

Impatto clinico delle resistenze batteriche

Dott. Carlo Tascini

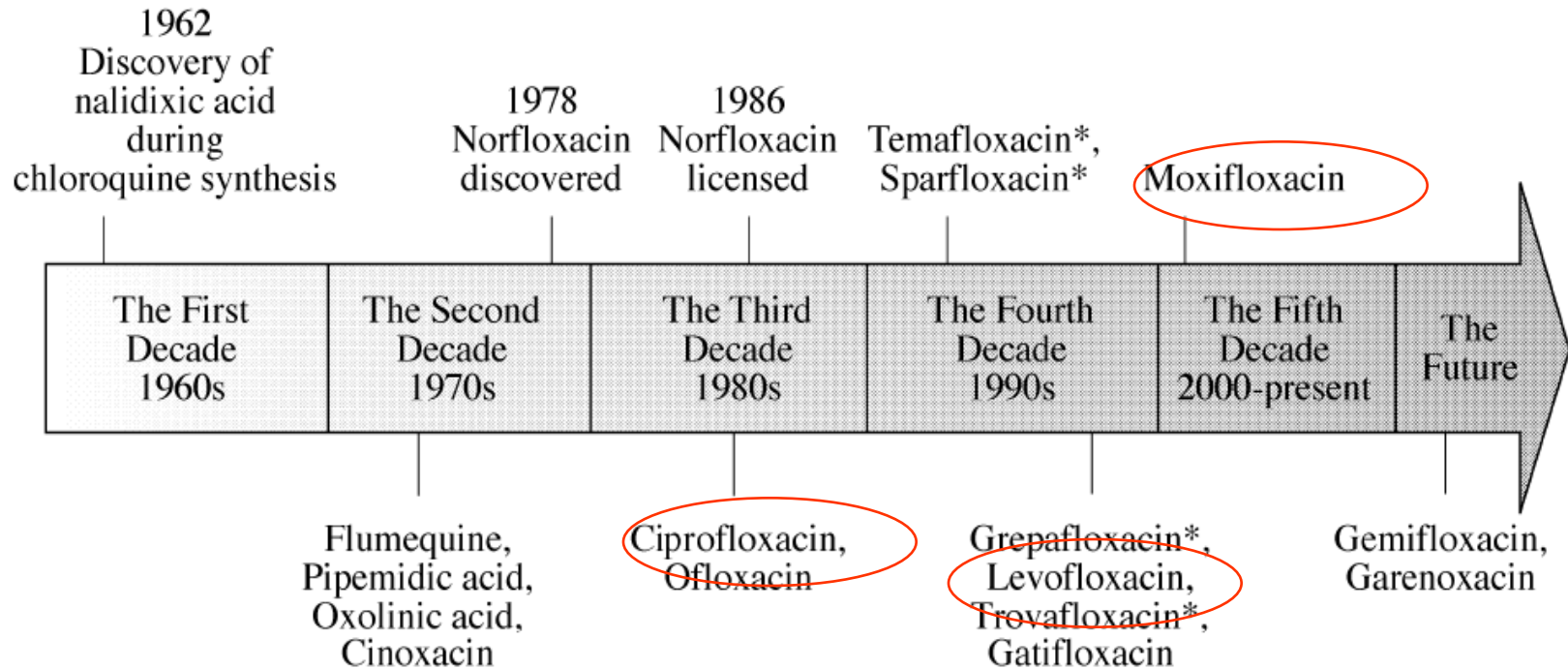
U. O. Malattie Infettive

AOUP – Pisa

Direttore Dott. F. Menichetti

Chinoloni

A. M. Emmerson and A. M. Jones



ones: decades of discovery and use. *, withdrawn.

Table 2. Development of quinolone potency against Gram-negative bacteria

Quinolone	MIC ₉₀ (mg/L)						
	<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Enterobacter</i> / <i>Citrobacter</i> spp.	<i>Serratia</i> spp.	<i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. fragilis</i>
Nalidixic acid	8	16	>64	>64	2	>64	>64
Cinoxacin	8	8	>64	>64	2	>64	>64
Enoxacin	0.25	2	1	4	0.12	2	>64
Norfloxacin	0.12	0.5	0.25	2	0.06	2	>64
Ciprofloxacin	0.03	0.25	0.12	0.5	0.03	1	16
Ofloxacin	0.12	0.5	0.5	1	0.03	4	16
Levofloxacin	0.12	0.25	0.5	0.5	0.03	2	8
Temafloxacin	0.06	0.5	0.5	0.5	0.03	1	4
Trovafloracin	0.06	0.25	0.06	1	0.01	1	0.25
Clinafloxacin	0.01	0.03	0.12	0.25	0.01	0.5	0.25
Sparfloxacin	0.06	0.5	0.5	4	0.03	4	4
Grepafloxacin	0.06	0.12	0.5	2	0.01	8	8
Moxifloxacin	0.06	0.12	1	2	0.06	8	1
Gatifloxacin	0.06	0.25	0.5	1	0.03	4	1
Gemifloxacin	0.03	0.25	0.5	2	0.06	4	ND
Garenoxacin	0.06	0.5	1.0	2	0.03	16	1

Table 4. Development of quinolone potency against Gram-positive bacteria

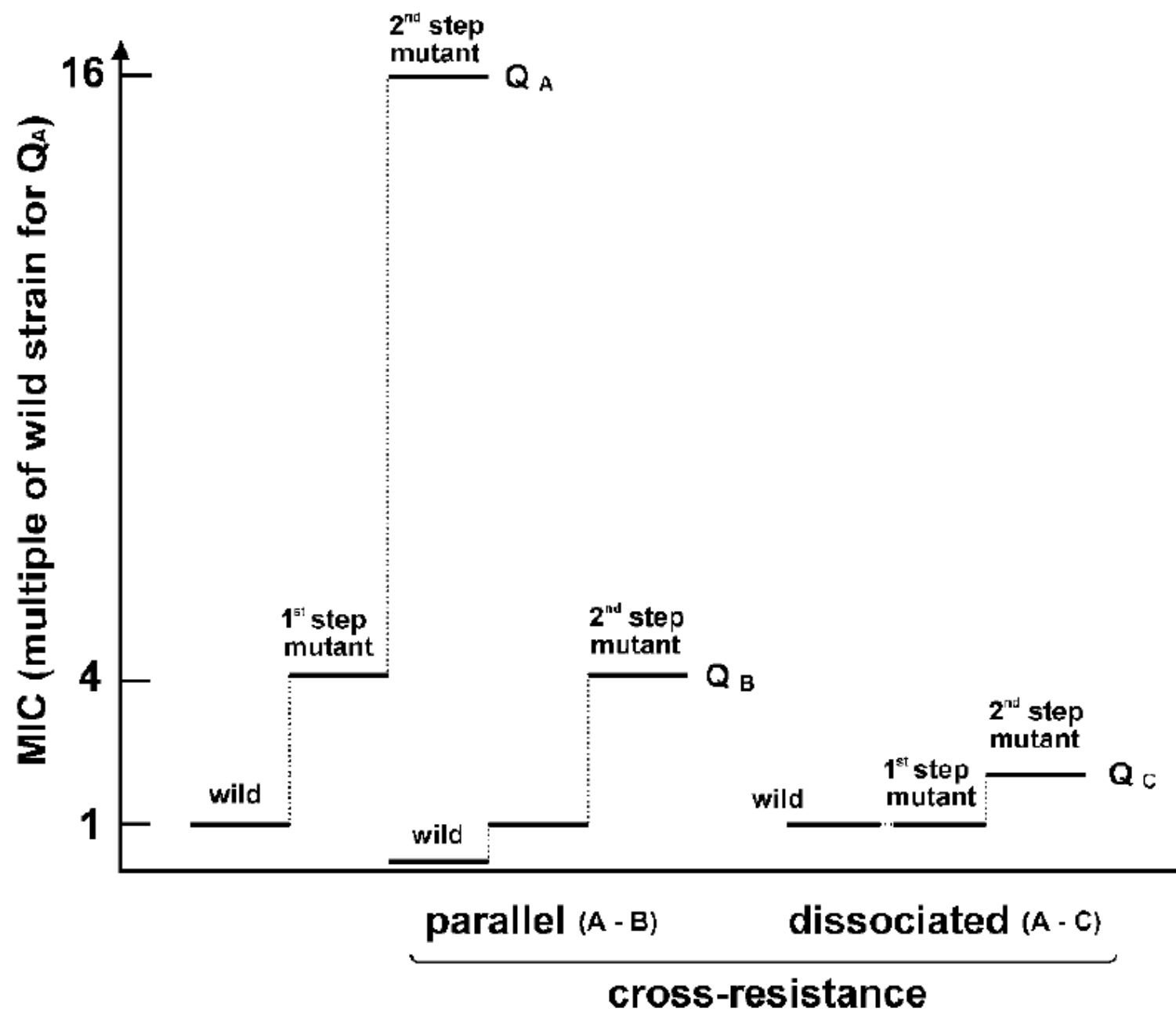
Quinolone	MIC ₉₀ (mg/L)				
	<i>S. aureus</i> (methicillin sensitive)	<i>S. pneumoniae</i>	Group A streptococci	<i>Enterococcus</i> spp.	<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>
Nalidixic acid	>64	>64	>64	>64	>64
Cinoxacin	>64	>64	>64	>64	>64
Enoxacin	2	64	64	8	>64
Ciprofloxacin	1	2	1	4	0.5
Ofloxacin	0.5	2	2	2	1
Levofloxacin	0.25	1	1	2	0.5
Temafloxacin	0.25	0.5	0.5	2	1
Sparfloxacin	0.12	0.5	1.0	2	0.25
Grepafloxacin	0.12	0.25	1.0	4	1
Gatifloxacin	0.25	0.25	0.25	1	0.5
Trovafloxacin	0.03	0.12	0.25	1	0.25
Moxifloxacin	0.06	0.12	0.25	2	0.25
Clinafloxacin	0.06	0.12	0.06	0.25	0.12
Gemifloxacin	0.06	0.03	0.06	4	ND
Garenoxacin	0.03	0.12	0.25	0.5	0.25

Resistenza acquisita ai fluorochinoloni

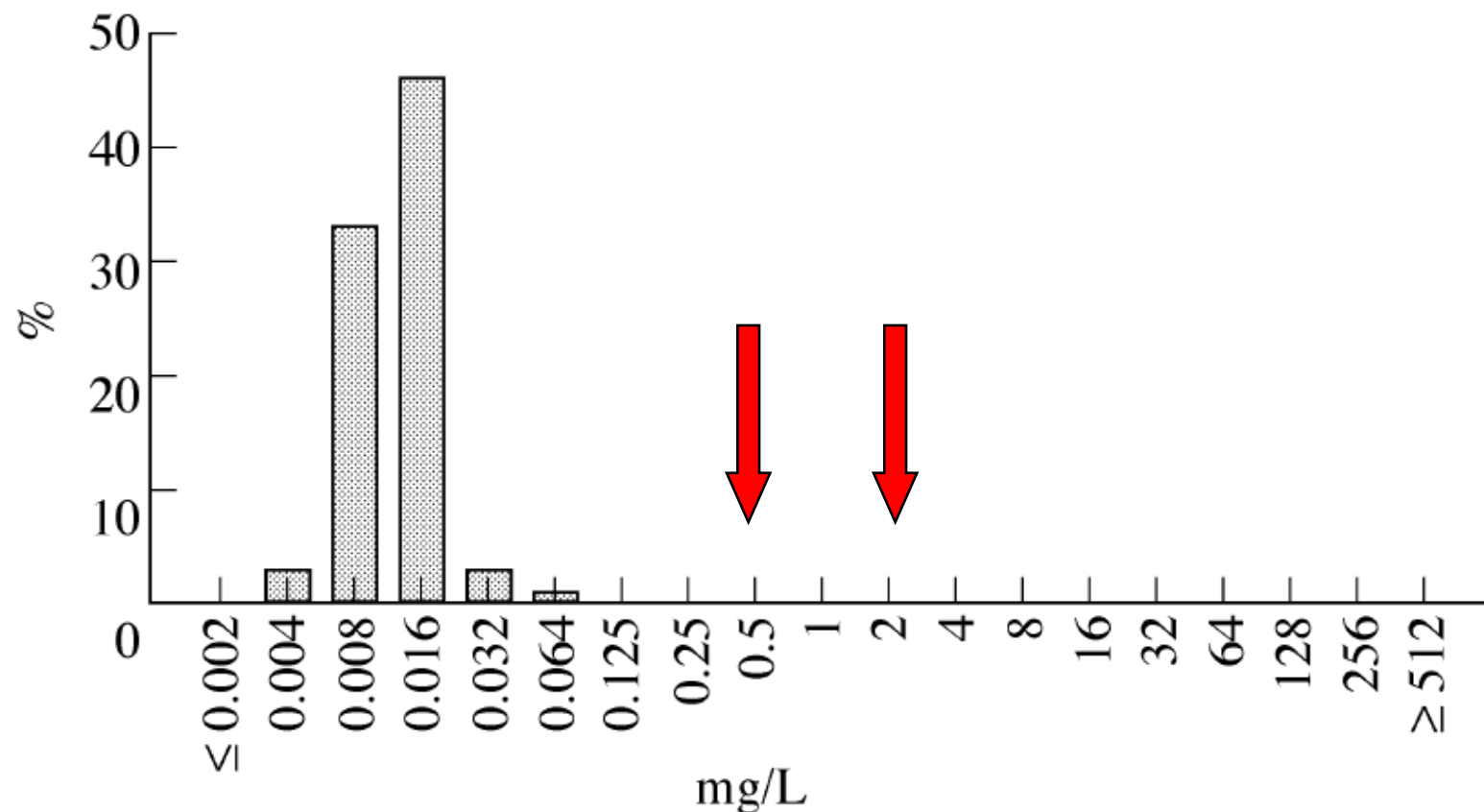
- Riportata in tutte le principali specie patogene sensibili
- Impatto rilevante, *trend* in aumento
- Meccanismi di resistenza molteplici:
 - ❖ Modificazione del bersaglio (GyrA)
 - ❖ Protezione del bersaglio Qnr
 - ❖ Efflusso attivo (pompe)
 - ❖ Inattivazione del farmaco, tipo aminoglicosidi

La resistenza acquisita ai fluorochinoloni per modificazione del bersaglio

- Il più comune meccanismo di resistenza acquisita ai fluorochinoloni
- Dovuta a **mutazioni cromosomiche** che alterano le QRDR delle topoisomerasi (GyrA/B e ParC/E)
- Nel caso di due bersagli con affinità diversa (maggioranza delle specie) la resistenza evolve *stepwise*



Ciprofloxacin/*Escherichia coli*
Antimicrobial wild-type distributions of microorganisms –
reference database
EUCAST



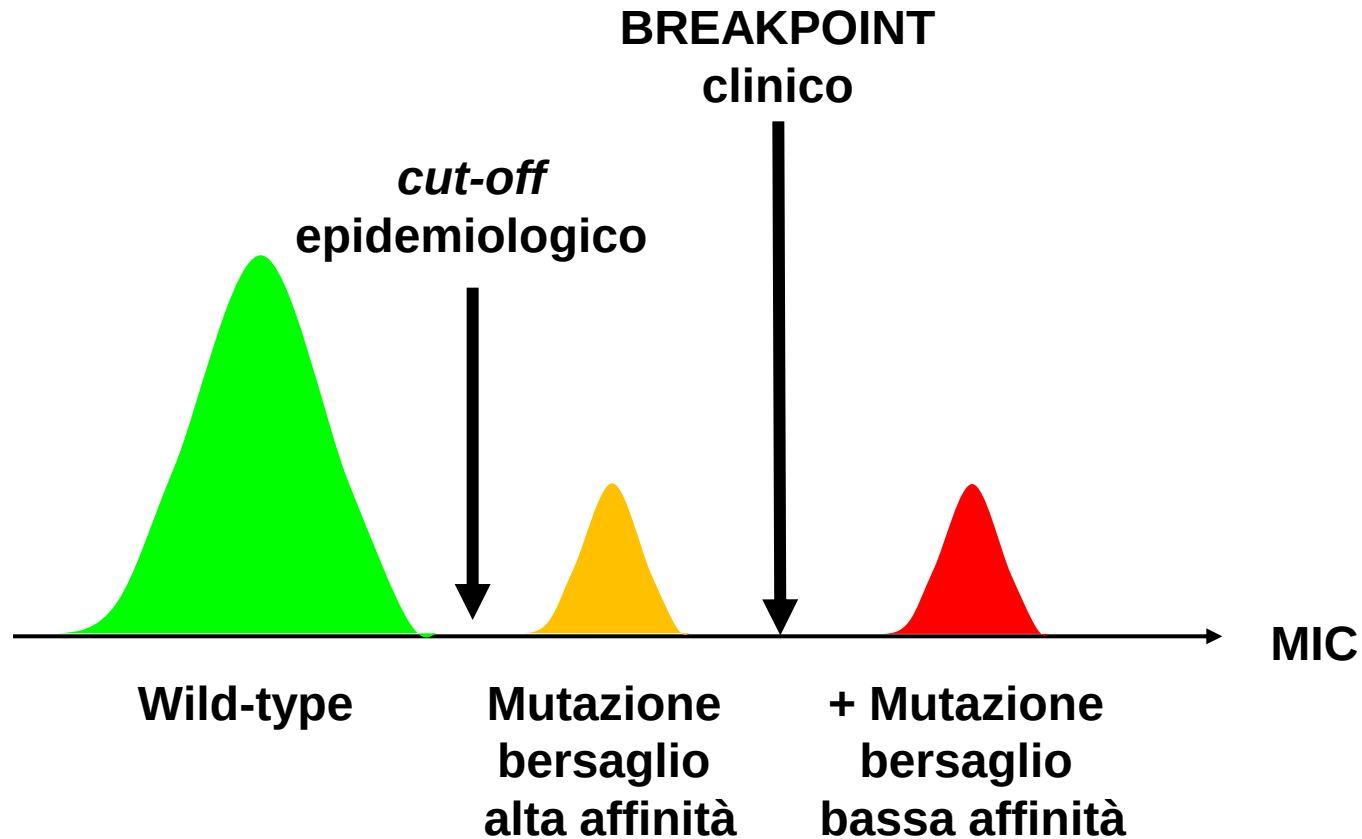
MIC

4416 observations (6 materials)

Epidemiological cut-off: WT ≤ 0.064 mg/L

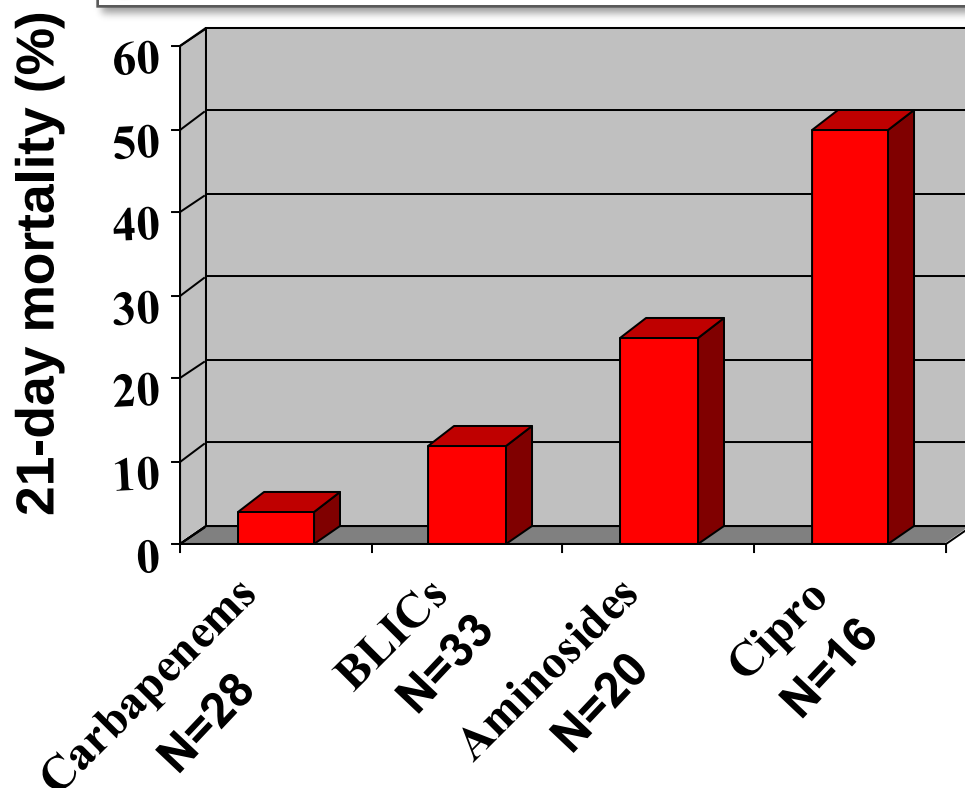
Clinical breakpoint: S ≤ 0.5 mg/L, R > 2 mg/L

Evoluzione *stepwise* della resistenza ai fluorochinoloni per modificazione del bersaglio



Are low-level resistance mechanisms clinically significant?

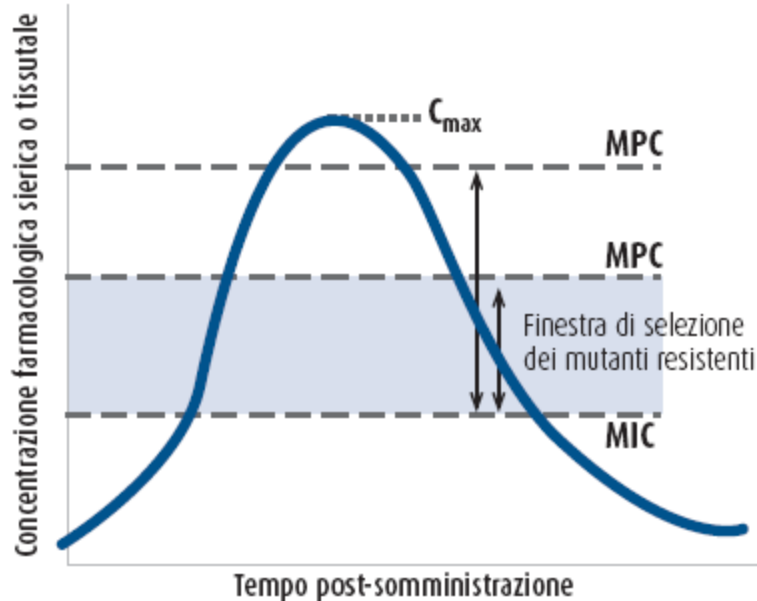
The eight patients treated with a fluoroquinolone (ciprofloxacin in all cases) who died were infected by pathogens with ciprofloxacin MICs ranging from 0.5 to 1 $\mu\text{g/ml}$. Four of the eight isolates had a mutation at codon 83 of *gyrA*, and the *qnrB* gene was detected in the other four.



97 patients with BSI caused by ESBL+ *Enterobacteriaceae* initially treated with potentially active agents

La *Mutant Prevention Concentration* (MPC)

MPC e finestra di selezione dei mutanti resistenti⁽⁶⁾



Definizione di MPC⁽⁶⁾

La MPC è la MIC del primo batterio mutante resistente in una popolazione eterogenea, oppure la più bassa concentrazione in grado di prevenire la crescita dei mutanti resistenti.

MPC

- Fenomeno in vitro che ha valore predittivo
- Scopo del nostro studio è verificare se la monoterapia con un determinato chinolone, in infezioni difficili, ha la capacità di selezionare ceppi resistenti

Metodi

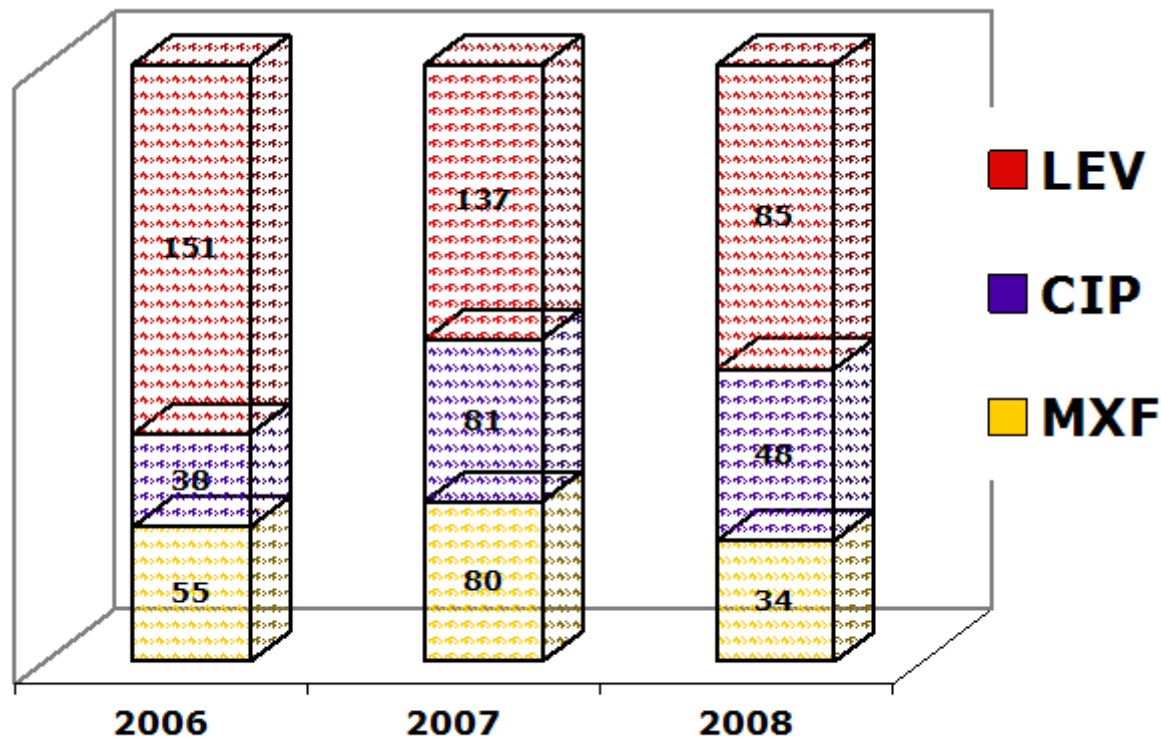
- E' stata saggiata la resistenza ai FQ degli isolati da PDI in corso di terapia con gli stessi farmaci.
- L'indagine è stata effettuata dal 1 Gennaio 2006 al 30 Novembre 2008.

Monoterapia con chinoloni nelle infezioni del piede diabetico

- Dal 2006 al 2008 sono state effettuate 709 colture di varie tipologie di campioni di pazienti con infezioni del piede diabetico in monoterapia con chinolone.
- Tipologia campione: tamponi di ulcere, aspirati di ascessi, frammenti ossei e tessuti molli derivanti dalla terapia chirurgica (infezioni medio-severe, Texas University Classification: classi 2 o 3).

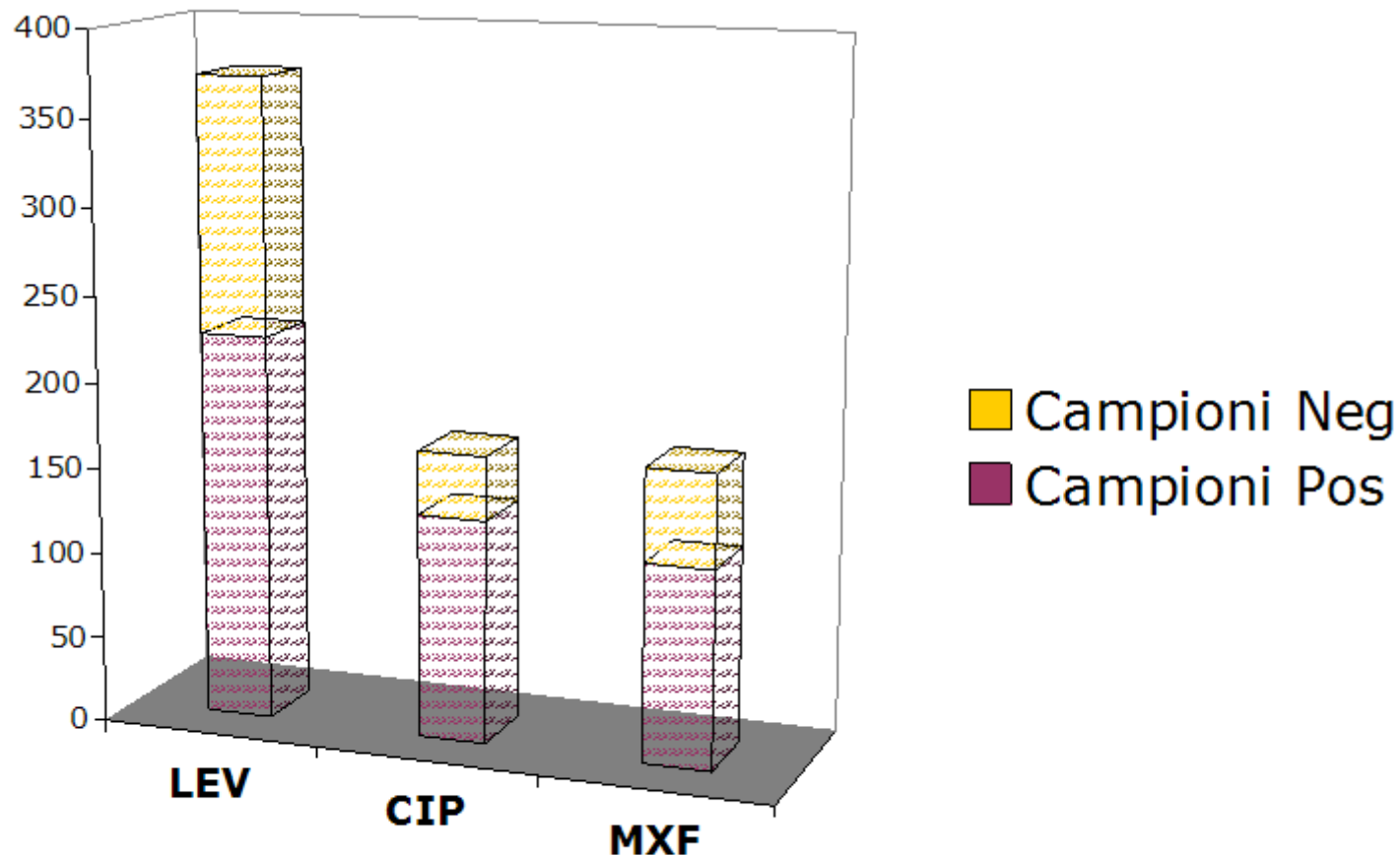
Monoterapia con chinoloni nelle infezioni del piede diabetico

✓ Nel 53% dei casi il chinolone di scelta era la levofloxacin (LEV), nel 24% la moxifloxacin (MXF) e nel 23% la ciprofloxacina (CIP).



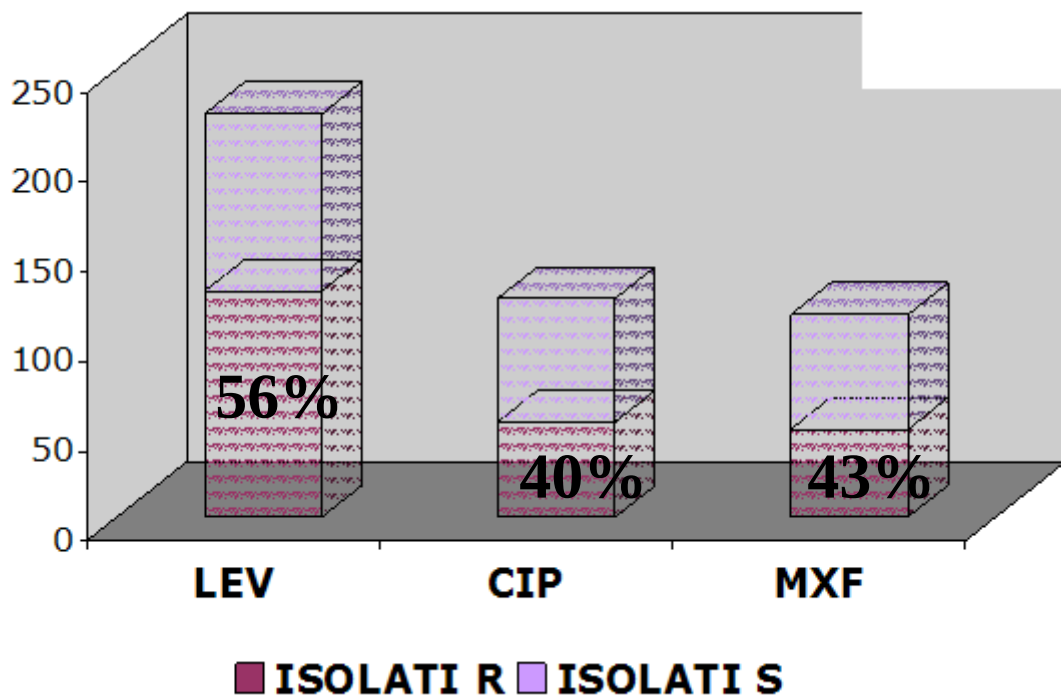
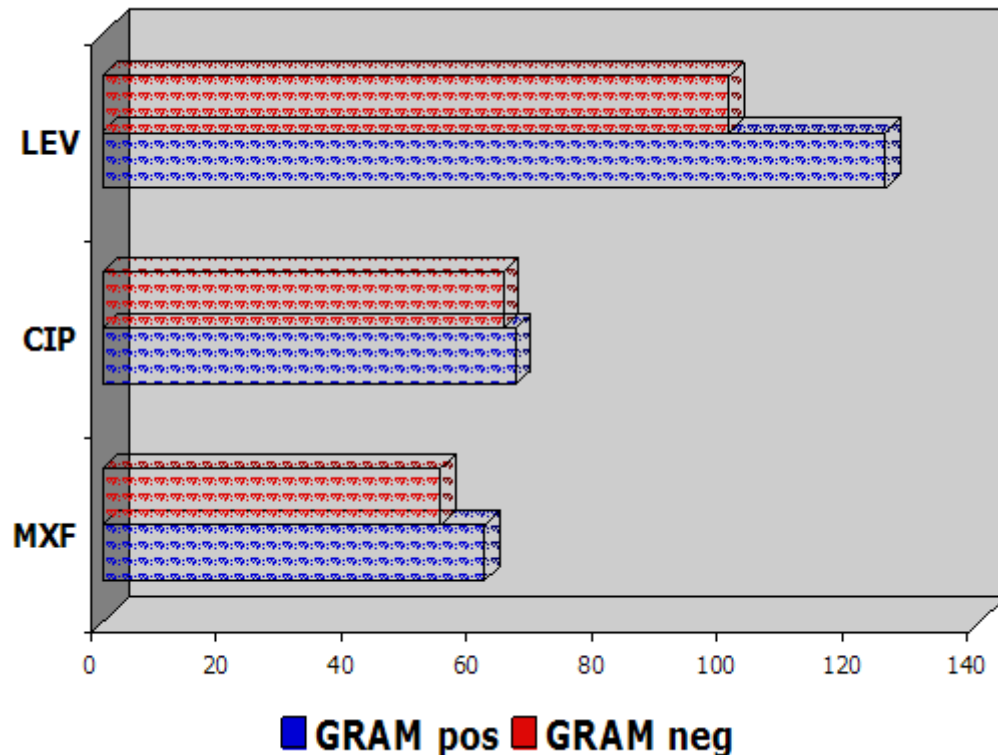
Risultati (1)

L'efficacia microbiologia (negativizzazione del campione) è risultata maggiore per LEV rispetto a MXF e CIP.



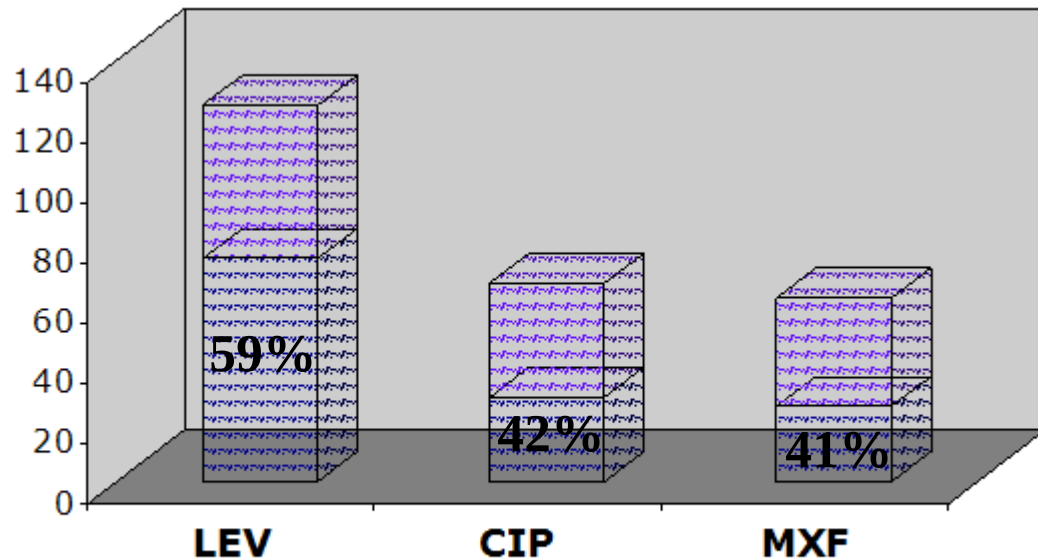
Risultati (2)

La capacità di selezionare ceppi resistenti sia gram positivi sia gram negativi, è risultata maggiore per LEV, rispetto a MXF e CIP.



p:0,03 per MXF e p:0,02 per CIP

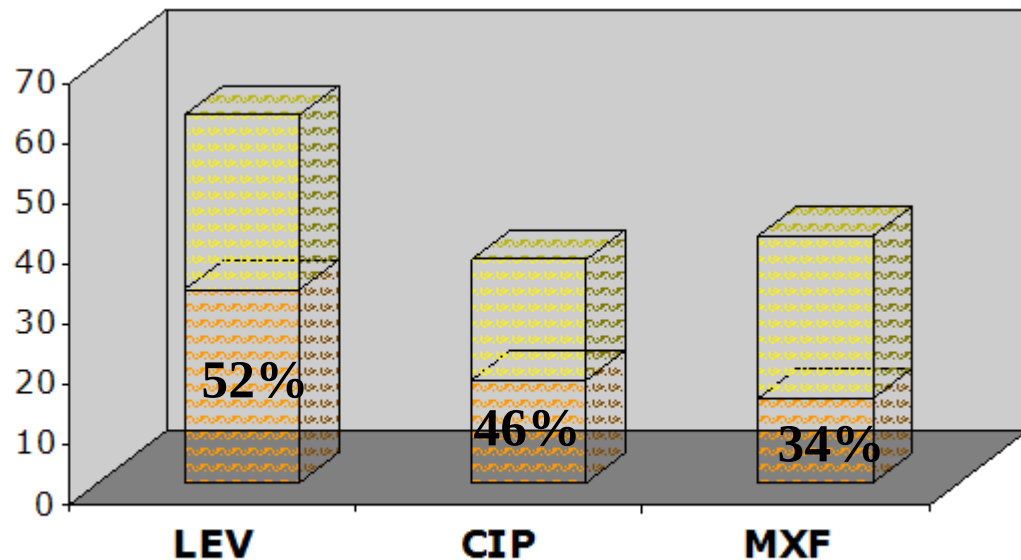
Risultati (3)



La capacità di selezionare Gram positivi resistenti era maggiore per LEV rispetto a MXF ($p:0,03$).

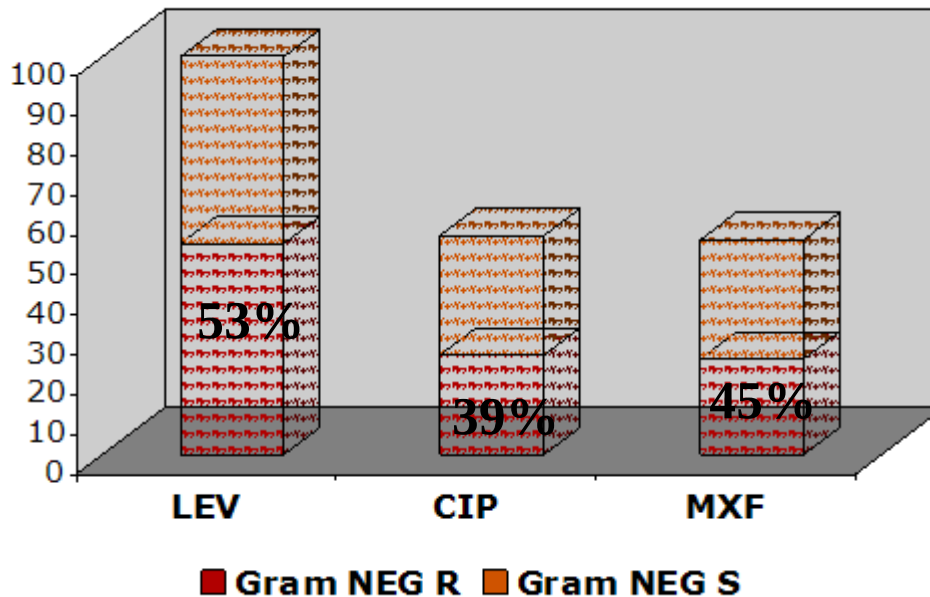
■ Gram POS R ■ Gram POS ~

La levofloxacin ha la maggiore capacità di selezionare *S. aureus* resistenti ai chinoloni (CRC) rispetto a moxifloxacin ($p:0,05$).



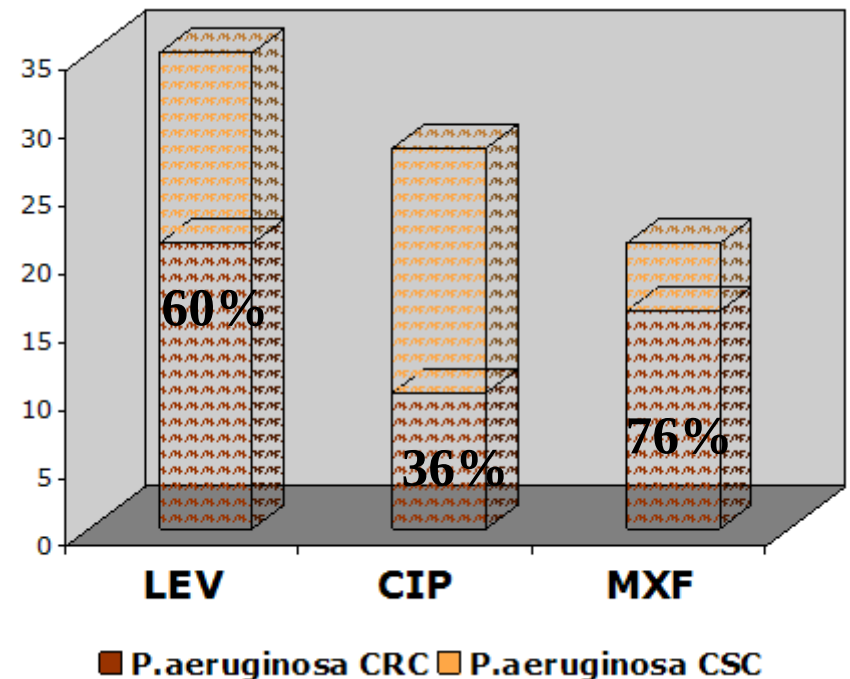
■ S.aureus CRC ■ S.aureus CSC

Risultati (4)



La capacità di selezione di Gram negativi resistenti è maggiore per LEV rispetto a CIP ($p:0,01$).

P. aeruginosa resistente ai chinoloni viene selezionato più frequentemente da MXF rispetto a CIP ($p:0,01$).



- ✓ **L'efficacia microbiologica della monoterapia con chinoloni nelle infezioni del piede diabetico è modesta.**
- ✓ **La levofloxacinina è la molecola che in monoterapia ottiene la più elevata percentuale di eradicazione (40%).**
- ✓ **In caso di persistenza del germe infettante la levofloxacinina però, è il chinolone che con più probabilità seleziona ceppi resistenti ai chinoloni (gram positivi e gram negativi).**

ESBL/AmpC

- Cefalosporine
- Cefepime
- Piperacillina/tazobactam

ESBL/AmpC

- ESBL: resistenza a ceftriaxone (CRO), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefpodoxime (CPD) ma non a cefoxitin (FOX), sensibile all'azione del clavulanato e tazobactam. Cefepime resistente.
- AmpC: resistenza a ceftriaxone (CRO), cefotaxime (CTX), ceftazidime (CAZ), cefpodoxime (CPD) e cefoxitin (FOX), non sensibile all'azione del clavulanato e tazobactam, sensibilità in vitro a cefepime ma in vivo?

Tabella 14: Le beta-lattamasi delle *Enterobacteriaceae*, di *P. aeruginosa* ed *Acinetobacter spp*

Beta-lattamasi	Specie	Molecole	Antibiotici substrato	Inibizione da acido clavulanico	Classe
Spettro ampio		TEM-1, TEM-2, SHV-1	Penicilline, aminopenicilline ureidopenicilline carbossipenicilline Cefalosporine a spettro ristretto: cefazolina, cefuroxime etc	+++	A
		OXA	Quelle precedenti più oxacillina	+ (-)	D
Spettro esteso ESBL	<i>Klebsiella</i> <i>E. coli</i> <i>Citrobacter</i> <i>Enterobacter</i> <i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> <i>Serratia</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Pseudomonas</i>	Famiglie TEM e SHV	I substrati di quelle a spettro ristretto più oximino cefalosporine (cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, ceftriaxone) e monobattamici	+++++	A
		Altre ESBL: BES, GES, PER	Come sopra	+++++	A
	<i>Salmonella</i> <i>E. coli</i>	CTX-M	Come ESBL più cefepime	+++++	A
		OXA	Come ESBL più cefepime	+ (-)	D

Tabella 14: Le beta-lattamasi delle *Enterobacteriaceae*, di *P. aeruginosa* ed *Acinetobacter spp*

Beta-lattamasi	Specie	Molecole	Antibiotici substrato	Inibizione da acido clavulanico	Classe
AmpC	<i>Enterobacter</i> <i>Citrobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> <i>Morganella</i> <i>E. coli</i> (NI)	<i>AmpC</i>	Come ESBL più cefamicine (cefoxitin, cefotetan etc)	--	C
Carbapenemasi	<i>Pseudomonas</i> <i>Serratia</i> <i>Klebsiella</i> <i>E. coli</i>	IMP, VIM	Tutti i beta-lattamici escluso aztreonam	--	B
	<i>Klebsiella</i> <i>Enterobacter</i>	KPC	Tutti i beta-lattamici	+++	A
	<i>Acinetobacter</i>	OXA	Tutti i beta-lattamici	+	D

Legenda: le specie dove con più frequenza si ritrova la classe di enzimi sono evidenziate in grassetto.

ESBL

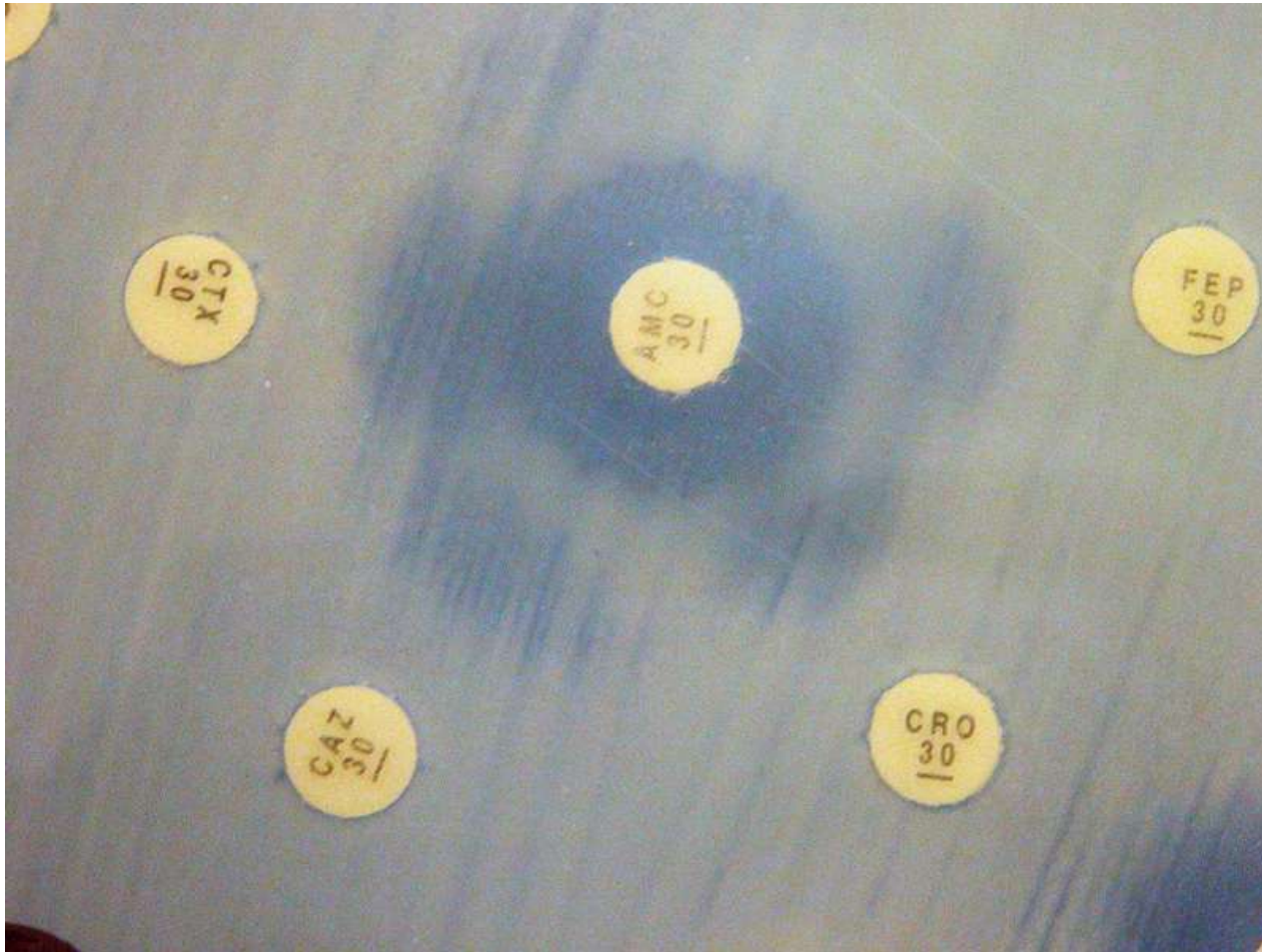


Tabella 17: Fenotipi di resistenza di ESBL, AmpC e CTX-M nelle *Enterobacteriaceae*

Enzima	CAZ	CTX	CRO	CPD	FOX	FEP	ATM	TZP	IMP MEM	CLA/ CAZ
ESBL	R	v	v	R	S	v	v	S	S	+
AmpC	R	R	R	R	R	S	R	R	S	-
CTX-M	v	R	R	R	S	v	v	S	S	+/-

CRO: Ceftriaxone, CAZ: ceftazidime, CTX: cefotaxime, CPD: cefpodoxime, FOX: cefoxitin, FEP: cefepime, ATM: aztreonam, TZP: piperacillina/tazobactam, IMP: imipenem, MEM: meropenem, CLA/CAZ: sinergismo clavulanato/ceftazidime

Terapia ESBL

- Piperacillina/tazobactam mostra un effetto inoculo: è sensibile a 10^5 e resistente a 10^7 , la loro efficacia clinica nelle infezioni da germi produttori di ESBL non è stata dimostrata
- Non esistono studi comparativi
- Mortalità maggiore in soggetti trattati con cefalosporine rispetto a carbapenemici
- Carbapenemici meglio di piperacillina/tazobactam
- Scarsa attività clinica delle cefamicine (porine)

ESBL/AmpC

- Nel sospetto di ESBL trattare con carbapenemici: attenzione a piperacillina/tazobactam per l'effetto inoculo, associare i chinoloni?
- Nel sospetto AmpC non fidarsi di piperacillina/tazobactam e cefepime anche se S nell'antibiogramma

Breakpoints modificati per lo screening delle ESBL

	CLSI	
	<i>E. coli, Klebsiella, P. mirabilis</i>	
	mm	MIC
Cefpodoxime (10 mg)	≤ 17 / $\leq 22^{\circ}$	> 4 / $> 1^{\circ}$
Cefotaxime (30 mg)	≤ 27	> 1
Ceftazidime (30 mg)	≤ 22	> 1
Ceftriaxone (30 mg)	≤ 25	> 1
Aztreonam (30 mg)	≤ 27	> 1

 **Test di conferma**

$^{\circ}$ *P. mirabilis*

AmpC



AmpC



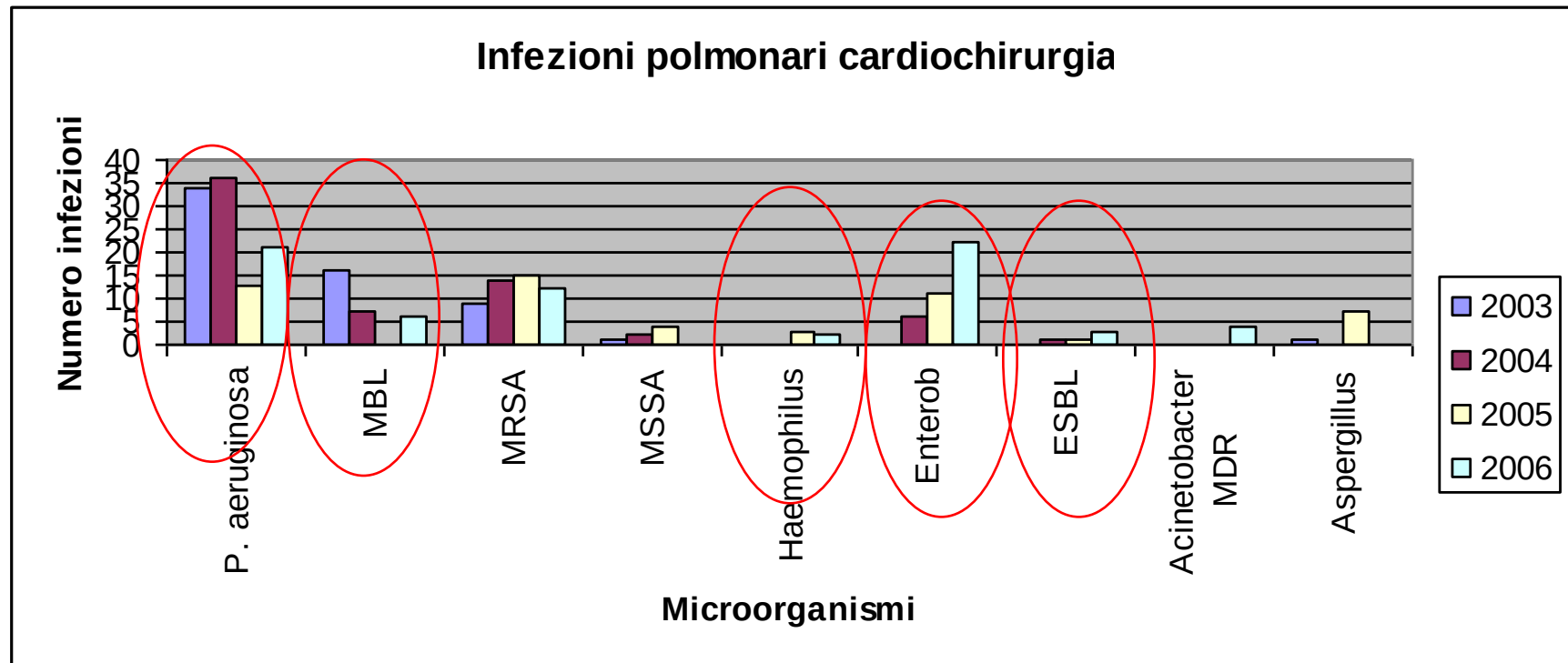
Tabella 2: risultati del sinergismo

Germe	MIC ULI combo	MIC ULI alone	MIC P/T combo	MIC P/T alone	ΣFIC
<i>Serratia</i> 226 AmpC	0,39	1,56	4	128	0,28
<i>E. cloacae</i> 211 AmpC	0,01	0,04	32	128	0,25
<i>E. Coli</i> 210 CTX-M	0,005	0,11	16	32	1
<i>Proteus</i> 202 TEM	0,78	6,25	0,12	2	0,18
<i>Proteus</i> spp TEM 206	0,39	1,56	1	2	0,75
<i>K. pneumoniae</i> 201 TEM-1 SHV-28	0,19	1,56	32	512	0,31
<i>E. coli</i> 218 TEM	0,011	0,39	2	16	0,15
<i>S. paratyphi</i> A 300	0,19	0,39	0,12	1	0,625
<i>K. oxytoca</i> 215 K1	0,39	0,75	1	8	0,625
<i>K. oxytoca</i> 204 SHV-12	0,006	0,012	128	256	1

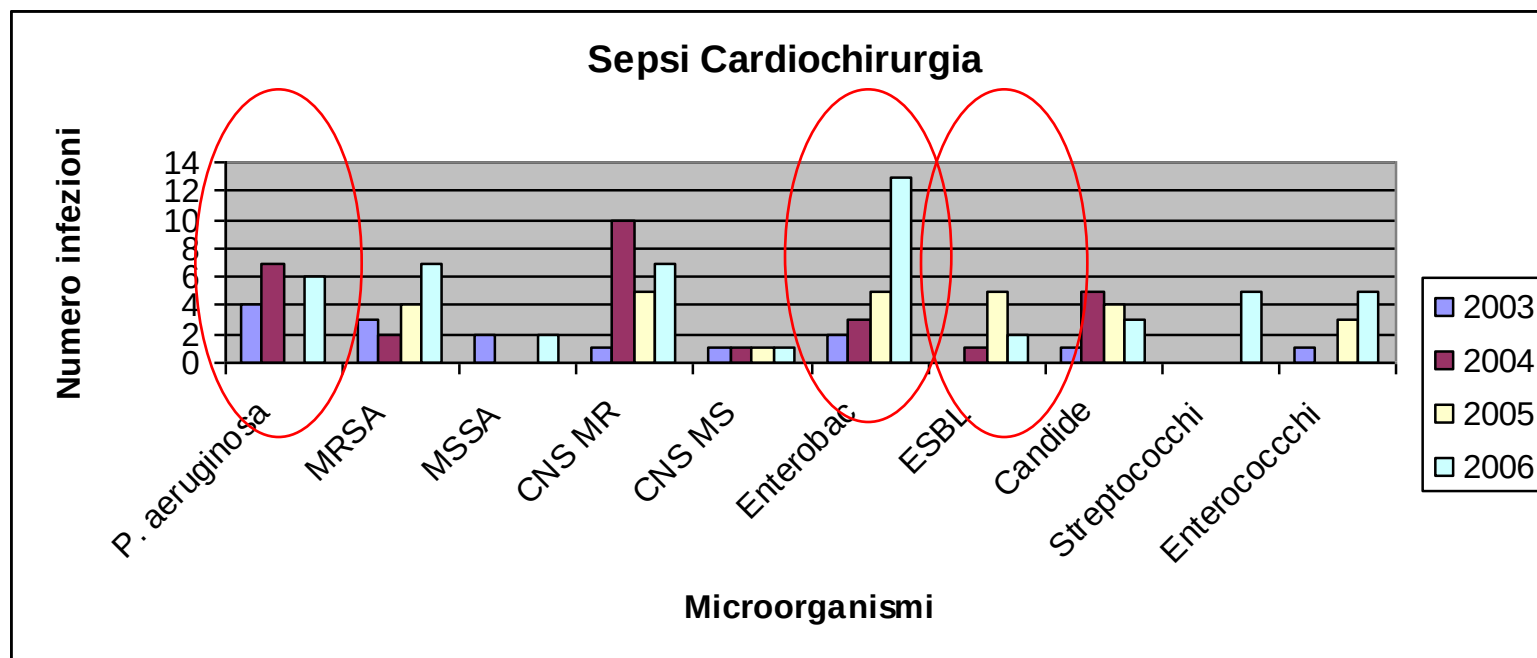
Metallo beta-lattamasi

- Carbapenemici
- Colistina

Restrizione d'uso del carbapenemico: Infezioni in rianimazione Pisa 2003- 2006



Restrizione d'uso del carbapenemico: Infezioni in rianimazione Pisa 2003- 2006



Metallo beta-lattamasi (MBL)

- Le beta-lattamasi (BL) si dividono in Serina BL e Metallo BL.
- Le seconde agiscono contro tutti i beta lattamici esclusi i monobattamici e non sono inibite da nessun inibitore suicida
- Scoperte negli anni sessanta in germi di nicchia (*Bacillus*, *Stenotrophomonas* e *Bacteroides*) dagli anni '90 sono diffuse tra i gram negativi
- Vari tipi: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM

Metallo beta-lattamasi (MBL)

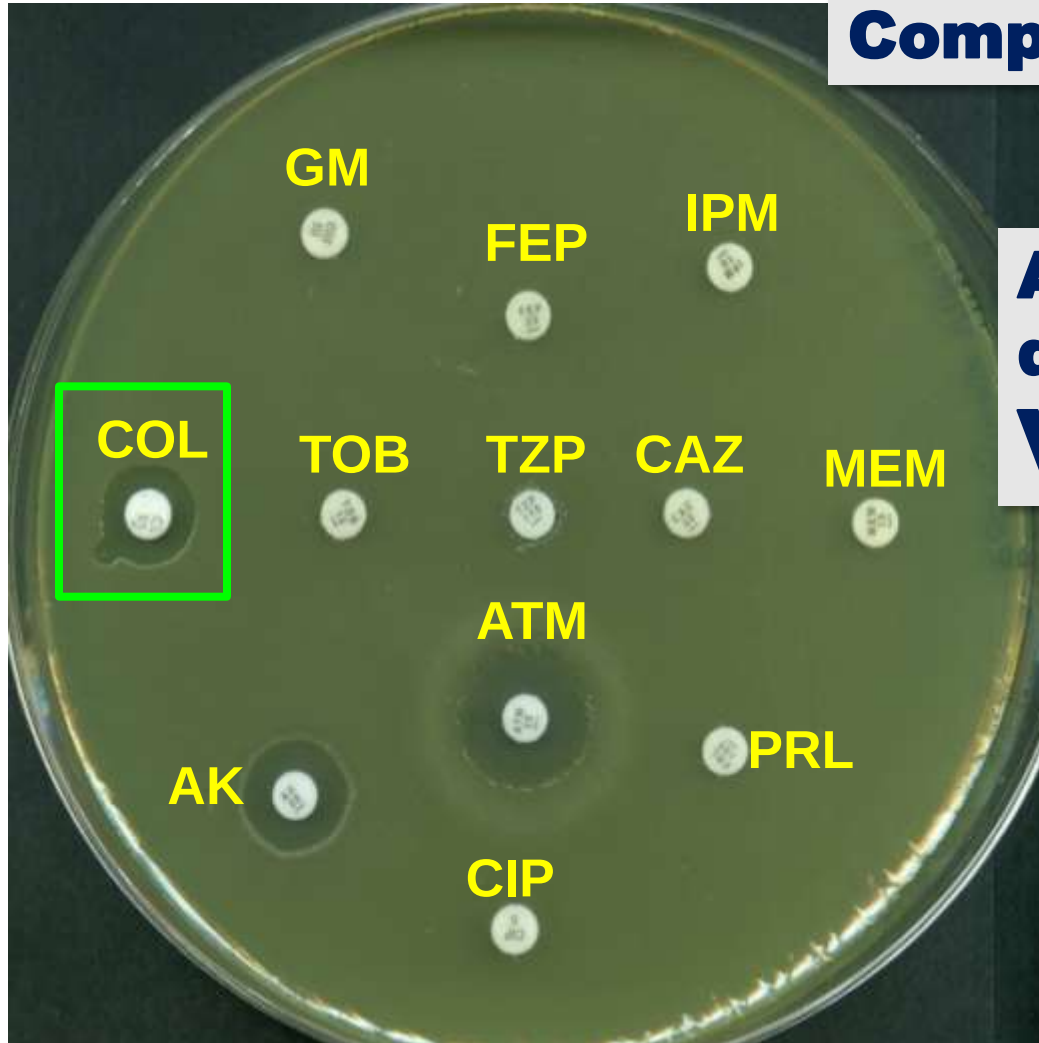
Tabella 18: Fenotipo dei ceppi produttori di MBL

Enzima	CAZ	FOX	FEP	ATM	TZP	IMP MEM	Inibizione tazobactam	Inibizione acido clavulanico
IMP/MIM	R	R	R	S	R	s/r/R	--	--

CAZ: ceftazidime, FOX: cefoxitin, FEP: cefepime, ATM: aztreonam,
TZP: piperacillina/tazobactam, IMP MEM: imipenem-meropenem

***P. aeruginosa* VR-143/97 – Italy, 1997**

Complex MDR phenotype



**A new MBL, highly
divergent from IMP:
VIM-1**

Dissemination of the Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-4} among Gram-Negative Pathogens in a Clinical Setting in Australia

Anton Y. Peleg,¹ Clare Franklin,¹ Jan M. Bell,² and Denis W. Spelman¹

¹Infectious Diseases and Microbiology Department, The Alfred Hospital, Melbourne, and ²Microbiology and Infectious Diseases Department, Women's and Children's Hospital, Adelaide, Australia

(See the editorial commentary by Rossolini on pages 1557–8)

Background. The clinical utility of carbapenems is under threat because of the emergence of acquired metallo- β -lactamase (MBL) genes. We describe the first outbreak in Australia of infection and/or colonization with gram-negative pathogens carrying the MBL gene *bla*_{IMP-4}.

Methods. MBL-producing organisms were identified using susceptibility data in conjunction with MBL screening methods. PCR and sequence analysis were performed to characterize the resistance gene and identify the presence of integrons. DNA profiles were determined by ribotyping. Clinical and epidemiological data were prospectively collected from January–July 2004.

Results. A total of 19 isolates were recovered from 16 patients: *Serratia marcescens* (10 isolates), *Klebsiella pneumoniae* (4 isolates), *Pseudomonas aeruginosa* (3 isolates), *Escherichia coli* (1 isolate), and *Enterobacter cloacae* (1 isolate). Isolates were resistant to most β -lactams except aztreonam, and variable resistance to carbapenems was observed (MIC range, 2 to >8 mg/L). PCR and sequence analysis identified the *bla*_{IMP-4} gene and a class 1 integrase (*IntI1*) in all isolates. Of the 16 patients, 12 (75%) had infection; 5 had septicemia, 5 had ventilator-associated pneumonia, 1 had a urinary tract infection, and 1 had a superficial central venous line infection. Six (38%) of the 16 patients died, and 5 of those 6 (31% of the group of 16) had clinical infection with an MBL-producing organism. All except 2 patients had spatio-temporal epidemiological links in the intensive care unit. All *K. pneumoniae* isolates were of different ribogroups, whereas the *S. marcescens* and *P. aeruginosa* isolates were predominately of the same ribogroup.

Conclusions. MBL-producing gram-negative organisms have now emerged in Australia. The resistance gene, *bla*_{IMP-4}, appears highly mobile; this outbreak involved 5 different gram-negative genera from patients with close epidemiological links.

Table 1. Susceptibility profiles of the 19 gram-negative isolates carrying the *bla*_{IMP-4} metallo- β -lactamase gene.

Isolate (code)	Broth microdilution MIC (interpretation) of antimicrobial agent, mg/L											
	Mer	Imi	Caz	Cpm	Tic-Clv	Cip	TMP-SMX	Gen	Tob	Amk	Azt	Pol
<i>Serratia marcescens</i> (WCH 1819)	4 (S)	8 (I)	>16 (R)	16 (I)	>128 (R)	2 (I)	1 (S)	8 (I)	8 (I)	4 (S)	0.25 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 1818)	8 (I)	8 (I)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	4 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 1820)	8 (I)	8 (I)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	2 (I)	≤0.5 (S)	4 (S)	16 (R)	4 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 1822)	4 (S)	4 (S)	>16 (R)	16 (I)	>128 (R)	2 (I)	>2 (R)	>8 (R)	16 (R)	4 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 1862)	8 (I)	8 (I)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	16 (R)	2 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 1998)	>8 (R)	>8 (R)	>16 (R)	>16 (R)	>128 (R)	4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	4 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 2005)	8 (I)	8 (I)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	2 (I)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	4 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 2016)	8 (I)	8 (I)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	0.5 (S)	1 (S)	≤2 (S)	8 (I)	2 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 2026)	8 (I)	8 (I)	>16 (R)	16 (I)	>128 (R)	4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	4 (S)	≤0.12 (S)	>8 (—)
<i>S. marcescens</i> (WCH 2030)	8 (I)	4 (S)	>16 (R)	>16 (R)	>128 (R)	4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	4 (S)	0.25 (S)	>8 (—)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (WCH 1823)	>8 (R)	>8 (R)	>16 (R)	>16 (R)	>128 (R)	>4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	8 (S)	16 (I)	≤1 (S)
<i>P. aeruginosa</i> (WCH 1874)	>8 (R)	>8 (R)	>16 (R)	16 (I)	>128 (R)	>4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	8 (S)	16 (I)	≤1 (S)
<i>P. aeruginosa</i> (WCH 1891)	>8 (R)	>8 (R)	>16 (R)	16 (I)	>128 (R)	>4 (R)	>2 (R)	>8 (R)	>16 (R)	8 (S)	16 (I)	≤1 (S)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (WCH 1821)	8 (I)	4 (S)	>16 (R)	4 (S)	>128 (R)	≤0.03 (S)	≤0.5 (S)	≤2 (S)	4 (S)	1 (S)	≤0.12 (S)	≤1 (—)
<i>K. pneumoniae</i> (WCH 1825)	4 (S)	4 (S)	>16 (R)	4 (S)	>128 (R)	≤0.03 (S)	>2 (R)	≤2 (S)	4 (S)	1 (S)	≤0.12 (S)	≤1 (—)
<i>K. pneumoniae</i> (WCH 1933)	8 (I)	4 (S)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	0.12 (S)	>2 (R)	>8 (R)	16 (R)	0.5 (S)	≤0.12 (S)	≤1 (—)
<i>K. pneumoniae</i> (WCH 2017)	4 (S)	2 (S)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	≤0.03 (S)	>2 (R)	>8 (R)	8 (I)	1 (S)	≤0.12 (S)	≤1 (—)
<i>Escherichia coli</i> (WCH 2025)	4 (S)	2 (S)	>16 (R)	8 (S)	>128 (R)	0.12 (S)	>2 (R)	>8 (R)	16 (R)	2 (S)	≤0.12 (S)	≤1 (—)
<i>Enterobacter cloacae</i> (WCH 2007)	>8 (R)	>8 (R)	>16 (R)	>16 (R)	>128 (R)	≤0.03 (S)	>2 (R)	>8 (R)	16 (R)	2 (S)	>16 (R)	≤1 (—)

NOTE. Drug susceptibilities were interpreted according to the Clinical Laboratory Standards Institute (i.e., NCCLS) interpretive standard [15]. —, No interpretive guideline; Amk, amikacin; Azt, aztreonam; Caz, ceftazidime; Cip, ciprofloxacin; Cpm, cefepime; Gen, gentamicin; I, intermediate; Imi, imipenem; Pol, polymyxin B; R, resistant; S, sensitive; Tic-Clv, ticarcillin-clavulanate; TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole; Tob, tobramycin.

Emergenza di ceppi "panresistenti"

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Aug. 2005, p. 3824–3828
0095-1137/05/\$08.00+0 doi:10.1128/JCM.43.8.3824–3828.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 43, No. 8

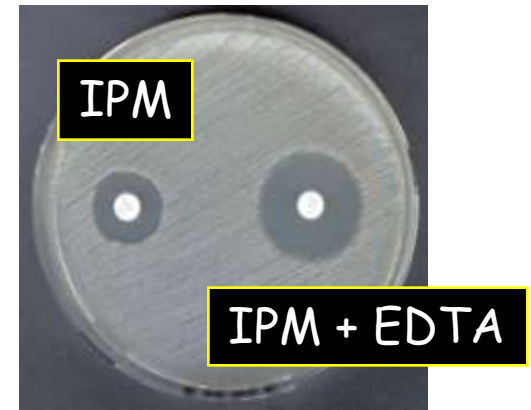
Nosocomial Outbreak Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing IMP-13 Metallo- β -Lactamase

Laura Pagani,¹ Céline Colignon,² Roberta Migliavacca,¹ Maria Labonia,³ Jean-Denis Docquier,^{2,5}
Elisabetta Nucleo,¹ Melissa Spalla,⁴ Michele Li Bergoli,³ and Gian Maria Rossolini^{2*}

Feb. 2003 - LRT from an ICU patient

MIC (mg/ml)

Pip/Tazo	32 I	Amikacin	2 S
Ceftazidime	>64 R	Gentamicin	>16 R
Cefepime	>64 R	Tobramycin	>16 R
Aztreonam	16 I		
Imipenem	32 R	Ciprofloxacin	>4 R
Meropenem	32 R		



Feb. 2003 → Aug. 1999: 87 isolates in 15 ICU patients (clonal spread)

Sistema esperto

- MIC ai carbapenemici sopra a 2 mg/L, tutti resistenti nel sospetto di MBL

Aumento dei ceppi refertati resistenti ai carbapenemi

- Questo fenomeno induce l'uso indiscriminato della monoterapia con colistina ed alla selezione della etero-resistenza

Come trattereste questa setticemia?

Microorganismo #1: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ssp <i>pneumoniae</i>	
Antibiotics	klepne(1)
Amikacina	16 S
Astreconam	>=64 R
+Cefazolina	R
Cefepime	>=64 R
+Cefotaxime	R
Cefpirome	>=64 R
Ceftazidime	>=64 R
+Cefuroxime - Sodio	R
Ciprofloxacina	>=4 R
Gentamicina	>=16 R
Imipenem	8 I
Meropenem	8 I
+Meclocillina	R
Netilmicina	>=32 R
Pefloxacina	>=16 R
Piperacillina	>=128 R
Piperacillina/tazobactam	>=128 R
Ticarcillina	>=128 R
Ticarcillina/A.CLAV.	>=128 R
Tobramicina	>=16 R
Trimetoprim/Sulfam.	>=320 R
Colistina	<=0,5 S
Isipamicina	<=1 S

LEGENDA: I valori di MIC (Minima Concentrazione Inibente) sono
Gli Antibiotici contrassegnati da un segno + non sono testati
Le MIC calcolate possono risultare diverse dai limiti di concen

Caso clinico 1

- Viene testato ertapenem che risulta resistente. Colistina sensibile MIC 2 mg/L, tigeciclina sensibile 0,25 mg/L. Test EDTA negativo
- Si effettuano MIC e MBC

MIC/MBC *K. pneumoniae*

	MIC mg/L	MBC mg/L
Imipenem	2 S	8
Meropenem	8 I	16
Ertapenem	32 R	ND
Colistina	2	>8

Caso clinico 1

- Ma quale era il meccanismo di resistenza del ceppo di *K. pneumoniae*?
- L'analisi molecolare è stata effettuata dal prof. Rossolini dell'Università di Siena
- Non è stata riscontrata produzione di MBL
- Il ceppo di *K. pneumoniae* produceva una ESBL del tipo CTX-M 15 che non conferisce resistenza ai carbapenemici ma solamente alle cefalosporine a spettro esteso
- Inoltre aveva una modificazione della porina OmpK36 dovuta ad un'inserzione nel gene corrispondente, tale mutazione portava ad un deficit di permeabilità che spiegava la resistenza ad alcuni carbapenemici e piperacillina/tazobactam
- Tale meccanismo è stato descritto in *Klebsiella* che produceva la ESBL CTX-M

Characterization of a Large Outbreak by CTX-M-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Mechanisms Leading to In Vivo Carbapenem Resistance Development

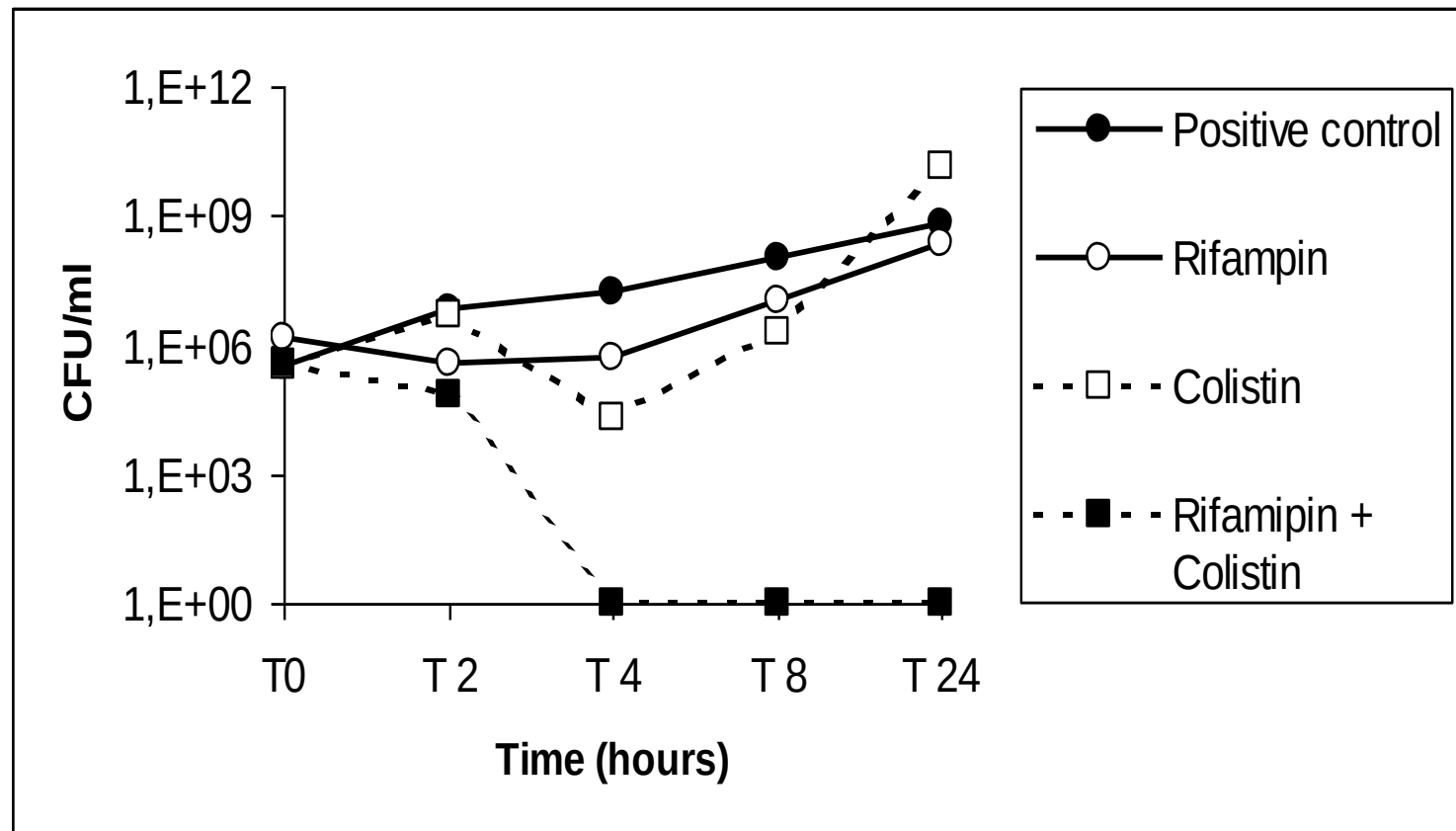
Ana Mena,¹ Virginia Plasencia,¹ Laura García,² Olga Hidalgo,³ José Ignacio Ayestarán,⁴
Sebastián Alberti,² Nuria Borrell,¹ José L. Pérez,¹ and Antonio Oliver^{1*}

Servicio de Microbiología, Hospital Son Dureta and Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud,¹ Área de Microbiología and Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud, Universidad de las Islas Baleares,² Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Son Dureta,³ and Servicio de Medicina Intensiva, Hospital Son Dureta,⁴ Palma de Mallorca, Spain

Received 26 February 2006/Returned for modification 25 April 2006/Accepted 2 June 2006

All extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* isolates from patients admitted to an adult intensive care unit were prospectively documented from 2002 to 2005, when a large outbreak (51 patients affected) of multiresistant ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* infection was detected. The involvement of a single *K. pneumoniae* clone was demonstrated by pulsed-field gel electrophoresis. In addition to the ESBL-mediated resistance, the epidemic strain uniformly showed cross-resistance to ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and tetracycline, whereas resistance to the β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations was variable. The ESBL involved was CTX-M-1, as demonstrated by isoelectric focusing, PCR amplification, and sequencing. CTX-M-1 as well as the aminoglycoside resistance determinants were encoded in a 50-kb plasmid that could be transferred to *Escherichia coli* only by transformation. In two of the infected patients, carbapenem resistance development (MICs of 8 to 12, 16, and >32 $\mu\text{g/ml}$ for imipenem, meropenem, and ertapenem, respectively) was documented, both in clinical samples and in intestinal colonization studies. The analysis of the outer membrane proteins of the carbapenem-susceptible and -resistant isolates revealed that the former expressed only one of the two major porins, OmpK36, whereas the latter did not express either of them. In one of the cases, the lack of expression of OmpK36 was demonstrated to be mediated by the interruption of the coding sequence by the insertion sequence IS26. This is the first report of a large outbreak of CTX-M-1-producing *Enterobacteriaceae* and, curiously, the first documented description in the literature of CTX-M-1 in *K. pneumoniae*, despite the fact that this enzyme has been found in multiple species. Furthermore, we document and characterize for the first time carbapenem resistance development in CTX-M-1-producing *Enterobacteriaceae*.

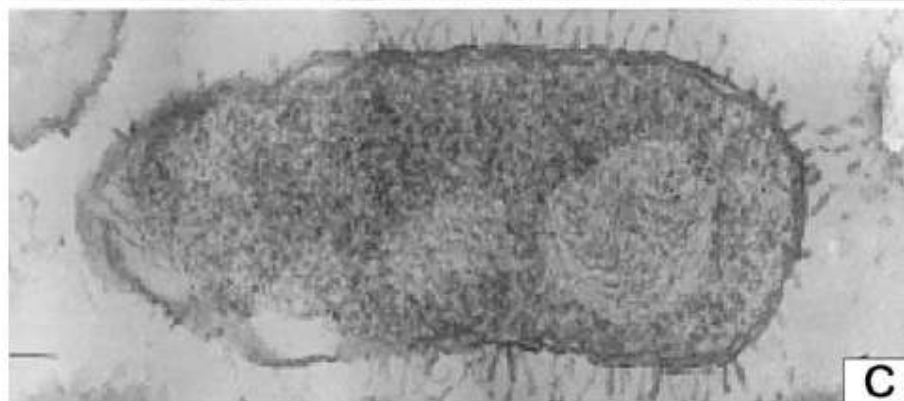
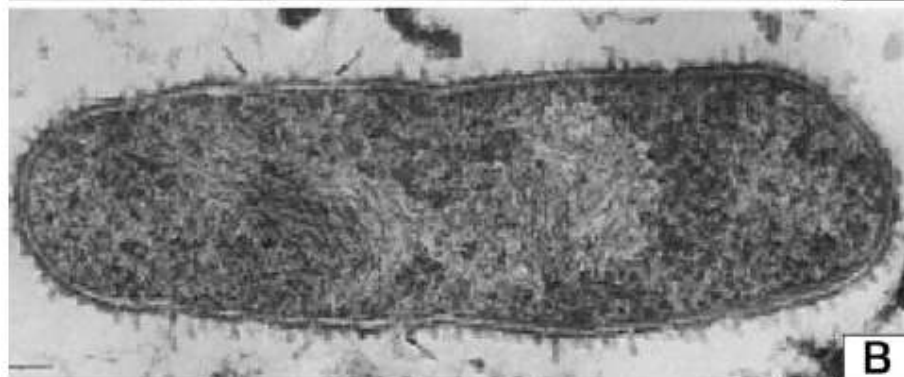
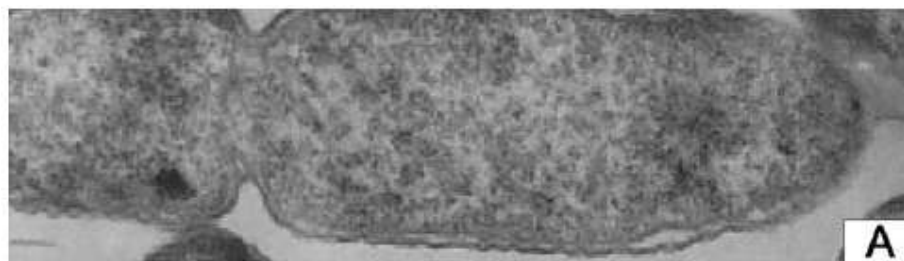
Rifampin plus Colistin time-kill curve vs. MDR *P. aeruginosa*

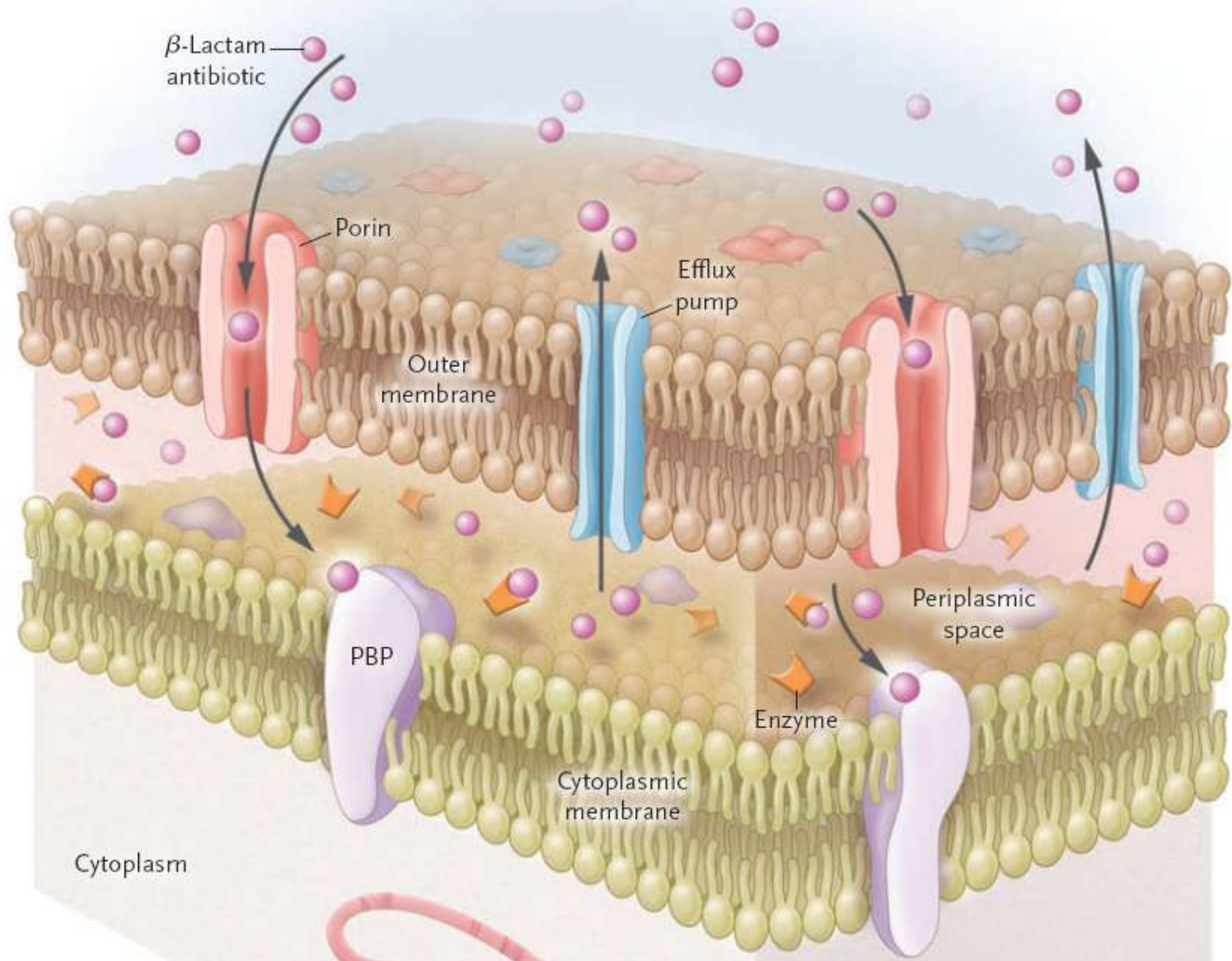


Tascini C. et al: Microbiological activity and clinical efficacy of a colistin and rifampin combination in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Chemother. 2004 Jun;16(3):282-7.

Sinergismo colistina-carbapenemico

- *A. baumannii* e *P. aeruginosa* potrebbero perdere la beta-lattamasi che è posta al di sotto della membrana esterna, distrutta dalla colistina





A. baumannii

Amikacina S

Gentamicina R

Tobramicina R

Ciprofloxacina R

Levofloxacina R

Amoxicillina/clavulanato R

Piperacillina/tazobactam R

Cefepime R

Cefoxitin R

Cefpodoxime R

Ceftazidime R

Cefotaxime R

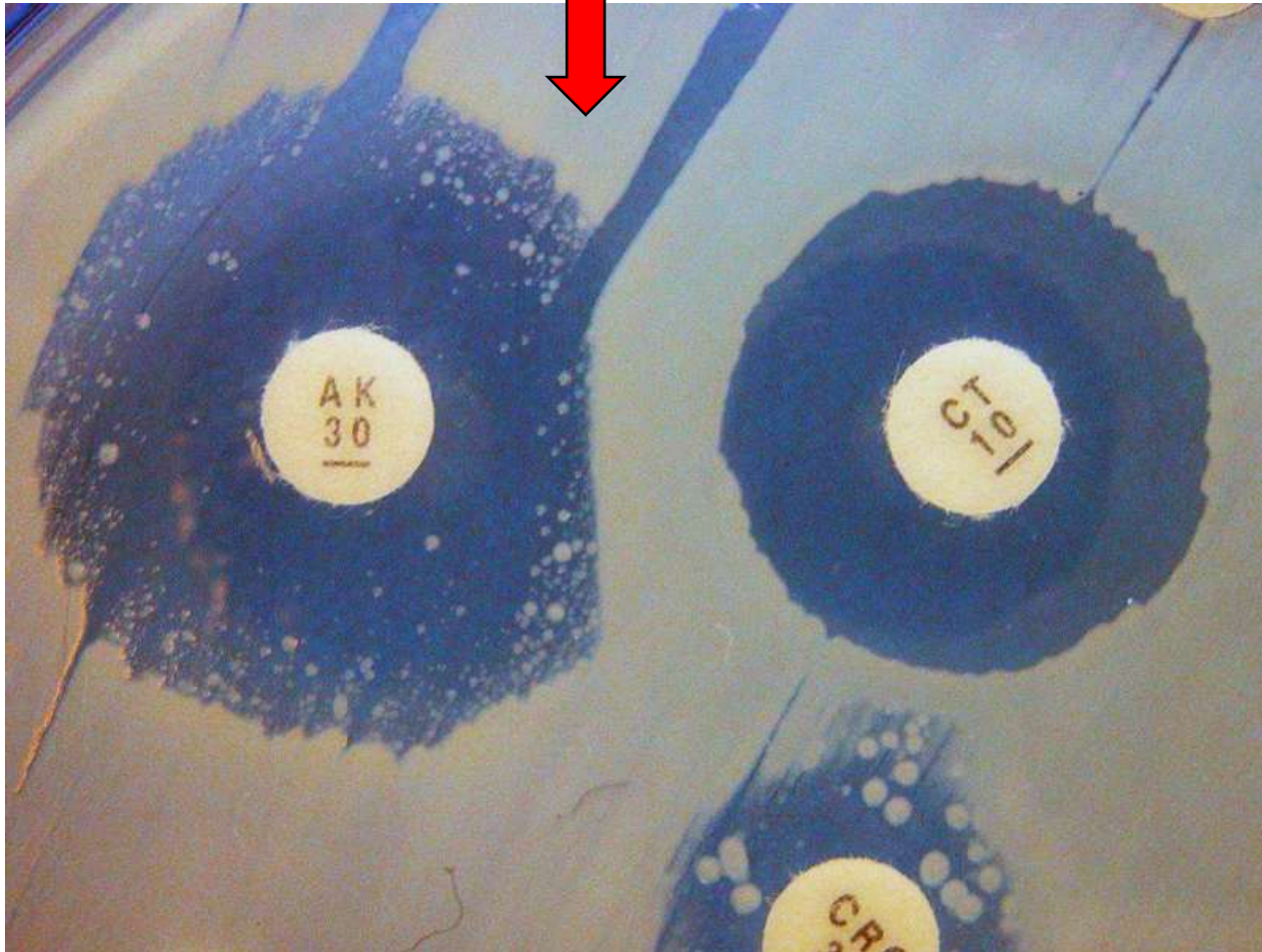
Aztreonam S

Meropenem R

Imipenem R

Colistina S

Antagonismo colistina-amikacina



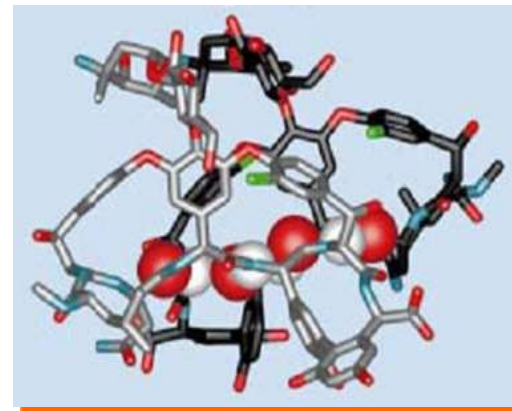
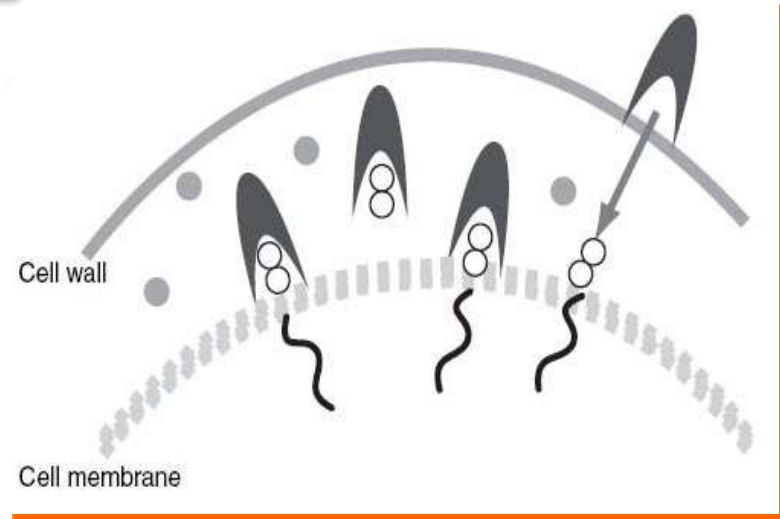
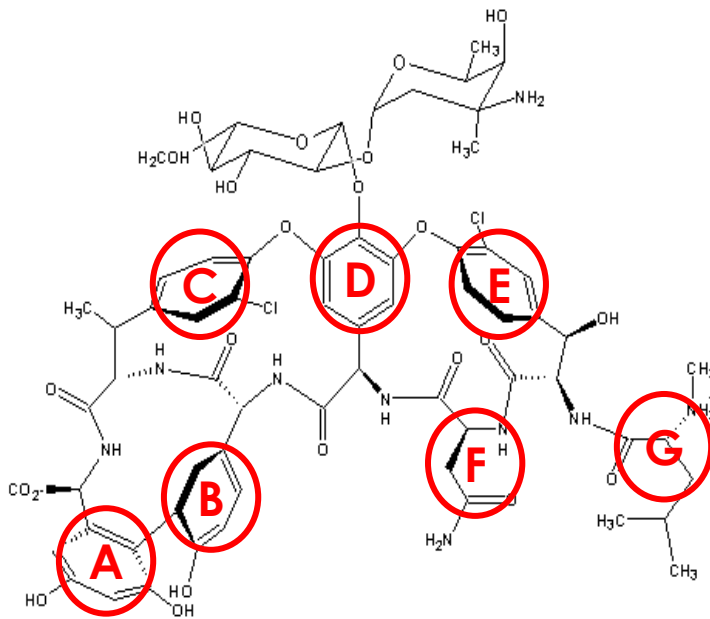
MRSA impact - U.S.A.

Infectious disease	No. of deaths (estimated)	Year
MRSA infection	19,000 ^a	2005
AIDS	15,798	2004
Tuberculosis	662	2004
Viral hepatitis	5793	2002

^a in hospital deaths

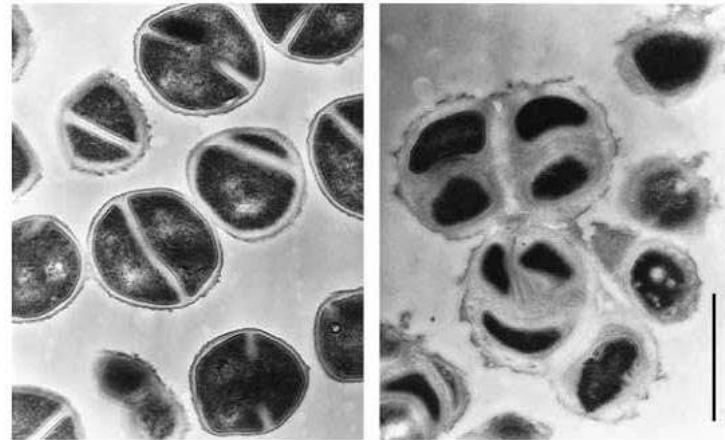
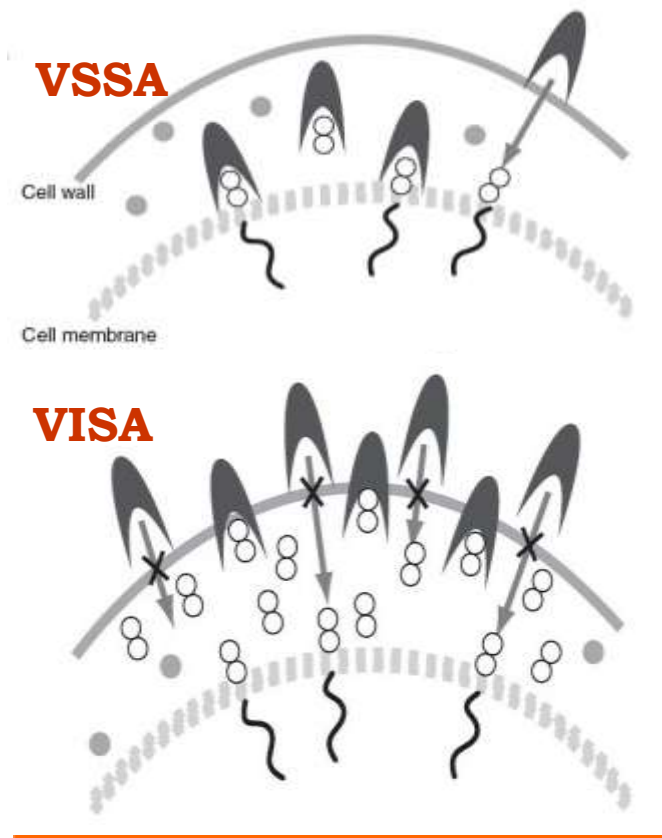
Glicopeptidi

Vancomicina Teicoplanina



Bersaglio: dipeptide D-Ala-D-Ala

VISA: meccanismo di resistenza



Trapping del glicopeptide
a livello della parete

Vanco MIC: $>2 - <16$ mg/L
Teico MIC: $>8 - <32$ mg/L

VSSA

hVISA

Sensibile

Eteroresistente

I ceppi hVISA hanno sottopopolazioni che esprimono diversi livelli di sensibilità ai glicopeptidi

Sensibile

Intermedio

Resistente

≤ 2

4 - 8

≥ 16

VISA

VRSA

Vancomycin nonsusceptible *S. aureus* in Europe

2006:

9 VISA

Austria (1)
Belgio (2)
Francia (1)
Irlanda (1)
Regno Unito (4)

1 VRSA

Austria (MIC > 16 mg/L)

2007:

4 VISA

Olanda (2)
Francia (1)
Irlanda (1)

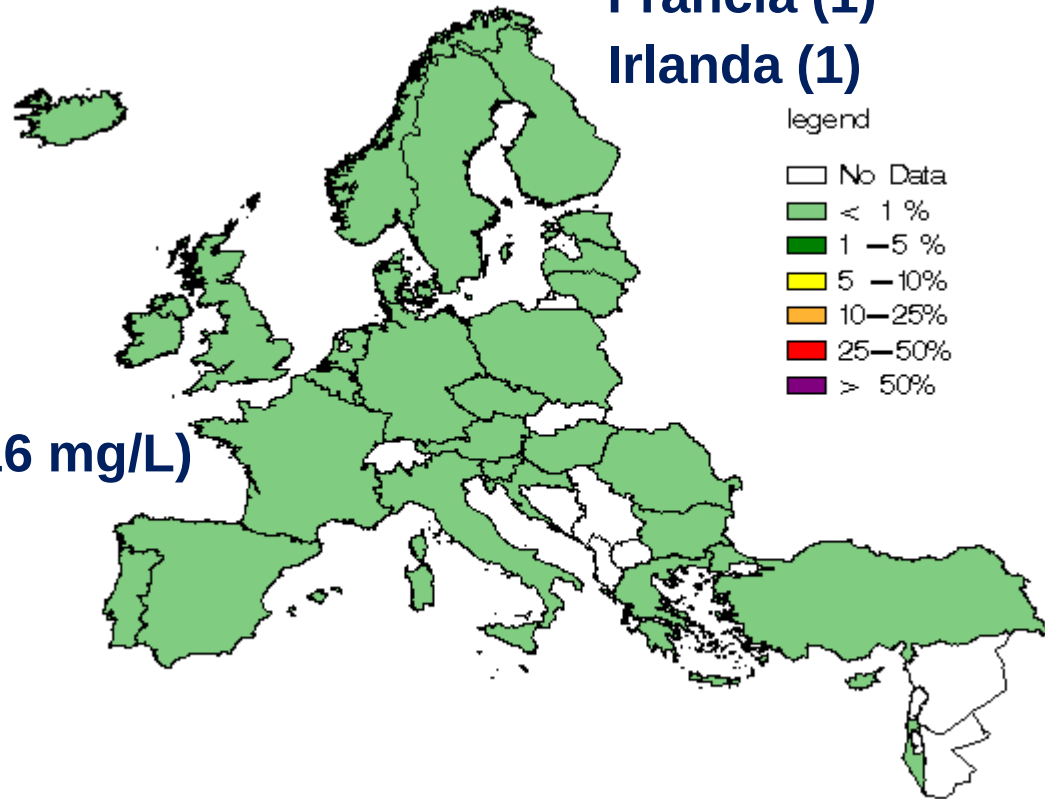


Table 2. Vancomycin susceptibility profiles for *Staphylococcus aureus*.

Pathogen	Abbreviation	Susceptibility profile	MIC, $\mu\text{g/mL}$
Vancomycin-susceptible <i>S. aureus</i>	VSSA	Susceptible	≤ 2
Heteroresistant <i>S. aureus</i> with intermediate susceptibility to vancomycin or glycopeptide	hVISA or hGISA	Heteroresistant	1–2 ^a
<i>S. aureus</i> with intermediate susceptibility to vancomycin or glycopeptide			4–8
Vancomycin-resistant <i>S.</i>			$\geq 16^b$

NOTE. Data are from t

^a Consist of subpopulations (≤ 1 in 1,000,000) that may grow in media containing $>2 \mu\text{g/mL}$ of vancomycin.

^b Requires backup primary testing with $6 \mu\text{g/mL}$ of vancomycin on an overnight plate.

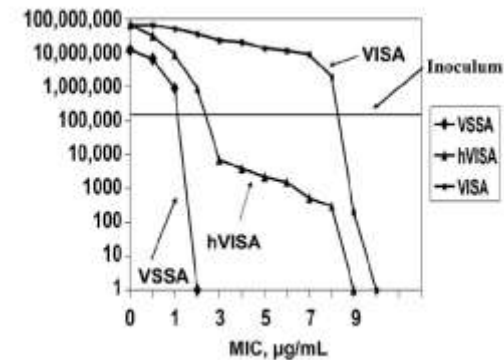
Il breakpoint andrebbe abbassato a 0.5 mg/L

- during a three-month period (January to April, 2008), an unusual number (n=9) of *S. aureus* infections which did not respond to glycopeptide treatment were observed at the Cisanello Hospital (Pisa, Italy). Infections included 3 SSTIs, 2 BSIs, 2 cIAIs, one VAP and one osteomyelitis, and occurred in 6 different wards

1363	Emocoltura IV
1541	PUS addominale I
1736	VAP I
2857	Osteomielite I
3581	Tampone fistola I
4375	Drenaggio addominale I
4523	Tampone ulcera II
4563**	Emocoltura
4593	Tampone ulcera IV

Studio di analisi di popolazione

1363	0
1541	2,5 VISA
1736	2,08 VISA
2857	1,13 Etero-VISA
3581	2,72 VISA
4375	2,02 VISA
4523	1,71 VISA
4563**	4,02 VISA
4593	0,42 VSSA



*** Index PAP	VSSA	≤0,9
Wootton JAC2001 47,399	hVISA	0,9- 1,3
	VISA	≥1,3

CEPP O	MIC				E-TEST							
	MICRODILUI ZIONE		AGAR DILUIZIONE		MHA McF 0,5		MHA McF 0,5 (PI)		BHIA McF 0,5*		BHIA McF 2*	
	VA	TP	VA	TP	VA	TP	VA	TP	VA	TP	VA	TP
ATCC	1	0,5	1	2	2	1,5	#	#	4	3	4	3
Mu 3			≤0,1 25	4	2	2	#	#	2	2	3	2
Mu 50			5	8	6	6	#	#	4	6	8	8
1363	0,5	0,12 5	1	≤0,2 5	1,5	0,06 4	2	3	1,5	0,094	2	0,125
1541	2	8	2	8	3	6	3	8	3	6	4	8
1736	1	8	2	8	3	3	2	3	3	8	4	8
2857	2	8	4	8	3	3	3	8	4	8	6	12
3581	2	8	2	16	3	6	2	6	4	8	4	8
4375	2	8	2	16	3	8	2	6	4	6	4	8
4523	2	4	2	8	3	4	2	4	3	6	4	6
4563 **	1	8	2	8	2	6	2,5	3	3	6	4	8
4593	2	8	2	8	3	6	2	6	2	8	2	8

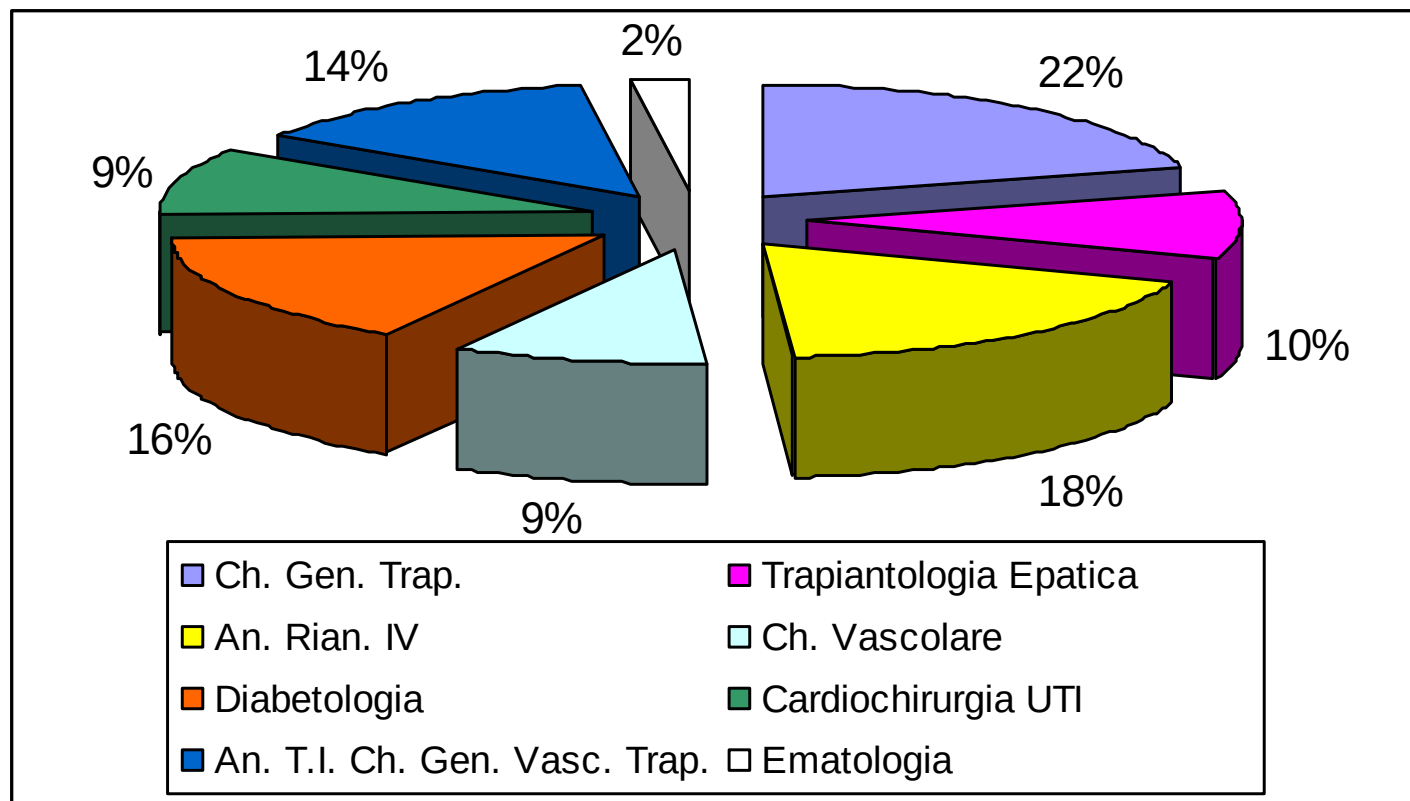
MIC a nuovi farmaci

	DPT	LZ	TGC
ATCC	0,5	1,5	0,25
Mu3	0,25	1,5	1,5/2^
Mu50	1	1	1
1363	0,38	1	0,19
1541	1,5	1,5	0,75/1^
1736	2	1,5	0,25
2857	1	0,25	0,25
3581	1,5	1,5	0,25
4375	1,5	0,75/1	0,125
4523	1	1,5	1,5^
4563**	1	1,5	0,19
4593	0,75	1,5	0,25

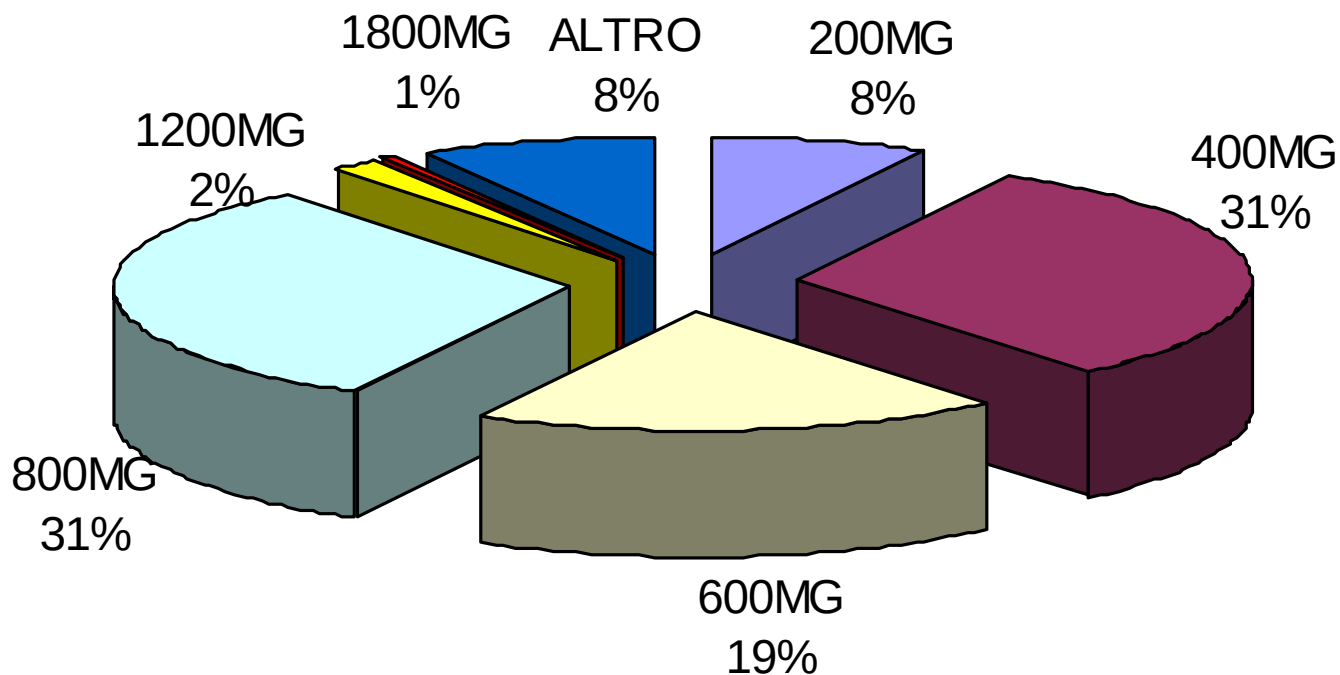
Breakpoint CLSI	S	R
Vancomicina (VA)	≤2	≥16
Teicoplanina (TP)	≤8	≥32
Daptomicina (DPT)	≤1	
Linezolid (LZ)	≤4	
Tigecilina (TGC)	≤0,5	
Tetraciclina	≤4	≥16

ceppo	Oxa	Materiale	Reparto	Terapia	PAP
1541	R	Ascesso addominale	IV UTI	Teico 7 gg F	2,5
1736	R	Espettorato	Med Pontedera	Teico F	2,08
2857	R	Tampone fistola osso	Amb	Teico F	1,13
3581	R	Fistola osso	Diab	Teico F	2,72
4375	R	Liquido peritoneale	TEU	Teico F	2,02
4523	R	T. ulcera	Angio	Teico	1,71
4563	S	Sangue	cardiologia	No	4,02
9121	R	Peritonite	Chir gen	Teico F	
7669	R	Tamp nasale	Orto	No	6
8024	R	Prot vasc	Chir	Teico Mesi F	
10280	S	Emo	Rian	No	
10270	R	Esp	Epato	No	
9467	R	Decubito	Neuroria	Teico mesi F	
9142	S	Osso	Amb	Teico mesi F	14
9170	R	Osso	Diab	Teico	12
9383	R	Osso	Diab	Teico	12
9171	r	Decubito	Amb	??	

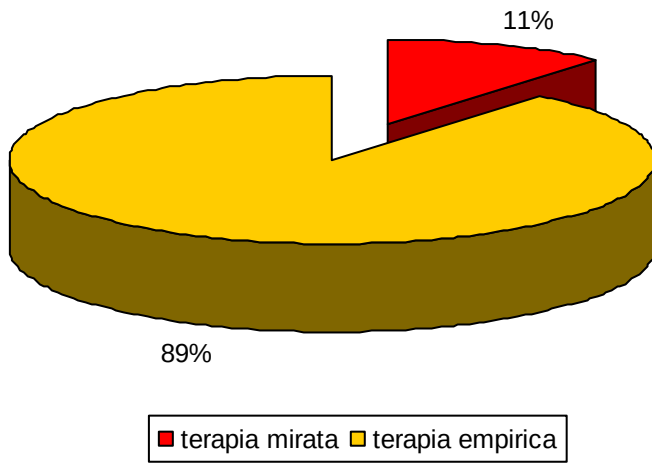
AOUP: TEICOPLANINA
Reparti monitorati 2007
170 PAZIENTI – 235 SCHEDE



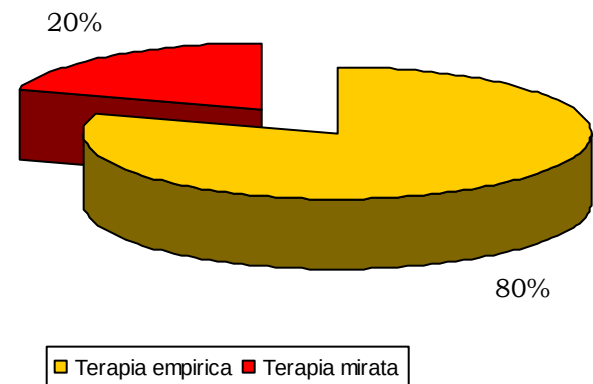
AOUP: TEICOPLANINA
dosaggi prescritti 2007
170 PAZIENTI – 235 SCHEDE



AOUP: Teicoplanina



Dopo monitoraggio



Conclusioni

- Il clinico deve conoscere i principali problemi legati all'antibiotico resistenza
- Deve saper prendere iniziative antibiotiche adeguate
- Il clinico deve suggerire al laboratorio, in base al giudizio clinico, la possibile presenza di germi difficilmente rilevabili dai normali test di routine: VISA, etero-VISA, ESBL, AmpC, MBL
- Deve chiedere poi test aggiuntivi che permettono di sfruttare al meglio le terapie antibiotiche: MBC, sinergismi