin, DP Calfee et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* from urine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Dec 2011: 5893-99.
31. SM Garonzik, RL Nation et al. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, Jul 2011; 55 (7): 3284-3294.
32. BA Cunha. Pharmacokinetic considerations regarding tigecycline for MDR *K. pneumoniae* or MDR *A. baumannii* urosepsis. *J Clin Microb*, May 2009: 1613.
33. E Evren, H Arslan et al. In vitro activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48-positive *K. pneumoniae* strains. *Diag Microb and Inf Dis*, 76 (2013): 335-338.
34. JC Pereira and P Pova. Antibiotics in critically ill patients: a systematic review of the pharmacokinetics of beta-lactams. *Critical Care*, 2011, 15: R206.
35. M Akova, Y Carmeli et al. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18: 439-448.
36. C Girmenia, A Rambaldi et al. Management of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in stem cell transplant recipients: an Italian multidisciplinary consensus statement. *Haematologica*, 10 Apr 2015.

37. M Giannella, P Viale et al. Risk factors for infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* after liver transplantation: the importance of pre- and post-transplant colonization. *Am J Transplant*, 4 Mar 2015.
38. DE Wiskirchen, JL Kuti et al. In vitro pharmacodynamics of simulated pulmonary exposures of tigecycline alone and in combination against *K. pneumoniae* isolates producing a KPC carbapenemase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011, 55 (4): 1420.
39. KS Thomson. Double-carbapenem therapy not proven to be more active than carbapenem monotherapy against KPC-positive *K. pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, 56 (7): 4037.
40. F Sbrana, F Menichetti et al. Carbapenem-sparing antibiotic regimens for infections caused by *K. pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit. *Clin Infect Dis*, 2013, 56 (5): 697-700.
41. M Papadimitriou-Olivgeris, M Christofidou et al. Association of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection with *Candida* isolation and selection of non-albicans species. *Diagn Microbiol and Infect Dis*, 80 (2014), 227-232.
42. ZZ Deris, RL Nation et al. Combination of colistin and doripenem is synergistic against *K. pneumoniae* at multiple inocula and suppresses colistin resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, 56 (10): 5103-12.
43. YM Ah, AJ Kim and JY Lee. Colistin resistance in *K. pneumoniae*. *Intern J Antimicrob Agents*, 2014, 44: 8-15.

44. D Bates, JM Bugar et al. Tigecycline treatment of urinary tract infection and prostatitis: case report and literature review. *C J H P*, 2012, Vol 65, n 3.
45. C Vidailiac, L Benichou and RE Duval. *In vitro* synergy of colistin combination against colistin-resistant *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2012, 56 (9): 4856.
46. S Jaruratanasirikul et al. Comparison of the pharmacodynamics of meropenem in patients with ventilator-associated pneumonia following administration by 3-hour infusion or bolus injection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005, 1337-9.
47. P Nordmann, V Miriagou et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*, 2012, 18: 432-438.
48. CC Bulik and DP Nicolau. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011, 55 (6): 3002.
49. LS Munoz-Price, JP Quinn et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *K. pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13: 785-796.
50. C Tascini, F Menichetti et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant KPC-producing *K. pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, 57 (8): 3990-3993.
51. CG Giske, N Woodford et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *K. pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17: 552-556.

52. KC Claeys, MJ Rybak et al. A review of novel combinations of colistin and lipopeptide or glycopeptide antibiotics for the treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infect Dis Ther*, Dec 2014; 3 (2): 69-81.
53. N Petrosillo, M Akova et al. Clinical experience of colistin-glycopeptide combination in critically ill patients infected with Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014; 58 (2): 851-858.
54. TD Huang, Y Glupczynski et al. *In-vitro* susceptibility of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates to tigecycline. *J Antimicrob Chemother*, Nov 2012; 67 (11): 2696-2699.
55. S Grandesso, M Gion et al. Are E-test and VITEK-2 good choices for tigecycline susceptibility testing when comparing broth microdilution for MDR and XDR *Acinetobacter baumannii*? *New Microbiol*, Oct 2014; 37 (4): 503-508.
56. RP Dellinger, R Moreno et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*, Feb 2013; 41 (2): 580-637.
57. MB Marques, KB Waites et al. Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, May 1997; 41 (5): 881-885.
58. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Available at [www.ecdc.europa.eu/](http://www.ecdc.europa.eu/)
59. [www.eucast.org/](http://www.eucast.org/)