

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS

Dalla colonizzazione all'infezione invasiva: Associazione tra positività del tampone rettale per MDR e batteriemia da CPE

Relatore:

Prof.ssa Maria Rosalia Pasca

Correlatore:

Dott.ssa Antonella Rezzani

Tesi Sperimentale di

Sharon Matrone

Matricola
567991

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1 INTRODUZIONE..... 2

1.1 Enterobacterales..... 3

1.2 Antimicrobico-resistenza come emergenza globale..... 6

1.3 Definizione di MDR, XDR e PDR..... 11

1.4 Antibiotici β-lattamici e β-lattamasi..... 12

1.4.1 Classificazione delle β-lattamasi..... 15

1.4.2 Carbapenemasi..... 17

1.5 Epidemiologia internazionale e contesto italiano..... 22

1.5.1 Contesto epidemiologico italiano..... 25

1.6 Colonizzazione intestinale: definizione e significato clinico..... 28

1.7 Screening mediante tampone rettale..... 30

1.8 Sistema di sorveglianza presso l'IRCCS Maugeri -Pavia..... 32

1.9 Progressione da colonizzazione a infezione invasiva..... 35

2 SCOPO DELLA TESI..... 38

3 MATERIALI E METODI..... 40

3.1 Disegno dello studio..... 40

3.2 Raccolta dei campioni..... 41

3.2.1 Tamponi rettali..... 41

3.2.2 Emocolture..... 41

3.2.3 Invio dei campioni..... 42

3.3 Semina dei campioni clinici..... 43

3.3.1 Analisi dei risultati: Tamponi rettali..... 44

3.4 Identificazione batterica e studio della sensibilità agli antibiotici..... 48

3.5 Test immunocromatografico rapido di conferma..... 51

4 RISULTATI E DISCUSSIONE..... 53

5 CONCLUSIONI..... 72

6 BIBLIOGRAFIA..... 75

1 INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, l'antibiotico-resistenza è diventato un problema sempre più rilevante per la salute pubblica, sia a livello nazionale che internazionale. La diffusione di batteri resistenti a un numero crescente di antibiotici rende infatti più difficile il trattamento di numerose infezioni, riducendo le possibilità terapeutiche disponibili e aumentando il rischio di complicanze (GBD 2021; *Antimicrobial Resistance Collaborators* 2024*)*. Questo fenomeno assume particolare importanza in ambito ospedaliero, dove la presenza di pazienti con condizioni cliniche compromesse, il frequente utilizzo di antibiotici e il ricorso a procedure invasive possono favorire la comparsa e la diffusione di microrganismi multiresistenti (WHO, 2017).

Tra i batteri di maggiore interesse clinico troviamo gli *Enterobacterales,* alcuni dei quali fanno parte del normale microbiota intestinale umano, ma possono diventare responsabili di infezioni opportunistiche.Particolare attenzione viene rivolta agli *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE), capaci di inattivare antibiotici appartenenti alla classe dei carbapenemi, spesso impiegati nel trattamento delle infezioni batteriche più difficili (CDC, 2024).

In questo contesto, la colonizzazione intestinale da batteri multiresistenti agli antibiotici rappresenta un aspetto importante da considerare, poiché può precedere lo sviluppo di infezioni invasive, tra cui le batteriemie.

La sorveglianza microbiologica assume quindi un ruolo fondamentale nell'identificazione dei pazienti colonizzati e nell'adozione di misure finalizzate a limitare la diffusione di questi microrganismi in ambito ospedaliero (CDC, 2025).

1.1 Enterobacterales

L'ordine degli *Enterobacterales* comprende un vasto gruppo di batteri Gram-negativi della classe dei *Gammaproteobacteria*, ampiamente diffusi in ambito clinico, ambientale e veterinario.

Negli ultimi anni, la classificazione tassonomica di questo ordine ha subito revisioni importanti, grazie all'introduzione delle tecniche di sequenziamento genomico che hanno chiarito i rapporti filogenetici tra i vari taxa. In particolare, la riclassificazione proposta da Adeolu e colleghi nel 2016 ha suddiviso l'ordine *Enterobacterales* in sette famiglie distinte, tra cui *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae* e *Yersiniaceae*. All'interno della famiglia *Enterobacteriaceae* sono inclusi alcuni dei microrganismi di maggiore interesse clinico, come *Escherichia coli* e specie appartenenti ai generi *Klebsiella* spp. ed *Enterobacter* spp. (Adeolu et al., 2016).

Gli Enterobatteri sono bacilli Gram-negativi, generalmente di forma allungata o cilindrica, con dimensioni comprese tra 1 e 5 μm di lunghezza e 0,5-1 μm di larghezza. La loro struttura cellulare è caratterizzata dalla presenza di una membrana citoplasmatica interna, un sottile strato di peptidoglicano localizzato nello spazio periplasmatico e una membrana esterna contenente il lipopolisaccaride (LPS), considerato uno dei principali fattori di virulenza di questi microrganismi (Madigan et al., 2018).

Il LPS è costituito da tre componenti principali: il lipide A, responsabile dell'attività endotossica, un core polisaccaridico e una catena polisaccaridica O-specifica. Il riconoscimento del lipide A da parte del sistema immunitario dell'ospite può determinare un'intensa risposta infiammatoria, associata a manifestazioni cliniche quali febbre, ipotensione e, nei casi più gravi, shock settico (Raetz & Whitfield, 2002).

Un'altra caratteristica di numerosi Enterobatteri è la presenza di flagelli, strutture filamentose che conferiscono motilità e che, in molte specie, sono distribuite in modo peritrico sulla superficie cellulare. La motilità rappresenta un elemento importante per la colonizzazione di nuovi ambienti e può contribuire alla capacità infettiva di alcune specie. Un esempio è *Proteus mirabilis*, caratterizzato dalla motilità a sciame (*swarming*), che favorisce la diffusione del microrganismo nel tratto urinario. Questa specie è inoltre associata alla formazione di calcoli urinari grazie alla produzione dell'enzima ureasi (Armbruster & Mobley, 2012).

Tra le altre strutture di interesse si distinguono le fimbrie e i pili, coinvolti principalmente nei processi di adesione alle cellule dell'ospite. Alcuni pili svolgono inoltre un ruolo nella coniugazione batterica, consentendo il trasferimento orizzontale di materiale genetico, compresi eventuali determinanti di resistenza agli antibiotici (Figura 1).

Gli Enterobatteri sono microrganismi asporigeni, incapaci quindi di produrre spore come forme di resistenza alle condizioni ambientali sfavorevoli. Questa caratteristica li distingue da altri generi batterici, come *Bacillus* e *Clostridium*, capaci invece di formare endospore (Madigan et al., 2018).

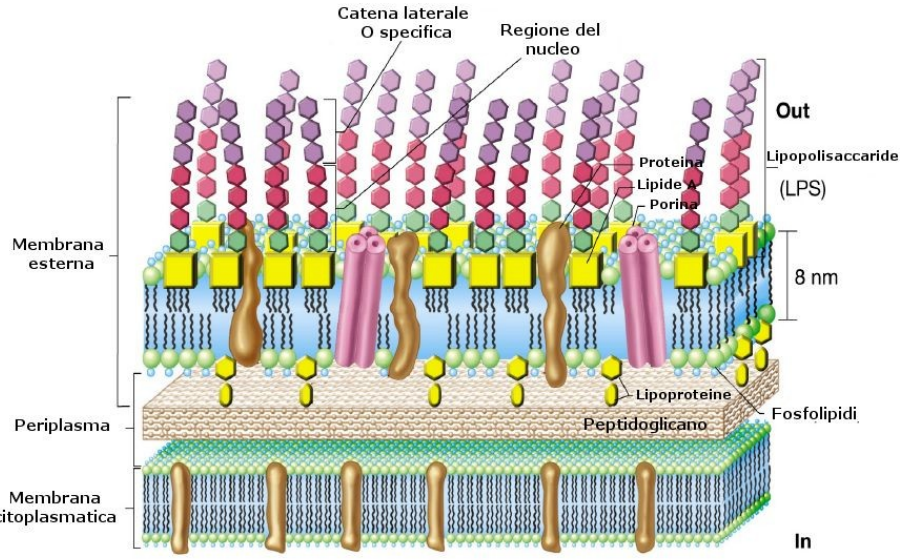


Figura 1: Struttura della membrana esterna dei batteri Gram-negativi (Madigan et al., 2018).

L'ordine degli *Enterobacterales* presenta un'ampia diffusione ecologica e comprende microrganismi isolabili da numerosi ambienti, tra cui acque, suolo, alimenti e tratto gastrointestinale di uomini e animali. Molte specie fanno parte del microbiota intestinale commensale; *E. coli*, ad esempio, rappresenta un componente stabile della flora intestinale normale. In condizioni fisiologiche, le *Enterobacteriaceae* costituiscono una quota relativamente ridotta del microbiota intestinale, il cui equilibrio è garantito dalle interazioni con la complessa comunità microbica residente (Moreira de Gouveia et al., 2024). Questo equilibrio, definito **eubiosi**, è fondamentale per il mantenimento dell'omeostasi intestinale.

Il microbiota contrasta la colonizzazione da parte di microrganismi patogeni attraverso la competizione per i nutrienti e per le nicchie ecologiche disponibili, la produzione di metaboliti ad attività antimicrobica e la continua modulazione del sistema immunitario locale. Tuttavia, quando la composizione della flora commensale viene alterata, ad esempio in seguito a terapie antibiotiche ad ampio spettro o a condizioni patologiche, le *Enterobacteriaceae* possono proliferare eccessivamente rispetto alle altre componenti del microbiota. Tale fenomeno di sovracrescita altera l'equilibrio dell'ecosistema intestinale e determina una condizione di maggiore suscettibilità alla colonizzazione e alla persistenza di microrganismi opportunisti, favorendo lo sviluppo di infezioni invasive (Keith & Pamer, 2019).

Tra le specie di maggiore rilevanza clinica troviamo *E. coli*. Sebbene i ceppi commensali siano generalmente innocui, alcuni patotipi possiedono specifici fattori di virulenza che consentono loro di causare infezioni sia intestinali che extraintestinali. In particolare, i ceppi patogeni extraintestinali (ExPEC) sono frequentemente coinvolti nelle infezioni delle vie urinarie, nelle batteriemie e, in alcuni casi, nelle meningiti neonatali. La loro capacità patogena è associata alla presenza di diversi fattori di

virulenza, tra cui adesine, siderofori, capsule polisaccaridiche e tossine, che favoriscono la colonizzazione dei tessuti e la capacità del batterio di sottrarsi alle difese immunitarie dell'ospite (Kaper et al., 2004; Sarowska et al., 2019).

Un altro enterobatterio patogeno critico è *Klebsiella pneumoniae*, opportunista capace di colonizzare la mucosa intestinale e il rinofaringe, per poi dare origine a infezioni correlate all'assistenza (ICA) come polmoniti nosocomiali, IVU, batteriemie e ascessi epatici. La virulenza di *K. pneumoniae* è legata a una spessa capsula polisaccaridica (che ostacola la fagocitosi), alle fimbrie per l'adesione ai tessuti e alla secrezione di siderofori ad alta affinità per il ferro. A complicare il quadro clinico è l'incessante aumento di ceppi *multidrug resistant* (MDR), in particolare quelli produttori di carbapenemasi (Paczosa & Mecsas, 2016).

Anche le specie appartenenti al complesso *Enterobacter cloacae* giocano un ruolo di primo piano nelle infezioni ospedaliere. Riconosciuti come patogeni opportunisti, causano infezioni urinarie, polmoniti associate a ventilazione meccanica, infezioni di ferite chirurgiche e sepsi.

La loro abilità nel persistere sulle superfici dell'ambiente ospedaliero e la facilità nell'acquisire o esprimere determinanti di resistenza (come le AmpC) li rendono avversari complessi da gestire.

Nel complesso, la capacità degli *Enterobacterales* di causare infezioni dipende non soltanto dalle caratteristiche di virulenza dei singoli ceppi, ma anche dalle condizioni cliniche dell'ospite. Le manifestazioni possono variare da infezioni localizzate, come quelle urinarie e respiratorie, a forme invasive più gravi, tra cui batteriemie e sepsi. Queste ultime assumono particolare rilevanza nei pazienti immunocompromessi, nei soggetti con patologie croniche e nei pazienti sottoposti a lunghi periodi di ospedalizzazione.

1.2 Antimicrobico-resistenza come emergenza globale

L'antimicrobico-resistenza (AMR) rappresenta una delle principali minacce per la sanità pubblica globale. Si verifica quando batteri, virus, funghi e parassiti evolvono fino a non rispondere più ai trattamenti farmacologici standard, rendendo le infezioni più difficili da trattare e aumentando il rischio di complicanze, diffusione e mortalità (WHO, 2022).

Nel contesto specifico delle infezioni batteriche, si parla di **antibiotico-resistenza**, ovvero della capacità dei batteri di sopravvivere o moltiplicarsi a concentrazioni di farmaco solitamente efficaci nei confronti dei ceppi sensibili (Munita & Arias, 2016). Sebbene si tratti di un fenomeno evolutivo naturale, l'utilizzo eccessivo o inappropriato degli antibiotici sia in medicina umana sia in ambito veterinario esercita una forte pressione selettiva sulle popolazioni batteriche.

In questo modo i microrganismi sensibili vengono eliminati, mentre quelli dotati di determinanti di resistenza sopravvivono e proliferano, diventando predominanti soprattutto nei contesti ad alto consumo di antimicrobici (Munita & Arias, 2016).

I batteri contrastano l'azione degli antibiotici attraverso diversi meccanismi molecolari: l'inattivazione o modificazione enzimatica del farmaco, l'alterazione del bersaglio molecolare, la riduzione della permeabilità cellulare e l'attivazione di sistemi di efflusso per espellere il farmaco dalla cellula (Munita & Arias, 2016). La resistenza agli antibiotici si divide in due categorie principali (Blair et al., 2015):

- **Resistenza Intrinseca:** È una caratteristica naturale e innata di una determinata specie batterica, legata alle sue proprietà strutturali, fisiologiche o genetiche, che non richiede l'acquisizione di nuovi geni. Un esempio classico è la resistenza naturale dei batteri Gram-negativi alla vancomicina, dovuta alla presenza della membrana esterna che impedisce all'antibiotico di raggiungere il proprio bersaglio (Blair et al., 2015).

  Un altro esempio è rappresentato da *K. pneumoniae*, che possiede un gene cromosomico codificante per una β-lattamasi a spettro esteso di tipo SHV; per tale motivo, questa specie risulta naturalmente resistente ad ampicillina, amoxicillina, piperacillina e alle cefalosporine a spettro ristretto. Poiché tale forma di resistenza è parte integrante del patrimonio genetico della specie, la sua trasmissione avviene esclusivamente per via verticale, mediante la replicazione e la successiva divisione della cellula batterica.
- **Resistenza Acquisita:** Sviluppata da ceppi appartenenti a specie normalmente sensibili, può derivare da mutazioni genetiche spontanee o dall'acquisizione di materiale genetico esogeno. Dal punto di vista clinico ed epidemiologico riveste un'importanza primaria, poiché i determinanti genetici acquisiti possono diffondersi anche tra specie differenti, portando alla comparsa di ceppi multiresistenti (Blair et al., 2015).

La resistenza acquisita può essere distinta in **resistenza cromosomica** (o costitutiva) e **resistenza extracromosomica** (o trasmissibile), in funzione della natura della modificazione genetica responsabile del fenotipo antibiotico-resistente. La resistenza cromosomica deriva da mutazioni spontanee del patrimonio genetico batterico, che possono determinare alterazioni della permeabilità cellulare o di altri bersagli coinvolti nell'azione dell'antibiotico. Tali mutazioni vengono trasmesse esclusivamente per via verticale, dalla cellula madre alle cellule figlie durante la replicazione. La loro frequenza di insorgenza è relativamente bassa e rappresenta circa il 10-15% di tutte le forme di resistenza acquisita.

Le mutazioni cromosomiche possono essere ulteriormente suddivise in mutazioni **one-step** e **multi-step**. Nel primo caso, una singola mutazione è sufficiente a conferire un elevato livello di resistenza

verso determinati antibiotici, quali chinoloni, streptomicina e rifamicine. Al contrario, le mutazioni multi-step richiedono l'accumulo di più eventi mutazionali affinché si sviluppi il fenotipo resistente; questo meccanismo è stato descritto per diverse classi di antibiotici, tra cui macrolidi, cloramfenicolo e β-lattamici.

La resistenza extracromosomica, invece, rappresenta circa il 90% delle resistenze acquisite fra i batteri Gram-negativi. Essa si diffonde mediante **trasferimento genico orizzontale** (TGO, *Horizontal Gene Transfer*, HGT), attraverso il quale i geni di resistenza vengono trasferiti tra cellule batteriche diverse. Tali geni sono generalmente localizzati su elementi genetici mobili, come plasmidi, batteriofagi e trasposoni, che consentono la diffusione di nuove informazioni genetiche all'interno delle popolazioni batteriche mediante differenti meccanismi (Dehò & Galli, 2019):

1. **Trasformazione:** Acquisizione diretta di frammenti di DNA libero presenti nell'ambiente.
2. **Trasduzione:** Trasferimento di DNA batterico veicolato da virus (batteriofagi).
3. **Coniugazione:** Trasferimento diretto di DNA tra due cellule batteriche tramite contatto cellulare.

La mobilizzazione e l'accumulo dei geni di resistenza sono facilitati dagli **elementi genetici mobili (MGE)** (Partridge et al., 2018):

- **Plasmidi:** Molecole di DNA extracromosomico a replicazione autonoma. Possono codificare per una multiresistenza; in questo modo, l'esposizione a un singolo antibiotico favorisce il mantenimento di geni responsabili della resistenza anche verso altre classi farmacologiche.
- **Trasposoni:** Segmenti di DNA capaci di spostarsi ("saltare") tra differenti regioni del genoma (es. dal cromosoma a un plasmide).
- **Integroni:** Elementi genetici in grado di catturare, integrare ed esprimere cassette geniche di resistenza. Pur non essendo autonomamente mobili, si associano a trasposoni e plasmidi per venire trasferiti.

Negli *Enterobacterales*, l'interazione tra questi elementi genetici favorisce la circolazione di plasmidi recanti geni codificanti beta-lattamasi ad ampio spettro e carbapenemasi, sia all'interno della stessa specie sia tra specie diverse, compromettendo l'efficacia di numerosi antibiotici β-lattamici e limitando le opzioni terapeutiche disponibili (Munita & Arias, 2016; Partridge et al., 2018).

La diffusione globale dell'antimicrobico-resistenza minaccia l'efficacia di molteplici procedure mediche avanzate, tra cui interventi chirurgici, trapianti d'organo e chemioterapie, nei quali la prevenzione delle complicanze infettive è fondamentale (WHO, 2024).

Uno studio epidemiologico pubblicato su *The Lancet* ha stimato che nel 2021 l'AMR batterica sia stata associata a **4,71 milioni di decessi** a livello mondiale, di cui **1,14 milioni direttamente attribuibili** a questo fenomeno (GBD 2021, *Antimicrobial Resistance Collaborators* 2024).

Le stime mostrano anche significative variazioni anagrafiche: a fronte di una riduzione della mortalità associata all'AMR nei bambini sotto i cinque anni, si è registrato un incremento nei soggetti di età pari o superiore a 70 anni.

Di particolare gravità è l'aumento della resistenza ai carbapenemi nei batteri Gram-negativi, i cui decessi associati sono saliti da circa 619.000 nel 1990 ad oltre un milione nel 2021, evidenziando la crescente scarsità di opzioni terapeutiche per le infezioni gravi (GBD 2021, *Antimicrobial Resistance Collaborators* 2024). In ambito ospedaliero, specialmente nei reparti che ospitano pazienti fragili o immunocompromessi, la colonizzazione da parte di microrganismi MDR allunga i tempi di ricovero e costringe all'impiego di farmaci alternativi spesso più tossici e costosi. Per questo motivo, la sorveglianza microbiologica attiva e l'identificazione precoce dei ceppi resistenti rimangono strumenti essenziali per contenere le infezioni correlate all'assistenza (WHO, 2024).

La crescente diffusione di batteri resistenti agli antibiotici ha reso necessaria l'adozione di misure di contenimento che coinvolgano diversi settori, dalla medicina umana a quella veterinaria, fino alla tutela dell'ambiente. Microrganismi come *K. pneumoniae* ed *E. coli* possono infatti circolare tra uomo, animali ed ecosistemi, favorendo la diffusione dei geni di resistenza. La gestione di questo fenomeno richiede pertanto interventi coordinati, rivolti sia alla riduzione dell'impiego inappropriato degli antimicrobici sia al controllo delle possibili vie di trasmissione (O'Neill, 2016).

L'approccio *One Health*, promosso dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e da altre organizzazioni internazionali, si fonda proprio sull'interconnessione tra salute umana, animale e ambientale. La collaborazione tra questi settori consente di affrontare l'antimicrobico-resistenza attraverso programmi condivisi di prevenzione, sorveglianza e controllo. In particolare, il progetto One *Health Joint Plan of Action 2022–2026* individua nella cooperazione multidisciplinare uno degli strumenti necessari per ridurre la diffusione dei microrganismi resistenti e preservare l'efficacia degli antibiotici (WHO et al., 2022).

Nel settore veterinario, l'impiego eccessivo o non giustificato degli antibiotici può esercitare una pressione selettiva sulle popolazioni batteriche, favorendo la sopravvivenza dei ceppi resistenti. Questi possono raggiungere l'uomo attraverso il contatto con gli animali, il consumo di alimenti contaminati o la dispersione di materiale biologico nell'ambiente. Per ridurre tale rischio, l'Unione europea ha introdotto il Regolamento (UE) 2019/6, che limita l'utilizzo profilattico degli antimicrobici negli animali a circostanze eccezionali e ne vieta l'impiego sistematico per compensare condizioni igieniche o pratiche di allevamento inadeguate (Parlamento europeo e Consiglio dell'Unione europea, 2019).

La componente ambientale merita altrettanta attenzione. Gli scarichi ospedalieri, i reflui degli allevamenti e le acque provenienti dalle attività urbane possono contenere residui di antibiotici, batteri

resistenti e materiale genetico associato alla resistenza. Una volta raggiunti i corsi d'acqua o i terreni agricoli, questi contaminanti possono persistere e, in determinate condizioni, favorire la selezione batterica e il trasferimento orizzontale dei geni. Il miglioramento dei sistemi di depurazione, insieme alla gestione dei rifiuti e al monitoraggio degli scarichi, permette di intervenire su alcune delle principali fonti di contaminazione ambientale (WHO, 2022).

Nelle strutture sanitarie, il contenimento dell'antimicrobico-resistenza passa anche attraverso *l'Antimicrobial Stewardship* (AMS), un insieme di programmi destinati a ottimizzare la prescrizione degli antibiotici.

La terapia deve essere scelta considerando il patogeno responsabile dell'infezione, la sua sensibilità ai farmaci, la sede interessata e le condizioni del paziente. Anche il dosaggio, la via di somministrazione e la durata del trattamento devono essere valutati attentamente, evitando prescrizioni non necessarie e l'utilizzo prolungato di antibiotici ad ampio spettro quando non indicato (WHO, 2019). Nella pratica clinica, il trattamento viene spesso avviato prima di conoscere con certezza l'agente eziologico, sulla base dei sintomi, della gravità dell'infezione e dei dati epidemiologici disponibili. Successivamente, l'identificazione del microrganismo e i risultati dell'antibiogramma permettono di rivalutare la scelta iniziale. Qualora il quadro clinico lo consenta, è possibile ricorrere alla de-escalation, sostituendo la terapia empirica con un antibiotico a spettro più ristretto. In questo modo si riduce l'esposizione non necessaria ad altri antimicrobici, mantenendo un trattamento adeguato all'infezione (WHO, 2019).

Il laboratorio di microbiologia clinica fornisce un supporto diretto a queste decisioni attraverso l'isolamento e l'identificazione dei patogeni, l'esecuzione dei test di sensibilità e, quando necessario, la ricerca di specifici meccanismi di resistenza.

Nel caso delle *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi, il riconoscimento delle carbapenemasi permette di caratterizzare meglio gli isolati e di fornire informazioni utili sia per la gestione terapeutica sia per il controllo della loro diffusione.

I dati microbiologici devono comunque essere interpretati insieme alle condizioni cliniche del paziente, poiché la sensibilità osservata *in vitro* non garantisce, da sola, il successo del trattamento.

La prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza richiede inoltre il rispetto di procedure igienico-sanitarie rigorose. La trasmissione dei microrganismi MDR può verificarsi attraverso le mani degli operatori, il contatto tra pazienti o l'utilizzo di dispositivi e superfici contaminati. L'igiene delle mani, la disinfezione degli ambienti, la gestione corretta dei dispositivi invasivi e l'applicazione delle precauzioni da contatto, quando previste, permettono di ridurre il rischio di diffusione all'interno dei reparti.

Queste misure sono particolarmente importanti nei pazienti immunocompromessi, sottoposti a trattamenti antibiotici prolungati o ricoverati in unità ad alta intensità assistenziale (WHO, 2017).
Parallelamente, il Piano sostiene lo sviluppo della ricerca e dell'innovazione nei settori della prevenzione, della diagnostica e delle terapie delle infezioni causate da batteri antibiotico-resistenti. Tra le azioni strategiche previste figurano anche il rafforzamento della cooperazione tra istituzioni, enti di ricerca e organismi internazionali, nonché il consolidamento del ruolo dell'Italia nelle iniziative globali di contrasto all'antibiotico-resistenza.
Infine, il PNCAR sottolinea l'importanza di accrescere la consapevolezza della popolazione sul problema dell'uso responsabile degli antibiotici e di promuovere percorsi formativi rivolti agli operatori sanitari, veterinari e ambientali, considerati elementi fondamentali per il successo delle strategie di contenimento dell'AMR (Ministero della Salute, 2023).
L'antibiotico-resistenza non si manifesta necessariamente con le stesse caratteristiche in tutti i microrganismi. Anche all'interno di una medesima specie batterica, infatti, possono essere osservate differenze significative nella sensibilità agli antibiotici, con isolati che conservano la sensibilità a numerosi farmaci e altri che presentano profili di resistenza molto più estesi. Queste differenze, evidenziabili attraverso i test di sensibilità antimicrobica, costituiscono un elemento importante per la caratterizzazione degli isolati batterici e per la loro valutazione in ambito clinico e microbiologico (Magiorakos et al., 2012).

1.3 Definizione di MDR, XDR e PDR

Per definire la non sensibilità agli antimicrobici, un isolato batterico è considerato non suscettibile quando classificato come **resistente (R)** oppure **sensibile con aumentata esposizione/intermedio (I)**, sulla base dei **breakpoint clinici** e non dei **cut-off epidemiologici (ECOFF)**. I criteri interpretativi adottati sono quelli forniti dall'**European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)**, dal **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** e, ove applicabile, dalla **Food and Drug Administration (FDA)** statunitense (CLSI 2009; EUCAST).
Pertanto, la classificazione dei microrganismi in base al loro profilo di resistenza agli antibiotici permette di distinguere differenti livelli di multiresistenza e di valutarne le implicazioni cliniche ed epidemiologiche. A questo scopo, hanno proposto tre definizioni standardizzate: *multidrug-resistant* (MDR), *extensively drug-resistant* (XDR) e *pandrug-resistant* (PDR) (Magiorakos et al. 2012).
Gli isolati **MDR** presentano una non sensibilità acquisita ad almeno un agente appartenente a tre o più categorie di antimicrobici. Questa condizione può limitare le possibilità terapeutiche ed è frequentemente riscontrata in patogeni di interesse clinico, tra cui *K. pneumoniae, E. coli,*

Acinetobacter baumannii e Pseudomonas aeruginosa. Alcuni di questi ceppi possono produrre β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) o carbapenemasi, conferendo resistenza ai β-lattamici (Magiorakos et al., 2012; Di Franco et al., 2021).

La definizione **XDR** identifica invece i batteri non sensibili ad almeno un antibiotico in tutte le categorie considerate, ad eccezione di una o due; essi rimangono quindi sensibili soltanto ad agenti appartenenti a una o due categorie. Le alternative terapeutiche risultano quindi fortemente limitate.

Il livello più esteso è rappresentato dagli isolati PDR, caratterizzati dalla non sensibilità a tutti gli antibiotici appartenenti a tutte le categorie previste per la specie batterica (Magiorakos et al., 2012). Infatti, dal prefisso greco 'pan', che significa 'tutto', *pandrug resistant* (PDR) significa 'resistente a tutti gli agenti antimicrobici' testati. Dal punto di vista clinico, questi profili possono rendere più complessa la gestione delle infezioni, mentre in ambito epidemiologico consentono di confrontare i dati di antibiotico-resistenza e monitorare la circolazione dei ceppi multiresistenti nelle strutture sanitarie.

Tra i diversi meccanismi responsabili dell'acquisizione di profili di multiresistenza, particolare interesse riveste l'inattivazione enzimatica degli antibiotici β-lattamici, ampiamente utilizzati nel trattamento delle infezioni batteriche. Nelle *Enterobacterales*, la produzione di β-lattamasi può compromettere l'efficacia di numerosi farmaci appartenenti a questa classe, contribuendo alla comparsa di fenotipi di resistenza di notevole interesse clinico (Bush & Bradford, 2020).

1.4 Antibiotici β-lattamici e β-lattamasi

Gli antibiotici β-lattamici costituiscono una delle classi di antimicrobici maggiormente impiegate nella pratica clinica, grazie alla loro attività su un ampio spettro di batteri Gram-positivi e Gram-negativi. La loro struttura è caratterizzata da un anello β-lattamico a quattro atomi, essenziale per l'azione battericida. In base alla conformazione chimica, si distinguono quattro gruppi principali: penicilline, cefalosporine, carbapenemi e monobattami. Pur condividendo il medesimo nucleo, tali molecole differiscono per spettro d'azione, stabilità alle β-lattamasi e proprietà farmacologiche (Bush & Bradford, 2020) (Figura 2).

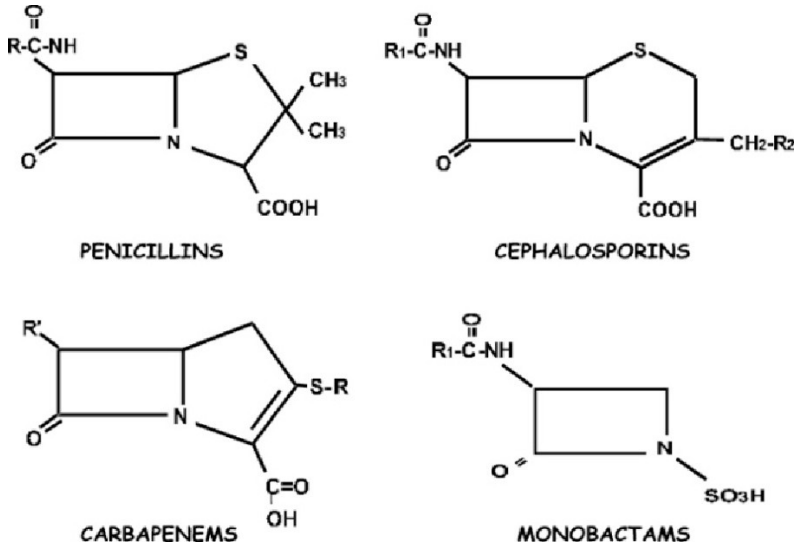


Figura 2: Confronto tra le strutture di base delle principali classi di antibiotici β-lattamici (penicilline, cefalosporine, carbapenemi e monobattami). L'anello β-lattamico costituisce il nucleo comune di tutte le molecole ed è associato a differenti strutture adiacenti che caratterizzano ciascuna classe antibiotica (Katzung, 2009).

Tra le principali classi di antibiotici β-lattamici rientrano le **penicilline**, come la penicillina G, l'ampicillina e la piperacillina, e le **cefalosporine**, suddivise in diverse generazioni sulla base delle loro caratteristiche microbiologiche e del periodo di introduzione. Tra queste si distinguono cefotaxime e ceftazidime, appartenenti alla terza generazione, e cefepime, appartenente alla quarta.
I **carbapenemi**, tra cui imipenem, meropenem ed ertapenem, sono caratterizzati da un ampio spettro d'azione e vengono impiegati principalmente nel trattamento di infezioni gravi, comprese quelle causate da microrganismi multiresistenti. Infine, i **monobattami**, di cui l'aztreonam rappresenta il principale esponente, si distinguono per la presenza di un unico anello β-lattamico e per un'attività antibatterica rivolta prevalentemente ai batteri Gram-negativi aerobi (Bush & Bradford, 2020).
Il meccanismo d'azione degli antibiotici β-lattamici si basa sull'inibizione della sintesi del peptidoglicano, un componente fondamentale della parete cellulare batterica, responsabile del mantenimento della forma, della rigidità e della resistenza alle variazioni della pressione osmotica.
Il peptidoglicano è costituito da catene polisaccaridiche formate dall'alternanza di N-acetilglucosamina (NAG) e acido N-acetilmuramico (NAM), collegate tra loro attraverso brevi catene peptidiche che conferiscono stabilità alla struttura. Gli antibiotici β-lattamici interferiscono con le fasi finali della sintesi della parete cellulare, legandosi alle *penicillin-binding proteins* (PBP), enzimi coinvolti nell'assemblaggio e nella maturazione del peptidoglicano. In particolare, questi antibiotici

inibiscono l'attività transpeptidasica delle PBP, impedendo la formazione dei legami crociati tra le catene peptidiche adiacenti, necessari per garantire la resistenza meccanica della parete batterica.
La mancata formazione di questi legami determina un progressivo indebolimento della parete cellulare, che diventa incapace di contrastare efficacemente la pressione osmotica interna. Nei batteri in fase di crescita e divisione, l'alterazione della struttura del peptidoglicano può quindi provocare la rottura della parete e la conseguente lisi cellulare, determinando l'effetto battericida caratteristico di questa classe di antibiotici (Sauvage et al., 2008) (Figura 3).

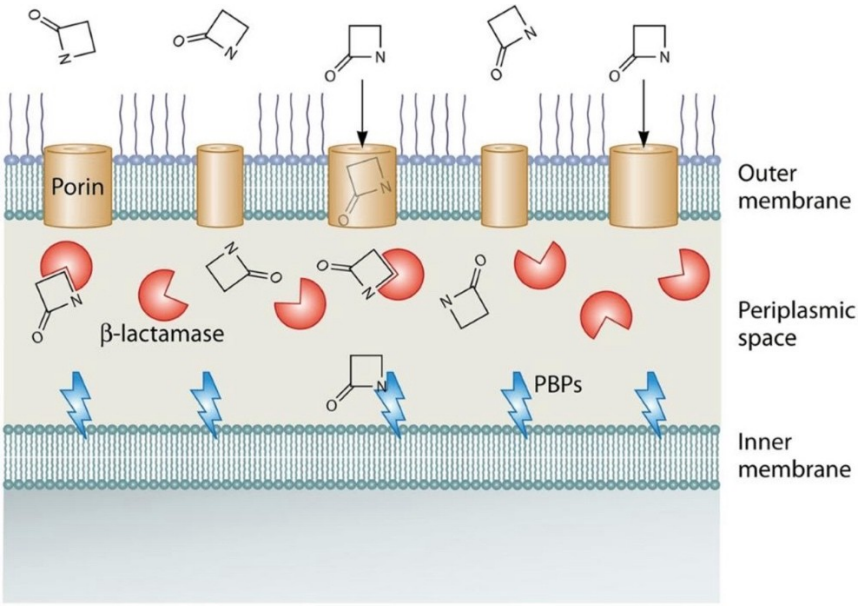


Figura 3: Rappresentazione schematica dell'involucro cellulare dei batteri Gram-negativi e dei meccanismi coinvolti nell'azione degli antibiotici β-lattamici. Gli antibiotici attraversano la membrana esterna attraverso le porine e raggiungono lo spazio periplasmatico, dove possono legarsi alle penicillin-binding proteins (PBP), inibendo la sintesi del peptidoglicano. All'interno dello spazio periplasmatico, le β-lattamasi possono idrolizzare l'anello β-lattamico, inattivando l'antibiotico e impedendone l'azione sulle PBP (Bush & Bradford, 2020).

La resistenza agli antibiotici β-lattamici può essere determinata da diversi meccanismi, tra cui le modificazioni delle *penicillin-binding proteins* (PBP), che riducono l'affinità dell'antibiotico per il proprio bersaglio, e le alterazioni della permeabilità della membrana esterna, dovute principalmente alla perdita o alla modificazione delle porine, che ostacolano l'ingresso del farmaco nella cellula batterica. Un ulteriore meccanismo è rappresentato dall'aumentata espressione delle pompe di efflusso, sistemi di trasporto che favoriscono l'espulsione dell'antibiotico, riducendone la concentrazione intracellulare.

Nell'ordine delle *Enterobacterales*, uno dei principali meccanismi di resistenza ai β-lattamici è rappresentato dalla produzione di β-lattamasi, enzimi localizzati prevalentemente nello spazio periplasmatico, capaci di catalizzare l'idrolisi del legame ammidico dell'anello β-lattamico.
Questa reazione determina l'inattivazione della molecola antibiotica, impedendone il legame alle PBP e, di conseguenza, l'inibizione della sintesi del peptidoglicano (Figura 4).
I geni responsabili della produzione di questi enzimi possono essere localizzati sul cromosoma batterico oppure su elementi genetici mobili, in particolare plasmidi, che ne favoriscono il trasferimento orizzontale tra microrganismi appartenenti anche a specie differenti, contribuendo alla diffusione dell'antibiotico-resistenza (Bush & Bradford, 2020).

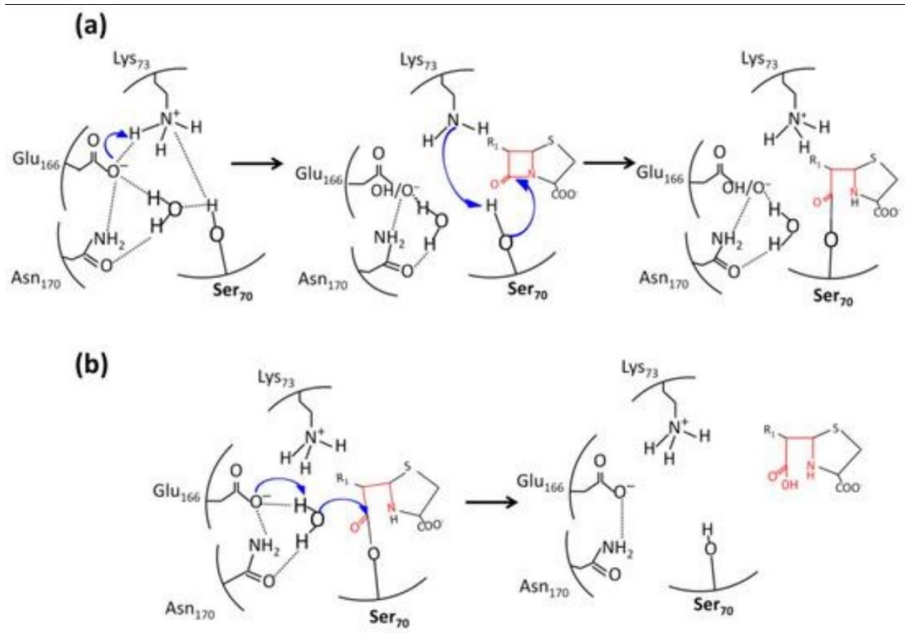


Figura 4: Meccanismo catalitico di inattivazione dei β-lattamici ad opera delle serina-β-lattamasi. (a) Formazione dell'intermedio acil-enzima covalente mediante attacco nucleofilo del residuo di serina nel sito attivo (Ser70) sul carbonile β-lattamico. (b) Fase di deacilazione e idrolisi dell'intermedio con conseguente rigenerazione dell'enzima attivo e rilascio del farmaco inattivato (Adattato da Tooke et al., 2019).

1.4.1 Classificazione delle β-lattamasi

Per distinguere le diverse tipologie di β-lattamasi, sono stati sviluppati sistemi di classificazione basati sulle loro caratteristiche molecolari e funzionali. Tra i principali si distinguono la classificazione molecolare di Ambler e quella funzionale di Bush-Jacoby, che consentono di

suddividere questi enzimi in gruppi differenti sulla base delle loro caratteristiche strutturali, del meccanismo catalitico e del profilo di attività nei confronti degli antibiotici β-lattamici.

Dal punto di vista molecolare, la **classificazione di Ambler** suddivide le β-lattamasi in quattro classi, indicate con le lettere A, B, C e D, valutando l'omologia della sequenza proteica. Le classi A, C e D comprendono enzimi che utilizzano un residuo di serina presente nel sito attivo per catalizzare l'idrolisi dell'anello β-lattamico. La classe B, invece, comprende le metallo-β-lattamasi, enzimi la cui attività catalitica dipende dalla presenza di uno o due ioni zinco nel sito attivo (Bush & Jacoby, 2010). Questa distinzione assume particolare importanza poiché le differenze strutturali e catalitiche influenzano anche la sensibilità degli enzimi ai diversi inibitori delle β-lattamasi.

Accanto alla classificazione molecolare, la **classificazione funzionale di Bush-Jacoby** prende in considerazione le proprietà biochimiche degli enzimi, distinguendoli principalmente in base agli antibiotici che sono in grado di idrolizzare e alla loro sensibilità nei confronti di specifici inibitori.

I due sistemi risultano quindi complementari, poiché permettono di descrivere sia le caratteristiche molecolari delle β-lattamasi sia il loro comportamento nei confronti delle diverse classi di antibiotici (Bush & Jacoby, 2010; Bush & Bradford, 2020) (Figura 5).

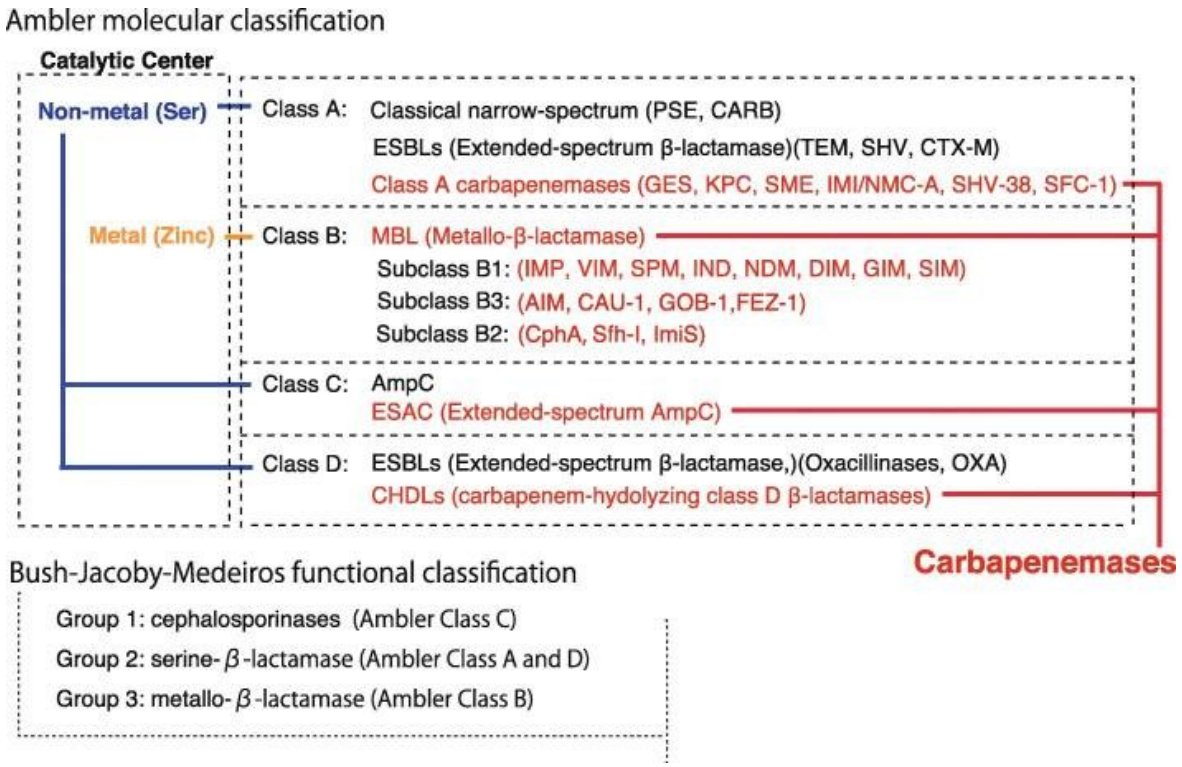


Figura 5: Classificazione delle β-lattamasi secondo i sistemi di Ambler e Bush–Jacoby–Medeiros, con indicazione delle principali famiglie enzimatiche e delle carbapenemasi appartenenti alle classi A, B e D (Sawa et al.2020).

Tra le β-lattamasi di maggiore interesse clinico rientrano le **β-lattamasi a spettro esteso**, comunemente indicate con l'acronimo ESBL (*Extended-Spectrum β-Lactamases*). Questi enzimi appartengono prevalentemente alla classe A di Ambler e comprendono principalmente varianti delle famiglie TEM, SHV e CTX-M. La loro importanza è legata alla capacità di idrolizzare un'ampia gamma di antibiotici β-lattamici, tra cui penicilline, cefalosporine a spettro esteso, in particolare quelle di terza generazione come cefotaxime, ceftriaxone e ceftazidime, e il monobattame aztreonam. Tale attività enzimatica determina una riduzione dell'efficacia di numerosi antibiotici comunemente impiegati nel trattamento delle infezioni sostenute da batteri Gram-negativi.
Una caratteristica delle ESBL è la loro sensibilità agli inibitori delle β-lattamasi, come l'acido clavulanico, che può bloccarne l'attività enzimatica. Questi enzimi, inoltre, non sono generalmente in grado di idrolizzare i carbapenemi, che mantengono quindi la propria attività nei confronti dei ceppi produttori di sole ESBL.
La diffusione di questi determinanti di resistenza rappresenta un problema rilevante soprattutto nelle *Enterobacterales*, in particolare in specie come *E. coli* e *K. pneumoniae*, frequentemente coinvolte in infezioni urinarie, respiratorie e del torrente ematico. La localizzazione dei geni codificanti su plasmidi favorisce inoltre la loro diffusione attraverso il trasferimento genico orizzontale, contribuendo alla comparsa di ceppi resistenti a più classi di antibiotici (Bush & Bradford, 2020).

Un ulteriore gruppo di β-lattamasi di rilevanza clinica è rappresentato dagli **enzimi di tipo AmpC**, appartenenti alla classe C di Ambler. Un residuo di serina è contenuto nel sito attivo sia delle AmpC che delle ESBL, ma le sequenze proteiche di ciascuna classe sono notevolmente diverse, portando a differenze strutturali nell'idrolisi dei β-lattamici (Jacoby, 2009). Nello schema di classificazione funzionale delle β-lattamasi (Bush–Jacoby), basato sui profili di idrolisi e inibizione dell'enzima, le AmpC sono assegnate al gruppo 1, caratterizzato da una maggiore idrolisi complessiva delle cefalosporine (incluse le cefamicine) rispetto alla penicillina G (da cui il nome "cefalosporinasi" che è stato utilizzato anche per questi enzimi) e dalla resistenza all'inibizione da parte di inibitori delle β-lattamasi, come clavulanato, sulbactam e tazobactam (Bush & Jacoby, 2010).
I geni responsabili della produzione delle AmpC possono essere localizzati sul cromosoma batterico oppure su plasmidi, queste rappresentano due situazioni distinte, sia dal punto di vista microbiologico che clinico.
In alcune specie appartenenti all'ordine delle *Enterobacterales*, come *Enterobacter cloacae* complex e *Citrobacter freundii*, l'espressione delle AmpC cromosomiche è regolata da meccanismi inducibili, attraverso i quali la produzione enzimatica può aumentare in risposta all'esposizione a determinati antibiotici β-lattamici.

Alterazioni dei sistemi di regolazione possono inoltre determinare una produzione elevata e costitutiva dell'enzima, fenomeno noto come derepressione, che comporta una riduzione della sensibilità a numerosi antibiotici.
Sebbene le AmpC non possiedano generalmente un'attività carbapenemasica significativa, la loro iperproduzione, quando associata a modificazioni della permeabilità della membrana esterna, può contribuire a ridurre la sensibilità anche nei confronti dei carbapenemi. In particolare, la perdita o la modificazione delle porine limita l'ingresso dell'antibiotico nello spazio periplasmatico, favorendo l'azione degli enzimi β-lattamasici e contribuendo allo sviluppo di fenotipi di resistenza più complessi (Bush & Bradford, 2020).

1.4.2 Carbapenemasi

Le carbapenemasi presentano caratteristiche molecolari e biochimiche differenti, che ne influenzano l'attività idrolitica nei confronti degli antibiotici β-lattamici. Secondo la classificazione di Ambler, le principali carbapenemasi di interesse clinico appartengono alle classi A, B e D. Le classi A e D comprendono enzimi che utilizzano un residuo di serina nel sito attivo, mentre la classe B comprende le metallo-β-lattamasi, la cui attività catalitica dipende dalla presenza di ioni zinco.
Questa distinzione assume particolare rilevanza dal punto di vista clinico, poiché le diverse famiglie enzimatiche presentano profili di sensibilità differenti nei confronti degli inibitori delle β-lattamasi (Figura 6).

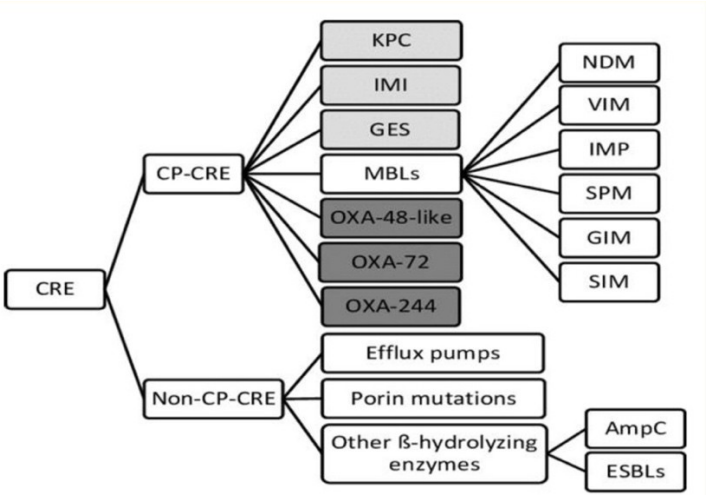


Figura 6: Classificazione delle Carbapnemasi
(Suay-García e Pérez-Gracia, 2019).

In questo contesto, è importante distinguere gli isolati di *Enterobacterales* **resistenti ai carbapenemi** (**CRE**, *Carbapenem-Resistant* Enterobacterales) dai ceppi di *Enterobacterales* **produttori di carbapenemasi** (**CPE,** *Carbapenemase-Producing* Enterobacterales). I ceppi CRE manifestano

resistenza ai carbapenemi, indipendentemente dal meccanismo attraverso cui tale resistenza viene acquisita.
Gli isolati CPE, invece, sono ceppi CRE capaci di produrre carbapenemasi.
Sulla base dei valori di MIC e dei criteri interpretativi definiti dall'EUCAST, vengono distinti i concetti di **CRE** e **CPE**, termini frequentemente utilizzati come equivalenti ma che identificano condizioni microbiologiche differenti. I ceppi **CRE** presentano valori di MIC che superano sia gli ECOFF introdotti (*Epidemiological Cut-off*) sia i breakpoint clinici stabiliti per questi antibiotici, determinando la classificazione del microrganismo come resistente. Generalmente, i ceppi CRE mostrano una ridotta suscettibilità verso più carbapenemi, spesso nei confronti dell'intera classe.

Gli isolati **CPE** sono invece produttori di carbapenemasi, indipendentemente dal profilo di sensibilità osservato. La presenza dell'enzima può essere rilevata anche in isolati che conservano una sensibilità clinica ai carbapenemi. In questi casi, i valori di MIC risultano superiori agli ECOFF, suggerendo l'acquisizione di un meccanismo di resistenza, ma rimangono inferiori ai breakpoint clinici, consentendo ancora la classificazione dell'isolato come sensibile o sensibile con aumentata esposizione (Werner et al., 2022).Pertanto, mentre tutti i ceppi CRE sono caratterizzati da una ridotta suscettibilità ai carbapenemi, non tutti i CPE presentano necessariamente una resistenza clinicamente evidente, soprattutto nelle fasi iniziali di acquisizione ed espressione dei meccanismi enzimatici responsabili della resistenza (Werner et al., 2022). Tra le carbapenemasi maggiormente diffuse si distinguono le KPC, appartenenti alla classe A, le metallo-β-lattamasi NDM, VIM e IMP, appartenenti alla classe B, e gli enzimi OXA-48-like, appartenenti alla classe D (Queenan & Bush, 2007; Tooke et al., 2019).

1.4.2.1 Carbapenemasi di classe A: KPC

Le carbapenemasi di classe A appartengono al gruppo delle serina-β-lattamasi e sono caratterizzate dalla presenza di un residuo di serina nel sito attivo, coinvolto nel processo di idrolisi dell'anello β-lattamico. Tra gli enzimi appartenenti a questa classe, quelli di maggiore rilevanza clinica ed epidemiologica sono le KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemases*), inizialmente identificate in ceppi di *K. pneumoniae*, ma successivamente riscontrate anche in altre specie appartenenti all'ordine delle *Enterobacterales*. Le KPC possiedono un ampio spettro di attività idrolitica, che comprende penicilline, cefalosporine, monobattami e carbapenemi.
La loro capacità di inattivare antibiotici appartenenti a diverse classi limita considerevolmente le possibilità terapeutiche nelle infezioni sostenute da isolati produttori di questi enzimi. Tuttavia, il

livello di resistenza osservato può variare in relazione alla specifica variante enzimatica, alla quantità di enzima prodotto e alla presenza di ulteriori meccanismi di resistenza, come le alterazioni della permeabilità della membrana esterna.

Dal punto di vista terapeutico, le KPC presentano una sensibilità limitata agli inibitori tradizionali delle β-lattamasi, come l'acido clavulanico e il tazobactam, che non garantiscono generalmente un'inibizione clinicamente efficace. Al contrario, inibitori più recenti, tra cui avibactam, relebactam e vaborbactam, possiedono un'attività significativa nei confronti di numerose varianti KPC. L'introduzione di combinazioni antibiotiche contenenti questi inibitori ha ampliato le possibilità di trattamento delle infezioni sostenute da ceppi di *Enterobacterales* produttori KPC.

Tuttavia, la comparsa di varianti enzimatiche associate a una ridotta sensibilità ad alcuni di questi farmaci rappresenta un'ulteriore problematica clinica (Tooke et al., 2019).

Dal punto di vista genetico, la produzione di KPC è determinata dalla presenza di geni appartenenti alla famiglia bla_{KPC}, frequentemente localizzati su plasmidi. Questi elementi genetici possono appartenere a differenti gruppi di incompatibilità e favorire il trasferimento dei determinanti di resistenza tra isolati appartenenti anche a specie differenti. Un ruolo particolarmente importante nella diffusione dei geni bla_{KPC} è svolto dal trasposone Tn4401, un elemento genetico mobile capace di contribuire alla mobilizzazione del gene tra differenti strutture genetiche. Tuttavia, bla_{KPC} può essere associato anche ad altri contesti genetici, a conferma della notevole variabilità dei meccanismi coinvolti nella sua disseminazione.

La diffusione delle KPC è sostenuta sia dal trasferimento orizzontale dei geni di resistenza sia dalla propagazione clonale di specifici ceppi batterici. In particolare, un ruolo storico di grande importanza è stato svolto da isolati di *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 (ST258), appartenente al complesso clonale 258, che ha contribuito alla diffusione internazionale delle KPC e alla loro affermazione in numerosi contesti ospedalieri. Accanto a questo clone, altri *lineage* batterici hanno progressivamente acquisito rilevanza epidemiologica, dimostrando come la distribuzione delle KPC sia il risultato dell'interazione tra diffusione clonale e mobilità degli elementi genetici di resistenza.

Oltre alle KPC, la classe A comprende altre carbapenemasi, tra cui SME (*Serratia marcescens enzyme*), IMI (*imipenem-hydrolyzing β-lactamase*) e NMC-A (*non-metallo carbapenemase*).

Questi enzimi sono generalmente meno diffusi rispetto alle KPC e, in diversi casi, risultano codificati da geni cromosomici. Sebbene siano meno frequentemente coinvolti in eventi epidemici di ampia diffusione, rappresentano ulteriori esempi della diversità molecolare e funzionale delle carbapenemasi di classe A (Queenan & Bush, 2007).

L'identificazione dei ceppi di *Enterobacterales* produttori di KPC assume particolare importanza per la corretta interpretazione dei profili di resistenza. Alcune varianti enzimatiche possono infatti essere

associate a livelli differenti di sensibilità ai carbapenemi e a fenotipi non sempre facilmente riconoscibili attraverso i soli test di sensibilità antibiotica. Per questo motivo, l'impiego di metodiche specifiche per la rilevazione delle carbapenemasi può risultare necessario per confermare il meccanismo di resistenza presente nel microrganismo.

1.4.2.2 Carbapenemasi di classe B: NDM, VIM e IMP

Le carbapenemasi di classe B, comunemente definite metallo-β-lattamasi (MBL), si distinguono dalle serina-carbapenemasi per il diverso meccanismo catalitico. Questi enzimi necessitano della presenza di uno o due ioni zinco nel sito attivo, che partecipano all'attivazione di una molecola d'acqua coinvolta nell'idrolisi dell'anello β-lattamico. A differenza delle carbapenemasi di classe A, quindi, il processo di inattivazione dell'antibiotico non prevede la formazione di un intermedio covalente acil-enzima. Le metallo-β-lattamasi sono in grado di idrolizzare numerosi antibiotici β-lattamici, compresi i carbapenemi, ma non possiedono generalmente attività idrolitica nei confronti dei monobattami, come l'aztreonam.

Tuttavia, i microrganismi produttori di questi enzimi possono risultare resistenti anche all'aztreonam quando producono contemporaneamente altre β-lattamasi capaci di inattivarlo.

Un'ulteriore caratteristica delle metallo-β-lattamasi è rappresentata dalla mancata inibizione da parte di diversi inibitori utilizzati contro le serina-β-lattamasi, tra cui avibactam, relebactam e vaborbactam. Tale differenza è direttamente correlata alle caratteristiche del sito catalitico e assume particolare importanza nella scelta delle strategie terapeutiche.

Tra le principali metallo-β-lattamasi riscontrate nelle *Enterobacterales* si distinguono le famiglie NDM (*New Delhi metallo-β-lactamase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*) e IMP (*imipenemase*). Questi enzimi presentano caratteristiche molecolari differenti, ma condividono la capacità di compromettere l'efficacia dei carbapenemi.

Le NDM sono codificate da geni appartenenti alla famiglia $bla_{NDM,}$ frequentemente localizzati su plasmidi che ne favoriscono la diffusione tra differenti specie batteriche. La presenza di questi geni in diversi contesti genetici ha contribuito alla loro distribuzione internazionale, rendendo le NDM una delle famiglie di metallo-β-lattamasi di maggiore interesse clinico.

Le VIM e le IMP sono anch'esse associate a importanti fenomeni di resistenza ai carbapenemi.

I rispettivi geni, bla_{VIM} e bla_{IMP}, possono essere localizzati all'interno di cassette geniche associate a integroni, in particolare di classe 1, che favoriscono l'acquisizione e l'organizzazione di diversi determinanti di resistenza. La presenza di tali strutture su elementi genetici trasferibili contribuisce ulteriormente alla diffusione di questi enzimi.

La produzione di metallo-β-lattamasi rappresenta quindi un problema rilevante per il trattamento delle infezioni sostenute da isolati di *Enterobacterales* MDR, soprattutto per la capacità di questi enzimi di inattivare i carbapenemi e per la limitata attività nei loro confronti di numerosi inibitori delle β-lattamasi (Queenan & Bush, 2007; Tooke et al., 2019).

1.4.2.3 Carbapenemasi di classe D: OXA-48-like

Le carbapenemasi di classe D appartengono alla famiglia delle β-lattamasi di tipo OXA, così denominate per la capacità originariamente osservata in diversi enzimi di questa classe di idrolizzare l'oxacillina e la cloxacillina. Analogamente alle carbapenemasi di classe A, utilizzano un residuo di serina nel sito attivo per catalizzare l'idrolisi dell'anello β-lattamico, ma presentano caratteristiche strutturali e funzionali differenti. Tra gli enzimi di classe D di maggiore rilevanza clinica nelle *Enterobacterales* rientrano le carbapenemasi OXA-48-like, un gruppo che comprende OXA-48 e numerose varianti correlate. Questi enzimi sono caratterizzati da un profilo di attività idrolitica peculiare, che comprende generalmente penicilline e carbapenemi, mentre l'attività nei confronti delle cefalosporine a spettro esteso risulta spesso limitata.

L'efficienza idrolitica delle carbapenemasi OXA-48-like può variare considerevolmente tra le diverse varianti enzimatiche. Alcune possiedono un'attività relativamente debole nei confronti di determinati carbapenemi, mentre altre presentano caratteristiche differenti, che possono influenzare il fenotipo di resistenza osservato.

Dal punto di vista genetico, i geni appartenenti alla famiglia $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ possono essere associati a plasmidi ed elementi genetici mobili che ne favoriscono la diffusione. In particolare, il gene $bla_{OXA\text{-}48}$ è stato frequentemente identificato su plasmidi appartenenti al gruppo IncL, associati alla sua disseminazione tra differenti specie di *Enterobacterales*.

La rilevazione delle carbapenemasi OXA-48-like può presentare particolari difficoltà diagnostiche, poiché alcuni ceppi produttori possono mostrare valori di concentrazione minima inibente (MIC) dei carbapenemi relativamente bassi, soprattutto in assenza di ulteriori meccanismi di resistenza.

Inoltre, la produzione contemporanea di ESBL o la presenza di alterazioni delle porine può modificare significativamente il profilo di sensibilità antibiotica. Per queste ragioni, l'identificazione delle carbapenemasi OXA-48-like richiede particolare attenzione nell'interpretazione dei risultati microbiologici e può rendere necessario il ricorso a metodiche specifiche per la rilevazione dell'attività carbapenemasica o degli enzimi responsabili (Tooke et al., 2019).

1.5 Epidemiologia internazionale e contesto italiano

La diffusione dei ceppi di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) rappresenta una delle principali problematiche associate all'antimicrobico-resistenza, soprattutto nell'ambito delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria. Negli ultimi due decenni, l'epidemiologia degli isolati CPE ha subito importanti cambiamenti, caratterizzati da una progressiva espansione geografica e dalla comparsa di differenti profili di distribuzione delle carbapenemasi nelle diverse aree del mondo. La circolazione dei ceppi di CPE è stata documentata in numerosi Paesi, con livelli di diffusione variabili in relazione al contesto geografico, alle caratteristiche delle strutture sanitarie e alle misure di prevenzione e controllo delle infezioni adottate. La diffusione internazionale è stata favorita sia dalla trasmissione di cloni batterici ad alto rischio sia dal trasferimento orizzontale dei geni codificanti per le carbapenemasi, frequentemente localizzati su elementi genetici mobili. Anche i trasferimenti clonali fra pazienti nelle strutture sanitarie e la mobilità internazionale hanno contribuito all'introduzione di questi isolati in aree precedentemente caratterizzate da una circolazione limitata (ECDC, 2025).

La distribuzione delle CPE presenta importanti differenze in relazione alle famiglie enzimatiche coinvolte. Le carbapenemasi KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) hanno avuto un ruolo significativo nella diffusione della resistenza ai carbapenemi, soprattutto in isolati di *K. pneumoniae*. Descritte per la prima volta nel 1996 in North Carolina (USA) in un isolato di *K. pneumoniae*, si sono rapidamente affermate come la variante predominante nel contesto nordamericano, dove continuano a costituire la principale causa di resistenza ai carbapenemi in ambito ospedaliero (Ding et al., 2021). A partire dagli anni 2000, le KPC hanno progressivamente esteso la loro diffusione su scala globale, sostenute dalla mobilità internazionale dei pazienti e dal trasferimento inter-ospedaliero di soggetti colonizzati o infetti.

In Europa, tale diffusione ha assunto carattere endemico in alcuni Paesi, tra cui Italia e Grecia, dove i tassi di prevalenza nelle strutture ospedaliere (in particolare nelle unità di terapia intensiva) hanno raggiunto livelli particolarmente elevati (Bassetti et al., 2020) (Figura 7).

Un ruolo chiave nella disseminazione internazionale delle KPC è stato svolto dal clone epidemico *K. pneumoniae* ST258, appartenente al clonal complex 258 (CC258) (Budia-Silva et al., 2024).

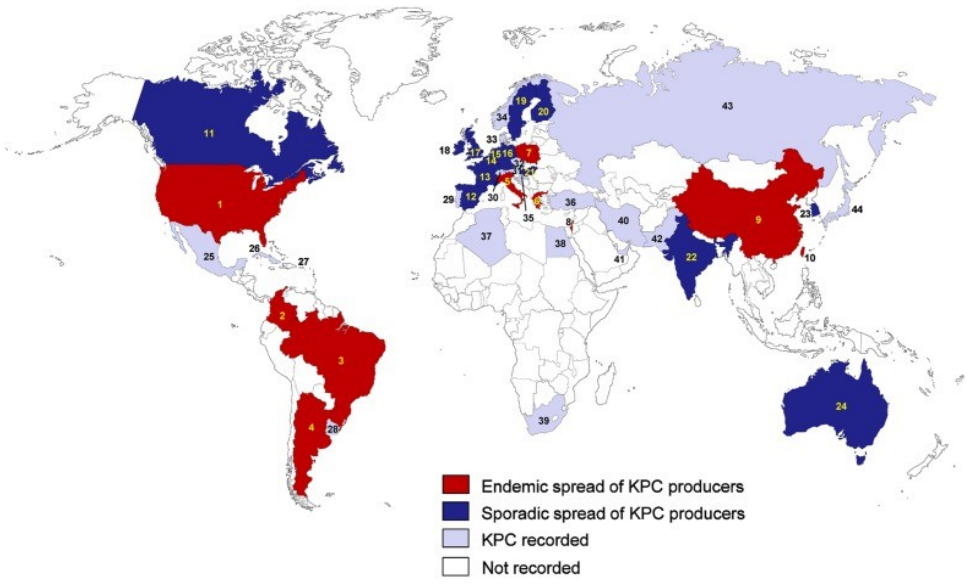


Figura 7: Caratteristiche epidemiologiche di *K. pneumoniae* produttrice di KPC (Lee et al., 2016)

Tra le metallo-β-lattamasi, le NDM (*New Delhi metallo-β-lactamase*) hanno assunto una crescente rilevanza epidemiologica per la loro rapida diffusione internazionale. Identificate per la prima volta nel 2008 in un paziente precedentemente ospedalizzato in India, queste carbapenemasi sono state inizialmente associate al subcontinente indiano, considerato una delle principali aree di diffusione. Negli anni successivi, la loro presenza è stata documentata in numerosi Paesi europei, in Medio Oriente e in altre regioni del mondo, evidenziando una progressiva espansione geografica (Wu et al., 2019). A differenza delle KPC, la cui diffusione è stata storicamente associata a specifici cloni epidemici di *K. pneumoniae*, le NDM sono state identificate in ceppi di diverse specie di *Enterobacterales*, tra cui *K. pneumoniae*, *E. coli* ed *Enterobacter* spp. La loro circolazione non riguarda esclusivamente l'ambiente ospedaliero, ma interessa anche il contesto comunitario, rendendo più complessa la ricostruzione delle modalità di diffusione e il controllo della trasmissione (Lee et al., 2016).

La crescente presenza di isolati di *Enterobacterales* produttrici di NDM anche in Paesi nei quali queste carbapenemasi erano precedentemente poco diffuse evidenzia l'importanza di una sorveglianza epidemiologica continua, finalizzata a monitorarne la distribuzione e a individuare tempestivamente eventuali cambiamenti nei profili di circolazione (Figura 8).

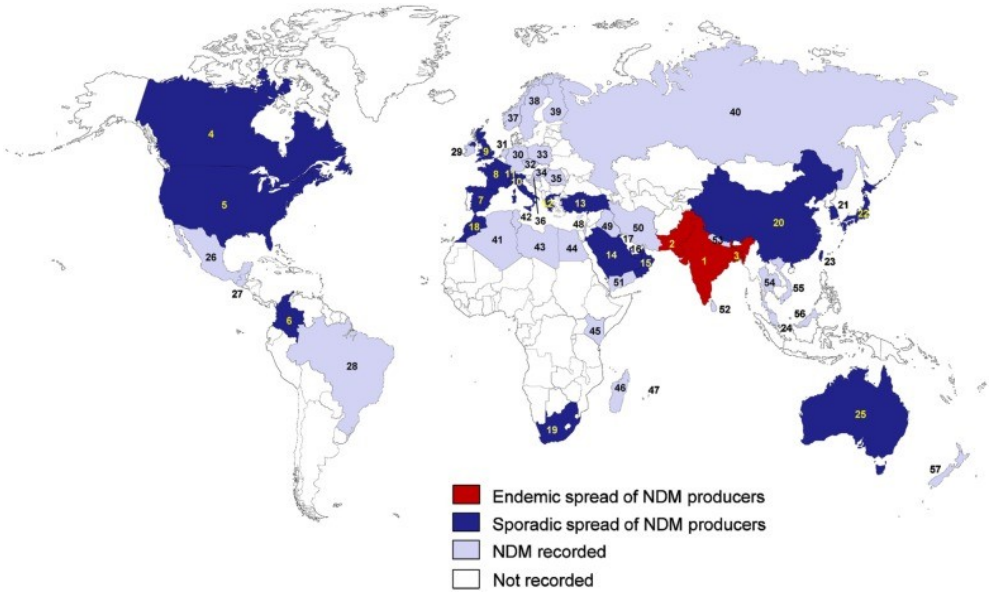


Figura 8: Caratteristiche epidemiologiche di *K. pneumoniae* produttore di NDM (Lee et al., 2016).

Tra le carbapenemasi di classe D, le OXA-48-like hanno acquisito una crescente importanza epidemiologica in seguito alla loro progressiva diffusione internazionale. Identificate inizialmente in Turchia nei primi anni 2000, queste carbapenemasi sono state successivamente segnalate in numerosi Paesi, mostrando un'espansione geografica particolarmente significativa nell'area mediterranea.
Nel corso degli anni, tuttavia, la presenza di ceppi di *Enterobacterales* produttori di OXA-48-like è stata rilevata anche in altre regioni, evidenziando una distribuzione geografica sempre più ampia (Figura 9). La circolazione di questi isolati interessa prevalentemente le strutture sanitarie, dove può contribuire alla comparsa di focolai epidemici e alla persistenza di ceppi resistenti ai carbapenemi.

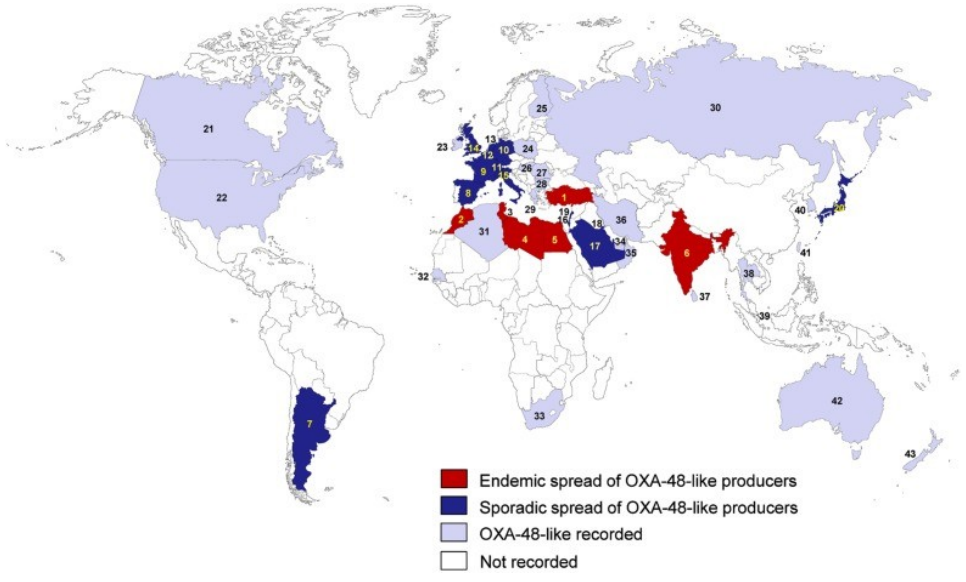


Figura 9: Caratteristiche epidemiologiche del produttore di OXA-48-like *K. pneumoniae* (Lee et al., 2016).

La progressiva diffusione delle OXA-48-like, insieme alla contemporanea circolazione di KPC e NDM, ha contribuito a rendere più eterogeneo il quadro epidemiologico degli isolati clinici di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi, sottolineando l'importanza di monitorare la distribuzione delle differenti famiglie enzimatiche nei diversi contesti geografici.

Nel contesto europeo, la diffusione di questi ceppi continua a rappresentare una criticità sanitaria. Secondo la valutazione del rischio pubblicata *dall'European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) nel febbraio 2025, rispetto alla precedente valutazione del 2019 si è osservato un peggioramento della situazione epidemiologica, con un aumento dell'incidenza delle batteriemie da *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi in 23 Stati membri dell'Unione Europea. Tale incremento è stato associato alla persistente trasmissione ospedaliera di *lineage* batterici ad alto rischio e alla diffusione di geni di resistenza attraverso plasmidi (ECDC, 2025). I dati di sorveglianza molecolare evidenziano inoltre una notevole eterogeneità nella distribuzione delle principali carbapenemasi. Nell'indagine europea condotta nel 2019 su 1.566 isolati di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi, raccolti in 36 Paesi, i geni maggiormente identificati erano bla_{KPC} (38,3%), $bla_{OXA\text{-}48\text{-}like}$ (28,9%) e bla_{NDM} (15,3%). Queste percentuali si riferiscono agli isolati esaminati nell'indagine e non rappresentano la prevalenza complessiva delle CPE nella popolazione europea. I risultati evidenziano comunque la contemporanea circolazione di diverse famiglie enzimatiche e la necessità di considerare le differenze epidemiologiche tra i singoli Paesi (ECDC, 2025).

1.5.1 Contesto epidemiologico italiano

L'Italia rappresenta uno dei Paesi europei maggiormente interessati dalla diffusione di isolati di Enterobacterales resistenti ai carbapenemi, in particolare di *K. pneumoniae*. La circolazione di ceppi produttori di carbapenemasi, soprattutto KPC, ha contribuito nel tempo all'insorgenza di focolai ospedalieri e alla persistenza di questi ceppi in numerose strutture sanitarie. Secondo i dati della sorveglianza nazionale dell'antibiotico-resistenza AR-ISS, nel 2024 il 24,0% degli isolati invasivi di *K. pneumoniae* è risultato resistente ai carbapenemi, rispetto al 26,5% registrato nel 2023. Questa riduzione evidenzia un lieve miglioramento rispetto all'anno precedente pur rimanendo elevata, considerando che circa un isolato invasivo di *K. pneumoniae* su quattro risulta resistente ai carbapenemi (Grafico 1).

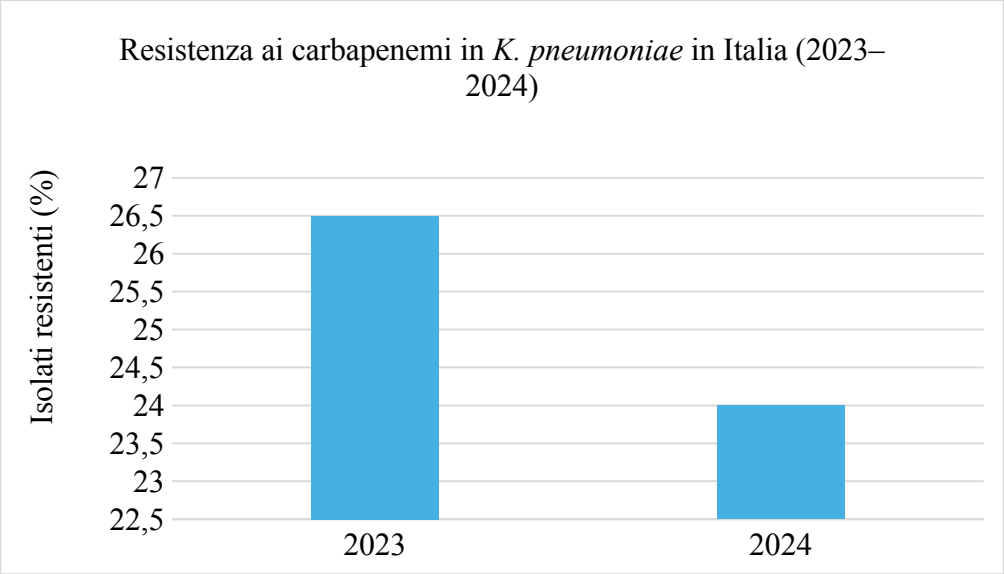


Grafico 1: Percentuale di isolati di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemi in Italia nel biennio 2023–2024.

Elaborazione grafica su dati AR-ISS (Iacchini et al.,2025a).

Il grafico evidenzia una diminuzione di 2,5 punti percentuali, dal 26,5% al 24,0%.

Nello stesso anno, la diffusione di resistenza ai carbapenemi in *E. coli* è risultata pari allo 0,4%. Questi dati evidenziano importanti differenze tra le due specie e confermano la particolare rilevanza di *K. pneumoniae* nell'epidemiologia italiana della resistenza ai carbapenemi (Iacchini et al., 2025a). Per monitorare la diffusione delle infezioni invasive sostenute da questi microrganismi, nel 2013 il Ministero della Salute ha istituito un sistema nazionale di sorveglianza delle batteriemie da *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi, successivamente aggiornato attraverso la circolare ministeriale del 6 dicembre 2019. Il sistema raccoglie le segnalazioni provenienti dalle strutture sanitarie, consentendo di analizzare l'andamento epidemiologico delle infezioni e le caratteristiche dei microrganismi coinvolti.

Secondo il rapporto dell'Istituto Superiore di Sanità pubblicato nel 2025, relativo ai casi diagnosticati nel 2024, in Italia sono state segnalate 3.735 batteriemie da isolati di *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi. Il numero dei casi aveva mostrato una lieve diminuzione rispetto al 2023, pur mantenendosi su livelli superiori a quelli osservati nel periodo 2016-2021. Le aree con maggiore incidenza di casi segnalati sono risultate l'Italia centrale, seguita dal Sud e dalle Isole. I pazienti maggiormente coinvolti erano prevalentemente uomini di età compresa tra 60 e 79 anni, frequentemente ricoverati in ambiente ospedaliero e, in particolare, nei reparti di terapia intensiva.

Un aspetto di particolare interesse riguarda la distribuzione delle carbapenemasi identificate nei casi segnalati. Nel 79,7% delle batteriemie registrate nel 2024 è stato riportato il tipo di carbapenemasi. Tra questi casi, le KPC rappresentavano il 66,9%, confermandosi la famiglia enzimatica

predominante. Nel 16,9% dei casi è stata rilevata esclusivamente la produzione di metallo-β-lattamasi, mentre nel 6,8% degli isolati erano presenti soltanto carbapenemasi di tipo OXA-48.
Nel 6,5% dei casi è stata invece riscontrata la produzione contemporanea di due differenti carbapenemasi (Iacchini et al., 2025b).
Rispetto al 2023, i dati hanno evidenziato una riduzione della proporzione di KPC, precedentemente pari al 74,9%, e un aumento della presenza di metallo-β-lattamasi e di isolati produttori di più carbapenemasi. La diminuzione della proporzione di KPC non indica necessariamente una riduzione complessiva delle infezioni sostenute da *Enterobacterales* produttrici di carbapenemasi, ma evidenzia un cambiamento nella distribuzione delle diverse famiglie enzimatiche. Nonostante la riduzione osservata, le KPC rimangono predominanti nel contesto italiano, mentre la crescente presenza di altre carbapenemasi contribuisce a rendere più eterogeneo il quadro epidemiologico (Grafico 2).

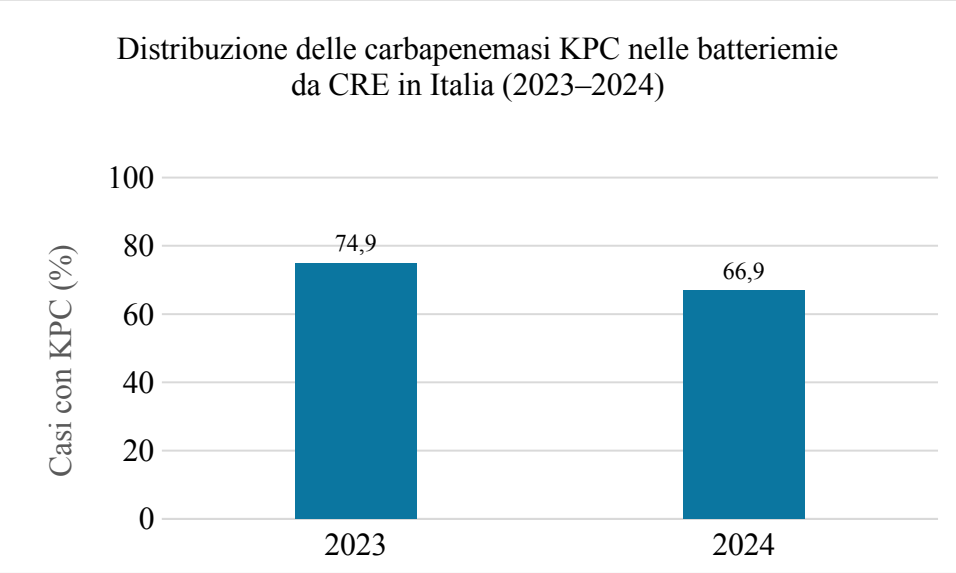


Grafico 2: Confronto della proporzione di carbapenemasi KPC tra i casi di batteriemia da *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi con tipologia enzimatica identificata in Italia nel 2023 e nel 2024. Elaborazione grafica su dati ISS (Iacchini et al., 2025b).

Tra le metallo-β-lattamasi identificate mediante caratterizzazione genotipica, le NDM sono risultate nettamente predominanti rispetto alle VIM e alle IMP.
Nel complesso, i dati evidenziano un cambiamento nella distribuzione delle carbapenemasi in Italia, con una progressiva diversificazione dei meccanismi di resistenza, pur mantenendo le KPC una posizione predominante.
Questo quadro sottolinea l'importanza di affiancare ai test di sensibilità agli antibiotici metodiche specifiche per l'identificazione delle carbapenemasi, al fine di ottenere una caratterizzazione più accurata degli isolati e supportare le misure di prevenzione e controllo delle infezioni

1.6 Colonizzazione intestinale: definizione e significato clinico

La colonizzazione intestinale da *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) rappresenta una condizione microbiologica caratterizzata dall'insediamento e dalla persistenza di questi isolati nel tratto gastrointestinale dell'ospite, in assenza di manifestazioni cliniche riconducibili a un processo infettivo. In tale condizione, i batteri possono moltiplicarsi all'interno dell'ambiente intestinale senza determinare un danno tissutale evidente o una risposta infiammatoria clinicamente significativa, instaurando uno stato di portatore asintomatico (Campos-Madueno et al., 2023).

L'intestino rappresenta uno dei principali siti di colonizzazione delle CPE, in particolare di isolati di *K. pneumoniae* ed *E. coli*. La capacità di questi batteri di persistere nell'ambiente intestinale dipende da diversi fattori, tra cui le caratteristiche del ceppo, la composizione del microbiota residente e le condizioni fisiologiche e immunitarie dell'ospite.

In condizioni normali, la comunità microbica intestinale esercita un effetto protettivo nei confronti dei microrganismi potenzialmente patogeni, attraverso un insieme di meccanismi definiti complessivamente **resistenza alla colonizzazione** (Campos-Madueno et al., 2023).

Tale protezione si realizza principalmente attraverso la competizione per i nutrienti disponibili e per le nicchie ecologiche intestinali, limitando le possibilità di insediamento e proliferazione dei microrganismi introdotti dall'esterno. Alcuni componenti del microbiota producono inoltre metaboliti e sostanze con attività inibitoria nei confronti di altre specie batteriche, contribuendo al mantenimento dell'equilibrio microbico. Un ulteriore meccanismo riguarda l'interazione con il sistema immunitario e con la mucosa intestinale, che partecipa al controllo della popolazione batterica presente nel lume (Roson-Calero et al., 2023). L'alterazione di questo equilibrio può favorire l'acquisizione e la persistenza delle CPE.

Un ruolo particolarmente importante è svolto dall'esposizione agli antibiotici ad ampio spettro, che possono modificare profondamente la composizione del microbiota intestinale, riducendo la diversità delle specie presenti e favorendo la selezione di microrganismi resistenti. La diminuzione delle popolazioni batteriche sensibili determina una minore competizione per le risorse disponibili, creando condizioni favorevoli alla proliferazione delle CPE. Inoltre, le modificazioni del metabolismo microbico possono comportare un aumento dei nutrienti utilizzabili da questi batteri e una riduzione dei metaboliti che normalmente ne limitano la crescita (Roson-Calero et al., 2023).

Oltre all'esposizione agli antibiotici, diversi fattori legati all'assistenza sanitaria possono aumentare la probabilità di acquisire questi isolati. Tra questi rientrano i ricoveri ospedalieri prolungati, i precedenti contatti con strutture sanitarie, le procedure invasive e la presenza di dispositivi come cateteri venosi centrali e cateteri urinari. Anche le condizioni cliniche del paziente assumono un ruolo

rilevante, soprattutto in presenza di patologie concomitanti, immunodepressione o necessità di trattamenti assistenziali complessi. Questi fattori possono agire contemporaneamente, aumentando l'esposizione a microrganismi resistenti e compromettendo i normali meccanismi di difesa dell'organismo (Kim et al., 2017).

La colonizzazione può persistere per periodi variabili, da alcune settimane a diversi mesi, e la sua durata non è necessariamente uguale in tutti i pazienti. La permanenza delle CPE nell'intestino può essere influenzata dalla ripetuta esposizione agli antibiotici, dalle caratteristiche del microbiota e dalle condizioni cliniche individuali.

La negativizzazione di un singolo campione microbiologico, inoltre, non garantisce sempre l'avvenuta eliminazione del microrganismo, poiché la sua presenza può variare nel tempo e raggiungere concentrazioni inferiori alla sensibilità del metodo diagnostico utilizzato (Campos-Madueno et al., 2023).

Dal punto di vista clinico, è importante distinguere la semplice presenza delle CPE nell'intestino dallo sviluppo di un'infezione. La colonizzazione non comporta necessariamente una successiva manifestazione infettiva, ma costituisce una possibile fase precedente all'infezione, soprattutto nei pazienti più vulnerabili. In determinate condizioni, i microrganismi intestinali possono raggiungere sedi normalmente sterili o altri distretti anatomici, dando origine a infezioni urinarie, respiratorie, intra-addominali o del torrente ematico. Il passaggio dalla colonizzazione all'infezione dipende dall'interazione tra la carica batterica, le caratteristiche di virulenza del microrganismo, l'integrità delle barriere anatomiche e lo stato immunitario dell'ospite (Campos-Madueno et al., 2023).

Particolare attenzione viene rivolta alle batteriemie, che rappresentano una delle manifestazioni invasive più rilevanti delle infezioni sostenute da CPE. Nei pazienti colonizzati, l'intestino può costituire un serbatoio endogeno dal quale i microrganismi possono successivamente diffondersi.

La compromissione della barriera intestinale, associata a condizioni di particolare fragilità clinica, può facilitare il passaggio dei batteri oltre la mucosa e, in alcuni casi, il loro ingresso nel circolo ematico. Tuttavia, non tutte le batteriemie che si verificano nei soggetti colonizzati derivano necessariamente da traslocazione intestinale, poiché possono intervenire anche altre vie di infezione. La presenza di portatori asintomatici assume inoltre una notevole importanza epidemiologica nell'ambiente ospedaliero.

Le CPE possono essere eliminate attraverso le feci e contaminare superfici, dispositivi e materiali assistenziali, favorendo la trasmissione ad altri pazienti. La diffusione può avvenire attraverso il contatto diretto oppure indirettamente, soprattutto quando non vengono applicate correttamente le misure di igiene delle mani e di prevenzione delle infezioni. Il rischio risulta particolarmente

significativo nei reparti che ospitano pazienti fragili, come le terapie intensive e le unità dedicate a soggetti immunocompromessi (Campos-Madueno et al., 2023).
Per questo motivo, l'identificazione dei soggetti colonizzati costituisce una componente importante dei programmi di prevenzione e controllo delle infezioni correlate all'assistenza.

1.7 Screening mediante tampone rettale

Lo screening microbiologico mediante tampone rettale costituisce una delle principali metodiche impiegate per individuare i pazienti portatori di isolati di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE). Il suo utilizzo rientra nei programmi di sorveglianza attiva delle infezioni correlate all'assistenza e consente di rilevare la presenza di ceppi resistenti anche nei soggetti che non presentano manifestazioni cliniche. L'identificazione dello stato di portatore permette di acquisire informazioni utili per la gestione del paziente e per l'applicazione delle misure di prevenzione della trasmissione in ambito sanitario (WHO, 2017).
L'esecuzione dello screening non segue necessariamente un protocollo uniforme in tutte le strutture ospedaliere, ma viene organizzata sulla base della situazione epidemiologica locale, delle caratteristiche dei reparti e delle risorse diagnostiche disponibili. Le strategie possono prevedere controlli al momento del ricovero, indagini mirate nei pazienti appartenenti a categorie a rischio oppure campionamenti periodici durante la degenza.
Una particolare attenzione viene rivolta alle unità di terapia intensiva, ai reparti di ematologia e trapiantologia e alle strutture in cui siano stati identificati episodi di trasmissione di isolati clinici antibiotico-resistenti. In presenza di casi accertati, lo screening può essere esteso ai pazienti che hanno condiviso gli stessi ambienti assistenziali, allo scopo di individuare eventuali ulteriori portatori (WHO, 2017; Ambretti et al., 2019).
Il tampone rettale viene eseguito mediante l'introduzione di un tampone sterile nel tratto terminale del retto, effettuando una rotazione per raccogliere materiale fecale dalla mucosa.
La presenza di una quantità adeguata di materiale biologico è importante per garantire la rappresentatività del campione e ridurre il rischio di risultati falsamente negativi alla presenza microbica.
Dopo il prelievo, il tampone viene inserito nell'apposito sistema di trasporto e inviato al Laboratorio di Microbiologia, rispettando le condizioni e le tempistiche previste dal metodo diagnostico utilizzato.
Rispetto alla raccolta di un campione fecale, il tampone rettale presenta il vantaggio di essere una procedura relativamente semplice, rapida e facilmente applicabile nei programmi di sorveglianza ospedaliera (Ambretti et al., 2019).

L'analisi microbiologica del campione può essere effettuata mediante metodiche colturali, molecolari oppure attraverso una combinazione delle due. L'approccio colturale prevede la semina del materiale biologico su terreni selettivi, formulati per favorire la crescita dei microrganismi resistenti e limitare quella della flora batterica sensibile.

Tra i terreni impiegati rientrano gli agar cromogeni specifici per gli *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi, nei quali la presenza di substrati cromogeni permette una prima differenziazione presuntiva delle colonie sulla base delle caratteristiche di crescita e della colorazione sviluppata. L'efficacia di questi terreni può tuttavia variare in relazione al tipo di carbapenemasi prodotta, alla concentrazione dei microrganismi nel campione e alla composizione del terreno stesso (Ambretti et al., 2019).

Un'altra possibilità consiste nell'utilizzo di agar MacConkey associato a dischetti contenenti carbapenemi, come ertapenem o meropenem.

Questo approccio sfrutta la capacità dei microrganismi con ridotta sensibilità agli antibiotici di crescere in prossimità delle aree di diffusione del farmaco. Le colonie sospette vengono successivamente selezionate per ulteriori accertamenti. È importante precisare che la crescita in queste condizioni rappresenta un'indicazione preliminare di possibile resistenza e non costituisce, da sola, una conferma della produzione di carbapenemasi (Temkin et al., 2014).

Dopo l'isolamento delle colonie sospette, si procede all'identificazione della specie batterica e alla valutazione del profilo di sensibilità agli antibiotici. L'identificazione può essere effettuata mediante sistemi automatizzati o spettrometria di massa MALDI-TOF, mentre l'antibiogramma consente di determinare la sensibilità dell'isolato ai diversi antimicrobici e, quando previsto, i valori di concentrazione minima inibente (MIC).

Questa fase permette di distinguere gli isolati che presentano una ridotta sensibilità ai carbapenemi da quelli con un profilo di sensibilità conservato, ma non è sufficiente per identificare con certezza il meccanismo molecolare responsabile della resistenza (ECDC, 2019).

La conferma della produzione di carbapenemasi richiede pertanto l'impiego di metodiche specifiche. Tra queste rientrano i test immunocromatografici, basati sull'utilizzo di anticorpi in grado di riconoscere determinate famiglie enzimatiche, come KPC, NDM, VIM, IMP e OXA-48-like. Tali test permettono di ottenere risultati in tempi relativamente brevi a partire da colonie batteriche isolate, fornendo informazioni utili sulla tipologia di carbapenemasi prodotta. La capacità di rilevazione dipende tuttavia dalle famiglie e dalle varianti enzimatiche comprese nel pannello diagnostico utilizzato (Ambretti et al., 2019; ECDC, 2019).

Accanto alle metodiche fenotipiche e immunocromatografiche, le tecniche molecolari consentono di ricercare direttamente specifici determinanti genetici associati alla produzione di carbapenemasi. I

sistemi basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR), anche in formato multiplex, possono identificare simultaneamente diversi geni di resistenza, tra cui bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP} e $bla_{\text{OXA-48-like}}$. Alcuni saggi possono essere applicati direttamente al tampone rettale, riducendo i tempi necessari per ottenere un risultato rispetto alle procedure che richiedono l'isolamento colturale. Tuttavia, la ricerca molecolare è limitata ai bersagli genetici previsti dal test e un risultato positivo ottenuto direttamente dal campione non permette necessariamente di identificare la specie batterica che ospita il gene rilevato (CDC, 2024).

Le metodiche colturali e molecolari presentano quindi caratteristiche complementari. L'esame colturale permette di recuperare microrganismi vitali, eseguire l'antibiogramma e conservare gli isolati per eventuali approfondimenti epidemiologici.

Le tecniche molecolari, invece, risultano particolarmente utili quando è necessario individuare rapidamente determinanti di resistenza noti. La scelta del percorso diagnostico dipende dagli obiettivi dello screening, dall'organizzazione del laboratorio e dalla necessità di ottenere informazioni microbiologiche più o meno approfondite (Ambretti et al., 2019; CDC, 2024).

Nell'interpretazione dei risultati devono essere considerati anche i limiti delle diverse metodiche. Un risultato negativo non esclude in maniera assoluta la presenza di CPE, soprattutto quando la carica batterica è ridotta, il campionamento non è adeguato oppure il ceppo presenta caratteristiche che ne rendono difficile la rilevazione.

Analogamente, il riscontro di resistenza ai carbapenemi non dimostra necessariamente la produzione di una carbapenemasi, poiché possono intervenire altri meccanismi, come la riduzione della permeabilità della membrana esterna associata alla produzione di differenti β-lattamasi.

Per questo motivo, la corretta interpretazione dello screening richiede l'integrazione dei risultati ottenuti nelle diverse fasi dell'analisi microbiologica (Temkin et al., 2014; ECDC, 2019).

Nel complesso, lo screening mediante tampone rettale rappresenta uno strumento diagnostico e di sorveglianza che consente di riconoscere la presenza di CPE nella popolazione ospedaliera.

La possibilità di associare l'individuazione dei portatori alla caratterizzazione microbiologica degli isolati permette inoltre di raccogliere informazioni utili per la valutazione della circolazione di questi isolati e per l'applicazione di interventi di prevenzione e controllo delle infezioni nelle strutture sanitarie (WHO, 2017; Ambretti et al., 2019).

1.8 Sistema di sorveglianza presso l'IRCCS Maugeri -Pavia

L'IRCCS Maugeri di Pavia, sede presso la quale è stato svolto il mio periodo di tirocinio sperimentale, rappresenta una struttura sanitaria altamente specializzata nell'ambito della riabilitazione e della presa in carico multidisciplinare di pazienti affetti da patologie complesse. L'Istituto appartiene a una rete nazionale di strutture dedicate alla cura e alla riabilitazione specialistica e offre percorsi assistenziali rivolti principalmente alla riabilitazione cardiologica, respiratoria, neurologica e post-coma.

All'interno della struttura sono presenti reparti caratterizzati da elevata intensità assistenziale, tra cui le unità dedicate alle gravi cerebrolesioni acquisite (GCA). Questi reparti accolgono pazienti con esiti neurologici conseguenti a lesioni cerebrali traumatiche o non traumatiche, frequentemente associate a un precedente periodo di coma, alterazioni dello stato di coscienza e compromissione variabile delle funzioni cognitive, motorie e psicosociali. Tali condizioni possono determinare disabilità permanenti o temporanee e richiedono un percorso riabilitativo complesso, personalizzato e prolungato (Zasler et al., 2021).

La maggior parte dei pazienti ricoverati in questi reparti proviene da Unità di Terapia Intensiva o da reparti sub-intensivi, dopo una fase acuta caratterizzata da elevata esposizione a procedure invasive e trattamenti farmacologici complessi. La presenza di degenze prolungate, plurime comorbilità, ventilazione meccanica, dispositivi invasivi a permanenza, nutrizione artificiale e frequenti trattamenti antibiotici rappresenta un insieme di fattori associati a un maggiore rischio di acquisizione e diffusione di isolati multiresistenti agli antibiotici, inclusi gli *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (Magiorakos *et al.*, 2012; Ministero della Salute, 2013).

In considerazione dell'elevata vulnerabilità della popolazione assistita e del rischio di trasmissione crociata di isolati resistenti agli antibiotici, presso l'IRCCS Maugeri di Pavia è stato istituito un programma di sorveglianza attiva finalizzato all'identificazione precoce dei pazienti colonizzati da CPE. Lo screening microbiologico è stato progressivamente esteso a tutti i pazienti al momento del ricovero, in accordo con le strategie di contenimento raccomandate a livello nazionale e internazionale per il controllo della diffusione delle *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi (ECDC, 2011).

Nel periodo considerato dallo studio, i pazienti con una precedente documentazione di colonizzazione da CPE, definita come positività del tampone rettale nei 15 giorni antecedenti il ricovero, venivano considerati colonizzati anche al momento dell'ingresso in struttura e pertanto non sottoposti a un ulteriore screening. Tale approccio era basato sull'evidenza che la colonizzazione intestinale da CPE può persistere per periodi prolungati, sebbene la durata della persistenza possa essere influenzata da numerosi fattori clinici, microbiologici e assistenziali (Magiorakos et al.,2012).

Durante il periodo di attesa necessario per ottenere il risultato dello screening microbiologico, tutti i pazienti venivano sottoposti a misure preventive di isolamento da contatto, secondo quanto raccomandato dalle principali linee guida per la prevenzione della trasmissione dei microrganismi multiresistenti nelle strutture sanitarie (ECDC, 2011).

Tali misure comprendevano, ove possibile, il ricovero in camera singola e l'esecuzione delle attività riabilitative direttamente all'interno della stanza di degenza, al fine di limitare gli spostamenti del paziente e ridurre il rischio di contaminazione ambientale.

Nei pazienti con confermata colonizzazione da CPE venivano mantenute le precauzioni da contatto per tutta la durata della degenza. Questi soggetti erano collocati in camere singole o in aree dedicate e seguivano un percorso riabilitativo differenziato rispetto ai pazienti non colonizzati.

L'accesso agli spazi riabilitativi comuni, quando necessario, veniva pianificato secondo modalità organizzative volte a minimizzare il rischio di trasmissione, consentendo l'utilizzo delle palestre comuni preferenzialmente dopo il completamento delle attività degli altri pazienti.

Parallelamente alle strategie di isolamento, presso la struttura erano applicate le precauzioni standard per la prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza, con particolare attenzione all'igiene delle mani, elemento riconosciuto come principale misura per interrompere la trasmissione dei microrganismi patogeni in ambiente sanitario (Zingg et al., 2015).

Il rispetto delle procedure di prevenzione e controllo delle infezioni veniva periodicamente monitorato dalla Direzione Sanitaria attraverso attività di sorveglianza e verifica dell'aderenza ai protocolli aziendali. Il programma di sorveglianza microbiologica adottato presso l'IRCCS Maugeri e le misure di contenimento implementate risultavano coerenti con le indicazioni del Ministero della Salute italiano relative alla prevenzione e al controllo della diffusione dei CPE, pubblicate nell'ambito delle strategie nazionali introdotte nel 2013, e con le raccomandazioni *dell'European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC). Tali strategie sottolineano l'importanza dello screening dei pazienti a rischio, dell'identificazione tempestiva dei portatori, dell'applicazione delle precauzioni da contatto e della sorveglianza epidemiologica come strumenti fondamentali per limitare la diffusione dei microrganismi multiresistenti nelle strutture sanitarie (Ministero della Salute; 2013).

In quest'ottica il laboratorio di Microbiologia svolge un ruolo cruciale nel programma di sorveglianza delle infezioni ospedaliere. Si avvale di un sistema informatizzato dedicato alla gestione, all'elaborazione e al monitoraggio dei dati microbiologici, basato sulla piattaforma *Qlik Sense Hub*, integrata con il Sistema Informativo di Microbiologia BASE. Tale infrastruttura consente la raccolta e la consultazione centralizzata dei dati generati nell'ambito dell'attività diagnostica di routine, permettendo il monitoraggio continuo degli indicatori microbiologici e l'esecuzione di analisi aggiornate in tempo reale. *Qlik Sense Hub* è una piattaforma di business intelligence che supporta

l'elaborazione di grandi volumi di dati mediante la creazione di dashboard interattive, report dinamici e visualizzazioni personalizzate. Grazie a queste funzionalità, il sistema facilita l'interpretazione delle informazioni microbiologiche, favorendo il monitoraggio epidemiologico dei microrganismi isolati e dei relativi pattern di sensibilità agli antimicrobici, oltre a costituire un valido supporto ai processi decisionali clinici e organizzativi.

La piattaforma è accessibile al personale sanitario autorizzato ed è collegata in modalità bidirezionale al sistema gestionale BASE, utilizzato dal Laboratorio di Microbiologia per tutte le fasi del percorso diagnostico, dall'accettazione dei campioni biologici alla refertazione finale.

L'integrazione tra i due sistemi garantisce l'aggiornamento automatico e continuo delle informazioni, assicurando la disponibilità di dati coerenti e costantemente allineati con l'attività di laboratorio.

Il sistema BASE è stato sviluppato specificamente per la gestione dei dati microbiologici e per la conduzione di analisi epidemiologiche finalizzate alla sorveglianza delle infezioni e dell'antibiotico-resistenza. Attraverso l'applicazione automatizzata dei criteri interpretativi definiti *dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), il software consente di classificare e monitorare i profili di sensibilità dei microrganismi isolati. Inoltre, garantisce la completa tracciabilità di tutte le fasi del processo microbiologico, dalla registrazione del campione all'emissione del referto.

Un'ulteriore funzione di particolare rilevanza riguarda il sistema di allerta automatica associato all'identificazione di microrganismi sentinella. In tali circostanze, il software è in grado di generare e inviare automaticamente notifiche e-mail a uno o più destinatari precedentemente definiti, consentendo una comunicazione tempestiva degli eventi microbiologici di interesse.

Tale strumento favorisce una rapida condivisione delle informazioni tra il Laboratorio di Microbiologia, la Direzione Sanitaria e i professionisti coinvolti nell'assistenza, contribuendo al monitoraggio della circolazione dei microrganismi sentinella all'interno della struttura e supportando l'adozione di adeguate misure di controllo e prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza.

1.9 Progressione da colonizzazione a infezione invasiva

La colonizzazione intestinale da parte di isolati di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) non comporta necessariamente lo sviluppo di un'infezione. Tuttavia, in determinate condizioni, i ceppi colonizzanti possono raggiungere sedi normalmente sterili e provocare manifestazioni infettive anche gravi.

La progressione verso un'infezione invasiva dipende dall'interazione tra diversi fattori, tra cui le condizioni cliniche del paziente, l'integrità delle barriere anatomiche e la capacità del microrganismo di superare i meccanismi di difesa dell'ospite.

Una delle possibili manifestazioni di questa progressione è la **batteriemia**, definita come la presenza di batteri vitali nel circolo sanguigno, un ambiente fisiologicamente sterile. In base alla durata e alle modalità di presenza dei microrganismi nel sangue, la batteriemia può essere distinta in **transitoria**, **intermittente** e **persistente**. La forma transitoria è generalmente di breve durata e può verificarsi in seguito a procedure invasive o alla manipolazione di tessuti colonizzati. Le forme intermittenti e persistenti sono invece generalmente associate alla presenza di focolai infettivi dai quali i batteri raggiungono il torrente ematico in maniera discontinua o continuativa.

Dal punto di vista clinico, la batteriemia può essere asintomatica oppure accompagnarsi a manifestazioni sistemiche di diversa gravità. Nei casi più gravi, l'infezione può complicarsi con lo sviluppo di sepsi, definita come una disfunzione d'organo potenzialmente letale causata da una risposta disregolata dell'organismo all'infezione (Singer et al., 2016).

Nel caso delle CPE, particolare interesse riveste la comparsa di batteriemia in pazienti precedentemente identificati come portatori intestinali.

Il riscontro di un tampone rettale positivo, seguito dall'isolamento della stessa specie batterica nelle emocolture, può suggerire una possibile relazione tra la colonizzazione e la successiva infezione del torrente ematico. Tuttavia, la sola successione temporale dei due eventi non consente di dimostrare con certezza che il microrganismo responsabile della batteriemia derivi dalla popolazione batterica precedentemente identificata a livello intestinale. Per valutare questa associazione è necessario confrontare le caratteristiche microbiologiche degli isolati, considerando la specie identificata, i profili di sensibilità agli antibiotici e, quando disponibili, i risultati delle analisi molecolari, che permettono di stabilire con maggiore precisione l'eventuale correlazione clonale.

Dal punto di vista patogenetico, uno dei possibili meccanismi coinvolti nella progressione verso l'infezione invasiva è rappresentato dalla **traslocazione batterica**, ovvero il passaggio di microrganismi di origine intestinale attraverso la barriera mucosale verso i tessuti sottostanti e i linfonodi mesenterici, con la possibilità, in determinate condizioni, di raggiungere anche la circolazione sistemica. Questo processo può essere favorito dall'alterazione dell'integrità della mucosa intestinale, dalla compromissione delle difese immunitarie e da condizioni cliniche che facilitano il superamento delle barriere fisiologiche.

La progressione dalla colonizzazione alla batteriemia non avviene tuttavia esclusivamente attraverso la traslocazione intestinale. I microrganismi colonizzanti possono infatti essere coinvolti nello sviluppo di infezioni in altri distretti anatomici, come quello urinario o respiratorio, dalle quali può verificarsi una successiva diffusione ematica.

Di conseguenza, l'identificazione di una precedente colonizzazione intestinale rappresenta un elemento utile nella valutazione del rischio infettivo, ma non costituisce, da sola, una prova dell'origine della batteriemia.

In questo contesto, lo studio della relazione tra positività del tampone rettale per CPE e successivo isolamento di microrganismi produttori di carbapenemasi nelle emocolture assume particolare rilevanza, poiché permette di valutare l'associazione tra lo stato di portatore intestinale e l'insorgenza di infezioni del torrente ematico, distinguendo la semplice presenza del microrganismo dalla comparsa di un'infezione clinicamente significativa.

2 SCOPO DELLA TESI

La diffusione di isolati di E*nterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) rappresenta una problematica di particolare rilevanza nell'ambito della microbiologia clinica, soprattutto per le difficoltà terapeutiche associate alle infezioni sostenute da questi microrganismi.

In tale contesto, lo screening microbiologico mediante tampone rettale costituisce uno strumento importante per identificare precocemente i pazienti colonizzati e valutare la possibile associazione tra colonizzazione intestinale e successivo sviluppo di infezioni invasive.

L'internato di tesi è stato svolto presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica degli Istituti Clinici Scientifici Maugeri di Pavia, nel periodo compreso tra febbraio e luglio 2026, sotto la supervisione della Dott.ssa Antonella Rezzani.

L'attività formativa ha permesso di acquisire competenze pratiche nelle procedure di isolamento e identificazione batterica, nell'esecuzione e interpretazione degli antibiogrammi e nell'applicazione delle metodiche utilizzate per l'identificazione dei principali meccanismi di resistenza ai carbapenemi. Tale esperienza ha inoltre fornito le basi per approfondire il ruolo clinico della colonizzazione intestinale da CPE e il suo potenziale contributo all'insorgenza di batteriemia.

L'obiettivo principale del presente studio è stato quello di valutare la prevalenza della colonizzazione intestinale da ceppi di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi in una popolazione ospedaliera sottoposta a screening mediante tampone rettale e di analizzare l'eventuale associazione tra la positività dello screening e la successiva comparsa di episodi batteriemici.

A tale scopo, lo studio si è concentrato sul confronto tra i risultati microbiologici dei tamponi rettali e quelli delle emocolture, al fine di individuare i pazienti nei quali alla colonizzazione intestinale è seguito l'isolamento ematico di ceppi appartenenti alla stessa specie e caratterizzati da profili di resistenza compatibili.

Nello specifico, gli obiettivi dello studio sono stati i seguenti:

- Descrivere le caratteristiche demografiche della popolazione ospedaliera esaminata.
- Valutare la frequenza della colonizzazione intestinale da CPE nei pazienti sottoposti a screening.
- Analizzare la distribuzione dei principali meccanismi di produzione di carbapenemasi, con particolare riferimento a KPC, NDM, VIM e OXA-48-like, considerando anche l'eventuale presenza di meccanismi multipli.
- Valutare la frequenza con cui i pazienti colonizzati hanno successivamente sviluppato episodi di batteriemia.

- Esaminare il possibile contributo dello screening rettale nell'identificazione dei pazienti a maggior rischio di infezione invasiva.

Attraverso l'analisi dei dati microbiologici raccolti, questo lavoro si propone di approfondire la relazione tra colonizzazione intestinale e batteriemia da CPE nel contesto ospedaliero esaminato, contribuendo alla conoscenza dell'epidemiologia locale di questi isolati e alla valutazione dell'utilità dello screening nella sorveglianza delle infezioni correlate all'assistenza.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Disegno dello studio

Durante l'Internato di tesi svolto nel periodo febbraio-luglio 2026 sono state apprese le principali tecniche utili per il processamento dei tamponi rettali e delle emocolture e la successiva identificazione dei microrganismi coinvolti. Inoltre, si è anche determinata la possibile resistenza ai carbapenemi ed il meccanismo di resistenza associato, i dati sperimentali ottenuti sono stati poi inglobati in uno studio osservazionale retrospettivo di coorte, condotto presso il Laboratorio di Microbiologia Clinica dell'IRCCS Maugeri di Pavia, con l'obiettivo di valutare la frequenza della colonizzazione intestinale da ceppi di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (Carbapenemase-Producing Enterobacterales, CPE) e di analizzare la possibile associazione tra la positività dello screening rettale e il successivo sviluppo di batteriemia.

La popolazione oggetto dello studio comprendeva i pazienti ricoverati presso l'IRCCS Maugeri di Pavia, sottoposti a screening microbiologico mediante tampone rettale per la ricerca di CPE, secondo il protocollo di sorveglianza adottato dalla struttura.

Lo studio si è basato sull'analisi retrospettiva dei dati microbiologici relativi al periodo compreso tra il 2021 e il 2026 (includendo i dati ottenuti durante l'internato di tesi), acquisiti attraverso la consultazione del *Laboratory Information System* (LIS), il sistema informatico utilizzato dal laboratorio per la registrazione, l'archiviazione e la gestione dei risultati delle indagini microbiologiche.

La raccolta e l'elaborazione dei dati sono state condotte nell'ambito del mio internato di tesi. L'analisi ha incluso sia i dati prodotti nel corso dell'attività sperimentale sia i dati microbiologici storici conservati nell'archivio del laboratorio, relativi ai periodi precedenti e utilizzati per le finalità del presente studio.

Per ciascun paziente sono state considerate le principali informazioni demografiche e microbiologiche, tra cui età, sesso, esito dello screening rettale, specie batterica identificata e presenza di eventuali episodi di batteriemia documentati mediante emocoltura durante il ricovero.

Particolare attenzione è stata rivolta ai pazienti nei quali, successivamente alla positività del tampone rettale, è stato riscontrato nelle emocolture un microrganismo appartenente alla stessa specie e caratterizzato da un profilo di resistenza compatibile con quello dell'isolato intestinale.

I dati raccolti sono stati anonimizzati prima dell'analisi e utilizzati esclusivamente per le finalità dello studio.

3.2 Raccolta dei campioni

3.2.1 Tamponi rettali

La sorveglianza microbiologica della colonizzazione da *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) è stata effettuata mediante l'esecuzione di tamponi rettali, considerati il campione di riferimento per l'identificazione della colonizzazione intestinale.
Il prelievo è stato eseguito da personale infermieristico adeguatamente formato, secondo le procedure operative standard dell'IRCCS Maugeri.
Il tampone sterile è stato delicatamente introdotto attraverso lo sfintere anale per alcuni centimetri e successivamente ruotato in modo da garantire un'adeguata raccolta di materiale fecale.
La presenza di tracce visibili di materiale fecale sul tampone costituisce un indicatore di corretta esecuzione del prelievo e di idoneità del campione per l'analisi microbiologica. Al termine della raccolta, il tampone è stato immediatamente inserito nel dispositivo di trasporto contenente il terreno di conservazione previsto dal produttore (Swab, COPAN, BRESCIA), correttamente identificato con i dati del paziente (Figura 10):



Figura 10: Rappresentazione del tampone utilizzato in routine

3.2.2 Emocolture

Nei pazienti con sospetto clinico di infezione sistemica, il prelievo delle emocolture è stato effettuato dai reparti secondo le procedure aziendali, preferibilmente prima dell'inizio della terapia antibiotica.
Secondo le procedure operative adottate presso l'IRCCS Maugeri, per ogni episodio clinico venivano generalmente raccolti due o più set di emocolture ottenuti da accessi venosi differenti.
Ciascun set era costituito da un flacone per microrganismi aerobi e da un flacone per microrganismi anaerobi (Figura 11).
Tale approccio ha permesso di aumentare la sensibilità diagnostica, ridurre il rischio di risultati falsamente negativi e facilitare la distinzione tra una reale batteriemia e un'eventuale contaminazione del campione.



Figura 11: Flaconi per emocoltura utilizzati per la ricerca di microrganismi nel sangue: a sinistra, flacone per la crescita di microrganismi anaerobi; a destra, flacone per la crescita di microrganismi aerobi.

In ogni flacone sono stati inseriti, sterilmente, 10 ml di sangue, osservando come riferimento, il segno sul bordo del flacone poiché questi non presentano un vuoto calibrato.

3.2.3 Invio dei campioni

I campioni, tamponi rettali e emocolture, così prelevati sono inviati al Laboratorio di Microbiologia nel più breve tempo possibile, nel rispetto delle modalità di trasporto, al fine di preservare la vitalità dei microrganismi e garantire l'affidabilità del risultato analitico. Il trasferimento dei campioni biologici dai reparti di degenza al Laboratorio di Microbiologia è avvenuto mediante un sistema di posta pneumatica, una rete automatizzata di trasporto interno ampiamente utilizzata nelle strutture ospedaliere per garantire una movimentazione rapida e sicura dei materiali sanitari. Il sistema è costituito da una serie di tubazioni che collegano i diversi reparti al laboratorio e sfrutta la differenza di pressione dell'aria per movimentare appositi contenitori cilindrici (bossoli) nei quali vengono alloggiati i campioni biologici (Figura 12).

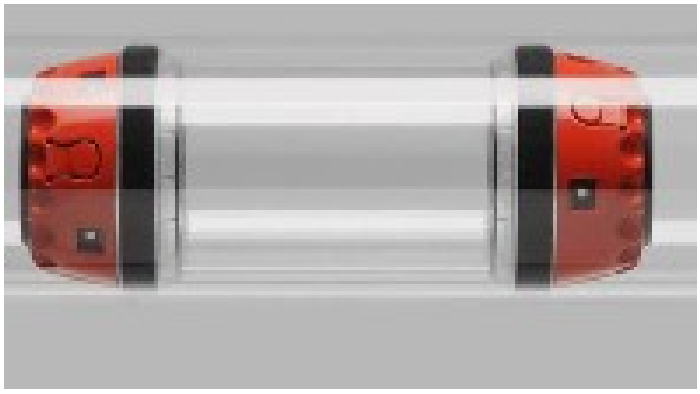


Figura 12: Contenitore cilindrico (bossolo) utilizzato nel sistema di posta pneumatica per il trasporto dei campioni biologici dai reparti ospedalieri al Laboratorio di Microbiologia.

Prima dell'invio, ciascun campione è stato inserito nel contenitore dedicato, opportunamente chiuso. L'impiego della posta pneumatica rappresenta un importante supporto organizzativo per il laboratorio, poiché permette una rapida presa in carico dei campioni, favorisce la tempestività dell'analisi microbiologica. Inoltre, il sistema limita la movimentazione manuale dei campioni all'interno della struttura ospedaliera, contribuendo a standardizzare il processo di trasporto e a migliorare la tracciabilità del percorso diagnostico. All'arrivo, il personale del Laboratorio ha proceduto alla verifica dell'identificazione del campione, dell'integrità del contenitore e della conformità ai criteri di accettazione prima dell'avvio della fase analitica.

3.3 Semina dei campioni clinici

Tamponi rettali

I tamponi rettali sono stati processati (10 ul di sospensione) sui seguenti terreni:

- agar MacConkey, associato all'utilizzo di un dischetto contenente meropenem (10 μg) e ertapenem (10 μg). Dopo la semina del campione, i dischetti di antibiotico sono stati collocati nella zona di maggiore concentrazione dell'inoculo, in modo da favorire l'individuazione di eventuali isolati caratterizzati da ridotta sensibilità al carbapeneme.

CHROMID® CARBA SMART (bioMérieux), terreno cromogeno per la rilevazione di Enterobacterales caratterizzati da ridotta sensibilità ai carbapenemi. La particolare composizione del terreno ha permesso di evidenziare la crescita di colonie sospette sulla base della colorazione caratteristica sviluppata dalle diverse specie batteriche, fornendo un'identificazione presuntiva già nella fase iniziale dello screening.

Dopo l'inoculo del campione, le piastre sono state incubate in condizioni aerobiche a 35°C per 18/20 ore.

3.3.1 Analisi dei risultati: Tamponi rettali

La lettura microbiologica è stata effettuata dopo 18–20 ore di incubazione, valutando la presenza di colonie con morfologia e caratteristiche cromatiche compatibili con *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi.

Sulla piastra di agar MacConkey sono state considerate sospette le colonie con morfologia compatibile con gli *Enterobacterales* che si sono sviluppate all'interno dell'alone di inibizione o in corrispondenza di un diametro dell'alone pari o inferiore a 30 mm.

Tali isolati (Figura 13) hanno richiesto l'esecuzione di ulteriori indagini microbiologiche per confermare la produzione di carbapenemasi e caratterizzare il meccanismo di resistenza.



Figura 13: L'immagine mostra una piastra di MacConkey Agar dopo 24 ore di incubazione con colonie sospette cresciute attorno ad entrambi i dischetti.

Sulla piastra CHROMID® CARBA SMART, la particolare composizione del terreno ha permesso di evidenziare la crescita di colonie sospette sulla base della colorazione caratteristica sviluppata dalle diverse specie batteriche, fornendo un'identificazione presuntiva già nella fase iniziale dello screening. Il diverso colore delle colonie indicava la possibile presenza di possibili specie batteriche, come di seguito indicate.

- ✓ **Colonie rosa / rosso-magenta:** sono state indicative della presenza di ceppi di *E. coli* resistenti ai carbapenemi. La colorazione è dovuta alla scissione enzimatica (mediata dall'enzima beta-galattosidasi.) di uno specifico substrato cromogeno incorporato nel terreno.
- ✓ **Colonie blu/ blu-viola / verde-blu:** indicavano la presenza di isolati appartenenti al cosiddetto gruppo KESC (*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp.) resistenti ai carbapenemi. In particolare, nei campioni clinici da screening rettale, lo sviluppo di colonie bluastre è stato frequentemente associato a *K. pneumoniae* (Figura 14).
- ✓ **Colonie bianche o con pigmentazione naturale/aloni marroni:** indicavano lo sviluppo di isolati appartenenti a batteri Gram-negativi non fermentanti (es. *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.) o di ceppi appartenenti al gruppo *Proteus-Morganella-Providencia* (questi ultimi spesso caratterizzati da un alone bruno).

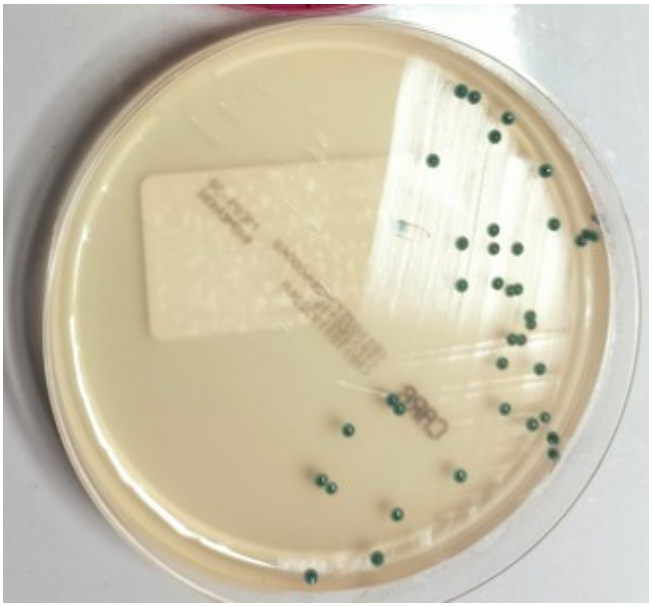


Figura 14: Rappresentazione di una piastra di CHROMID® CARBA SMART tipica per *Klebsiella* spp.

Emocolture

All'arrivo in laboratorio, i campioni sono stati verificati, registrati nel Laboratory Information System (LIS) e caricati nel sistema automatizzato **BACT/ALERT®** (bioMérieux).

I flaconi per emocoltura aerobica e anaerobica sono stati incubati nel sistema automatizzato **BACT/ALERT®** (bioMérieux), basato sul monitoraggio continuo della produzione di anidride carbonica (CO_2) conseguente alla crescita microbica.

Il sistema **BACT/ALERT®** è una piattaforma automatizzata per il monitoraggio continuo delle emocolture, basata sul rilevamento della produzione di anidride carbonica (CO_2) derivante dal metabolismo dei microrganismi presenti nel campione. Ogni flacone contiene un terreno di coltura liquido arricchito e un sensore colorimetrico situato sul fondo, sensibile alle variazioni di pH determinate dall'accumulo di CO_2. Durante l'incubazione, lo strumento esegue un monitoraggio continuo dei flaconi e registra automaticamente le variazioni del sensore. Quando il sistema ha rilevato una crescita microbica significativa, il flacone è stato segnalato come positivo tramite un segnale visivo e acustico, consentendo un intervento tempestivo del personale di laboratorio.
Quindi in caso di positività, il flacone è stato immediatamente rimosso dallo strumento e sottoposto a colorazione di Gram, che ha fornito una prima indicazione sulla morfologia e sulla colorazione del microrganismo.
La procedura ha previsto il prelievo, tramite una siringa, di una piccola aliquota di sangue (circa 50 ul) dal flacone positivo in condizioni di sterilità, l'allestimento di uno striscio su vetrino portaoggetti e la successiva fissazione mediante metanolo.
Lo striscio è stato quindi sottoposto alla colorazione di Gram, una metodica differenziale basata sulle caratteristiche strutturali della parete cellulare batterica.
La tecnica comprende quattro passaggi fondamentali:

1. applicazione del colorante primario cristalvioletto per 1 minuto (soluzione all'1% :1 g di cristalvioletto in 100 mL di soluzione,pronto all'uso)
2. trattamento con soluzione di Lugol (**iodio (1%)** e **ioduro di potassio (2%)** in acqua pronto all'uso) come mordenzante, per 1 minuto
3. decolorazione mediante una miscela di alcol e acetone (miscela di **acetone ed etanolo** 1:1, pronto all'uso)
4. controcolorazione con safranina (0.3%, pronta all'uso) per 1 minuto

I batteri Gram-positivi, grazie all'elevato contenuto di peptidoglicano della parete cellulare, trattengono il complesso cristalvioletto-Lugol e appaiono di colore viola al microscopio ottico. I batteri Gram-negativi, invece, vengono decolorati durante il trattamento con alcol-acetone e assumono la colorazione rosa-rossastra conferita dal colorante di contrasto.
L'osservazione microscopica ha permesso di valutare la differenziazione in Gram-positivi o Gram-negativi, la morfologia batterica (cocchi o bacilli), la disposizione cellulare e l'eventuale presenza di polimicrobismo.
Nel caso di isolati di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi, la colorazione evidenziava tipicamente la presenza di bacilli Gram-negativi. Il risultato della colorazione di Gram è stato

comunicato tempestivamente al reparto richiedente, in quanto rappresenta un'informazione di elevato valore clinico.

Sebbene non permetta l'identificazione della specie né la caratterizzazione del profilo di antibiotico-resistenza, questa metodica fornisce un orientamento diagnostico immediato che può supportare il clinico nella scelta della terapia antimicrobica empirica in attesa dei risultati colturali definitivi.

Contemporaneamente, 50 ul di emocoltura contenuti nel flacone positivo alla crescita microbica, prelevato con siringa sono stati seminati sui terreni colturali appropriati, in funzione del quadro osservato alla colorazione di Gram (Figura 15):

- Agar Cioccolato (PVX): terreno di coltura che garantisce la crescita dei batteri esigenti come *Neisseria* spp. e *Haemophilus* spp. che normalmente non crescono su agar-sangue. Questo terreno contiene sangue cotto e fattori di crescita, come il fattore V (NAD). È prevista l'incubazione a 35°C in presenza del 5% di CO_2 per 48 ore;
- Agar Sangue (COS): le piastre inoculatesono state incubate a 35°C, in aerobiosi, per 24 ore;
- MacConkey Agar (MCK): terreno selettivo e differenziale, usato per l'isolamento di batteri Gram-negativi. La selettività è conferita dalla presenza dei sali biliari e di cristal violetto che inibiscono la crescita dei Gram-positivi, mentre il lattosio ed il rosso fenolo (indicatore di pH), permettono di differenziare i Gram-negativi fermentanti (colonie rosse; *E. coli*, *Klebsiella spp*.) dai non-fermentanti (colonie bianche; *Pseudomonas spp*., *Proteus spp*., *Acinetobacter spp*.). Le piastre seminate sono state incubate in termostato a 35°C in aerobiosi per 24 ore.
- Mannitol Salt Agar (MSA2): è un terreno selettivo e differenziale usato per l'isolamento delle specie di *Staphylococcus spp*. Il terreno è stato incubato 35°C, in aerobiosi, per 24 ore;
- Sabouraud Agar (SGC2): questo terreno è stato utilizzato per la crescita di miceti. Contiene digerito pancreatico di caseina e digerito peptico di tessuti animali per fornire substrati utili alla crescita del microrganismo, mentre l'elevata concentrazione di destrosio ed il pH acido garantiscono la crescita selettiva dei miceti. Al termine della semina, il terreno è stato incubato a 35°C, in aerobiosi, per 48 ore.



Figura 15: Rappresentazione delle piastre utilizzat

3.4 Identificazione batterica e studio della sensibilità agli antibiotici

Tamponi rettali e emocolture

Le colonie sospette sia per i tamponi rettali sia per le emocolture ,sono state successivamente sottoposte a identificazione e determinazione del profilo di sensibilità agli antibiotici mediante il sistema automatizzato MicroScan Walkawais (Beckman Coulter).

Il sistema MicroScan Walkawais è una piattaforma automatizzata ampiamente impiegata nei laboratori di microbiologia clinica per l'identificazione dei microrganismi e l'esecuzione dell'antibiogramma.

La metodica si è basata sull'impiego di pannelli monouso contenenti 96 pozzetti di cui 36 con substrati biochimici disidratati e 60 con concentrazioni predefinite di antibiotici.

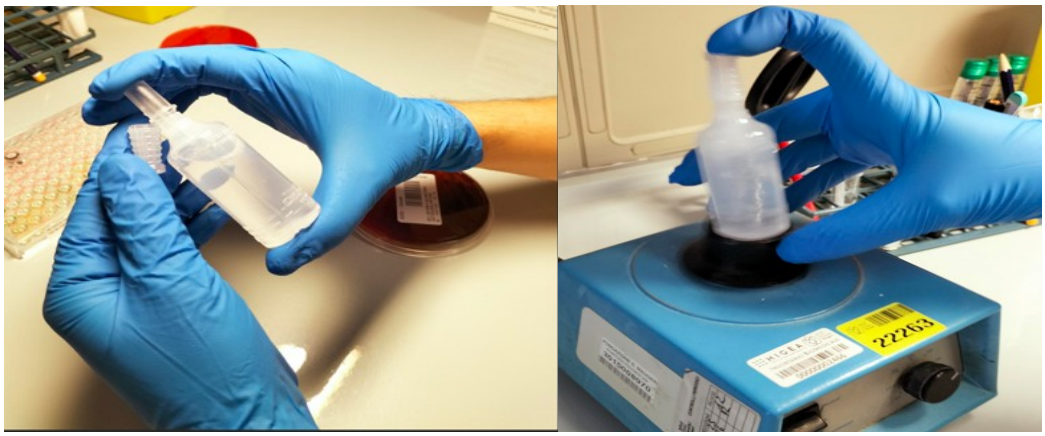
La procedura di allestimento dei pannelli è stata la seguente:

1. A partire da una colonia isolata e pura, è stata preparata una sospensione batterica standardizzata, con torbidità pari a 0.5 McFarland, tramite l'utilizzo del sistema di inoculo Prompt D, il quale consiste in un puntale di propilene sterile dotato di un collare rimovibile per eliminare l'eccesso di colonia batterica adesa ai lati dell'asticella ed un flacone di diluente contenente 30 mL di una soluzione fisiologica con un tensioattivo PLURONIC (pronta all'uso, fornita dalla ditta BECKMAN, sotto brevetto).

Sono state prelevate con l'ago 2-3 colonie isolate dalla piastra, con un gesto rapido e deciso, è stato rimosso il collare e l'asticella è stata quindi immersa nel diluente ed agitata vigorosamente al fine di ottenere una sospensione omogenea (Figura 16).



1) 2)



3) 4)

Figura 16: Fasi della preparazione della sospensione batterica:1) prelievo delle colonie dalla piastra di coltura,2) trasferimento nel flacone contenente il diluente, 3) omogeneizzazione della sospensione e 4) agitazione mediante vortex.

2. I flaconi, una volta etichettati, sono stati agitati nuovamente sul vortex al fine di staccare completamente la colonia dall'asticella; si è eliminato l'ago e sono stati successivamente alloggiati in un apposito rotore e nella parte superiore, sono stati disposti i puntali.

A questo punto il rotore ed i pannelli per l'identificazione e l'antibiogramma (anch'essi etichettati), sono stati disposti nel sistema d'inoculo automatizzato SH2000 (Figura 17) il quale, dopo aver letto tutti i barcode univoci dei pannelli e dei flaconi, li ha associati, e dispensato 115 µL di sospensione batterica dei Prompt nei pozzetti dei pannelli;

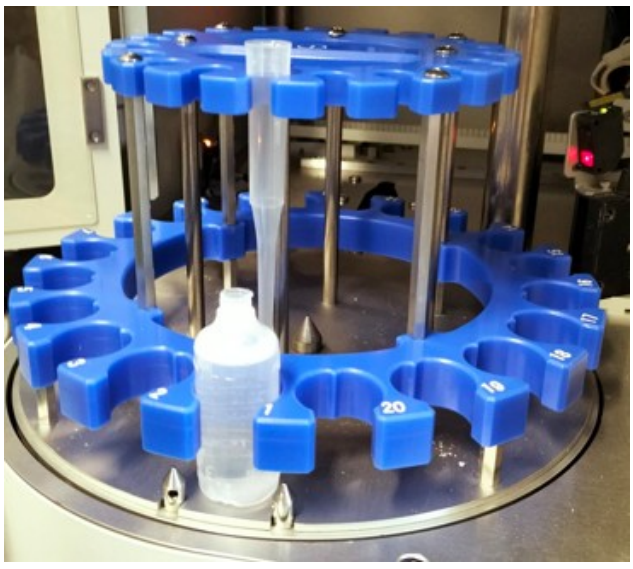


Figura 17: La figura mostra l'inserimento del flacone nel rotore con l'apposito puntale per la distribuzione

3. Terminato l'inoculo, i pannelli sono stati prelevati dall'operatore ed immessi nello strumento Microscan WalkAway plus System (Figura 18), dopo averli chiusi con un apposito coperchio, avendo cura di non toccare il fondo dei pozzetti per evitare che lo strumento legga dei falsi positivi.



Figura 18: La figura mostra l'inserimento del flacone nel rotore con l'apposito puntale per la distribuzione.

4. Lo strumento ha letto i barcode e, dopo 16-20 ore circa ha proceduto alla lettura delle reazioni colorimetriche e delle variazioni di torbidità, tramite il sofisticato sistema ottico di cui dispone con lunghezze d'onda ben standardizzate, al fine di ottenere l'identificazione biochimica e l'antibiogramma del ceppo testato.

Il sistema è collegato ad un PC che presenta un'interfaccia grafica in cui i pannelli erano indicati nei seguenti colori:

- grigio: i pannelli non ancora dispensati;
- giallo: pannelli non ancora letti dallo strumento o che necessitano di incubazioni più protratte;
- rosso: i pannelli pronti alla lettura e validazione dal personale dirigente;
- neri: i pannelli che, per svariati motivi (contaminazione, pozzetti saltati nell'inoculo) sono stati eliminati dal personale dirigente per essere ripetuti;
- verdi: pannelli letti e validati dal personale dirigente.

Lo strumento ha permesso di determinare anche la Concentrazione Minima Inibente (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) per ciascun principio attivo testato.

L'interpretazione dei valori di MIC è stata effettuata secondo i breakpoint clinici definiti dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) vigenti nel periodo dello studio, classificando ciascun antibiotico come sensibile (S), sensibile con aumentata esposizione (I) o resistente (R).

Infatti per ogni antibiotico testato, erano presenti, nel pannello, più pozzetti disposti in serie che contenevano l'antimicrobico a concentrazioni raddoppiate progressivamente (es. 2, 4, 8, 16 µg/mL,…).

Il sistema ha monitorato la torbidità all'interno dei pozzetti. La crescita batterica era inibita solo a partire dal pozzetto in cui la concentrazione di antibiotico era pari o superiore alla MIC del ceppo in esame.

Grazie all'integrazione nello stesso pannello dell'identificazione batterica e dell'antibiogramma, il sistema MicroScan ha consentito di ottenere una caratterizzazione completa del microrganismo isolato, sia dal punto di vista tassonomico sia dal punto di vista del profilo di sensibilità agli antimicrobici. L'identificazione è stata considerata attendibile esclusivamente quando il livello di probabilità rientrava in un intervallo compreso tra l'80% e il 100%, garantendo così un'elevata affidabilità nell'attribuzione del ceppo batterico. Parallelamente, l'esecuzione dell'antibiogramma, associata alla determinazione della MIC, ha permesso di definire con precisione quantitativa la risposta del patogeno ai diversi antibiotici testati.

L'insieme di queste informazioni ha consentito di delineare un profilo fenotipico completo e di supportare il clinico nell'impostazione di una terapia mirata ed efficace, particolarmente rilevante nel trattamento delle infezioni sostenute da microrganismi multi-resistenti (MDR).

3.5 Test immunocromatografico rapido di conferma

NG-TEST® CARBA 5

Se durante la lettura degli antibiogrammi era stata individuata la presenza di un eventuale fenotipo suggestivo della produzione di carbapenemasi, caratterizzato da ridotta sensibilità ai carbapenemi è stato eseguito il test immunocromatografico **NG-Test® CARBA 5** (NG Biotech, Guipry-Messac, Francia), secondo le istruzioni del produttore.

Il test ha consentito la rapida identificazione qualitativa delle cinque principali famiglie di carbapenemasi clinicamente rilevanti, ovvero KPC, NDM, VIM, IMP e OXA-48, mediante rilevazione immunocromatografica degli enzimi prodotti dal microrganismo.

L'esecuzione pratica del saggio è stata estremamente rapida come di seguito indicato.

1. All'interno di una provetta contenente circa 4-5 gocce di un apposito tampone di estrazione (diluente, presente nel kit fornito dalla ditta), è stata stemperata una singola colonia batterica prelevata direttamente dalla piastra positiva.
2. La sospensione è stata omogeneizzata accuratamente, mediante l'utilizzo di un vortex, per favorire la lisi batterica e la conseguente liberazione degli antigeni (le carbapenemasi).
3. Utilizzando una pipetta monouso fornita nel kit, si sono prelevati 100 ul di campione che sono stati dispensati nel pozzetto di lettura della apposita card a cassetta. Una volta dispensati, il liquido è migrato per capillarità lungo la membrana assorbente della card.
Se nel campione fossero stati presenti gli enzimi ricercati, questi si sarebbero legati agli anticorpi specifici coniugati, portando alla formazione di una linea colorata netta in corrispondenza della specifica resistenza posseduta dal ceppo (ad esempio KPC, NDM, VIM, OXA-48 o IMP).
La validità del test è stata confermata dalla comparsa obbligatoria della linea di controllo (Figura 19).

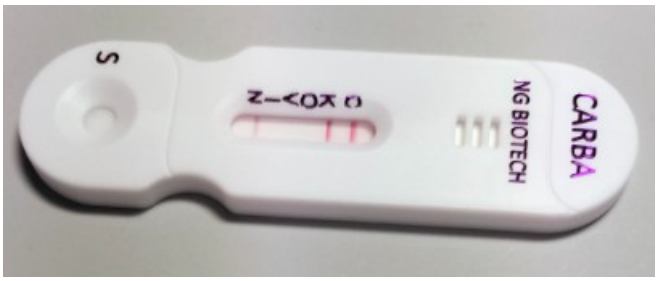


Figura 19: Rappresentazione di un test positivo per 2 meccanismi di Resistenza: KPC e NDM.

4 RISULTATI E DISCUSSIONE

Premessa

Il presente capitolo illustra i risultati dell'analisi microbiologica dei tamponi rettali processati nell'ambito del programma di sorveglianza dei microrganismi multiresistenti (MDR), con particolare riferimento all'identificazione degli *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE).

Sono stati inoltre analizzati i casi di pazienti colonizzati che hanno successivamente sviluppato infezioni del torrente ematico sostenute da CPE.

I dati analizzati nel presente studio derivano sia dai campioni processati nel corso della normale attività diagnostica del laboratorio durante il periodo di internato di tesi, al quale ho preso parte, sia da dati microbiologici storici già presenti nel database del laboratorio e relativi a campioni esaminati in precedenza dal personale della struttura.

L'analisi ha preso in considerazione il periodo compreso tra il 2021 e il 2026, utilizzando come intervallo di riferimento dodici mesi consecutivi, da agosto a luglio dell'anno successivo.

Tale criterio è stato applicato anche ai dati degli anni precedenti, al fine di garantire uniformità nella durata dei periodi analizzati e consentire un confronto omogeneo dei risultati.

Per semplicità espositiva, nei paragrafi successivi ciascun intervallo annuale sarà identificato mediante il relativo anno di riferimento.

Nel periodo compreso tra gli anni 2021/22 e 2025/26 sono stati eseguiti complessivamente **N. 3325 tamponi rettali** di screening per la ricerca di microrganismi MDR (Tabella 1, Grafico 3).

TAMPONI RETTALI			
Anno	N. totale	N. Negativi	N. Positivi
2025/26	779	557	222
2024/25	833	592	241
2023/24	750	522	228
2022/23	496	300	196
2021/22	467	263	204
Totale	3325	2234	1091

Tabella 1: Distribuzione annuale dei tamponi rettali processati per lo screening dei microrganismi multiresistenti agli antibiotici (MDR), con indicazione del numero totale di campioni analizzati e dei campioni positivi/negativi alla crescita microbica, nel periodo 2021/22–2025/26.

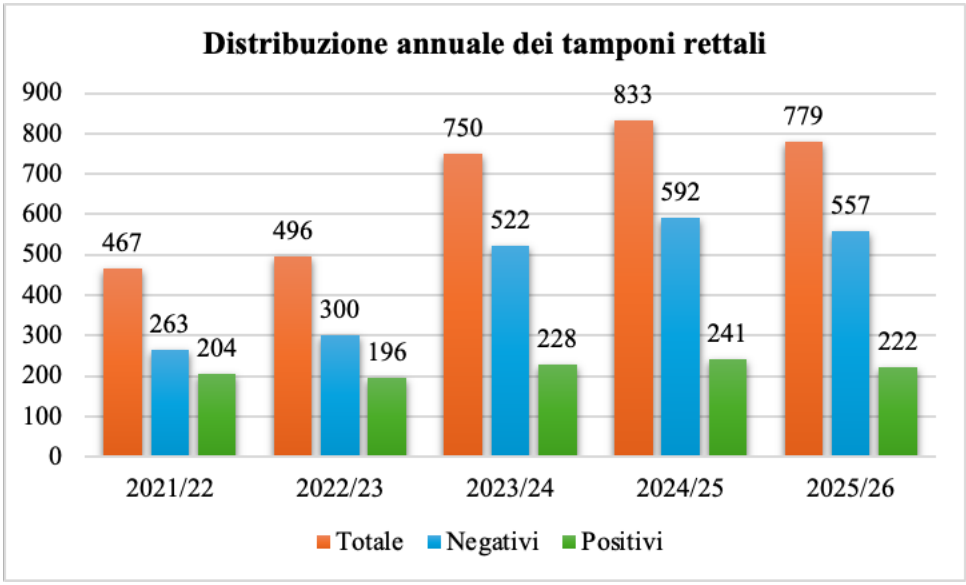


Grafico 3: Distribuzione del numero totale di tamponi rettali processati per lo screening dei microrganismi MDR, suddivisi in campioni positivi e negativi alla crescita microbica, nel periodo 2021/22–2025/26.

Dall'analisi della Tabella 1 e del Grafico 3 sono emersi i seguenti risultati:

- Il numero complessivo di tamponi rettali processati è aumentato da 467 nel 2021/22 a 779 nel 2025/26, raggiungendo il valore massimo di 833 campioni nell'anno 2024/25.
- Il numero di tamponi risultati positivi alla crescita microbica è passato da 204 nel 2021/22 a 222 nel 2025/26, mostrando variazioni relativamente contenute rispetto all'aumento complessivo dei campioni analizzati.
- La percentuale di positività alla crescita microbica si è progressivamente ridotta nel corso del periodo considerato, passando dal 43,7% nel 2021/22 al 39,5% nel 2022/23, al 30,4% nel 2023/24, al 28,9% nel 2024/25 e infine al 28,5% nel 2025/26 (Tabella 2, Grafico 4).
- **Si può, quindi, concludere che l'aumento del numero di tamponi rettali processati non è stato accompagnato da un incremento proporzionale dei campioni positivi.** Al contrario, la percentuale di positività si è ridotta complessivamente di 15,2 punti percentuali, indicando una minore frequenza relativa di risultati positivi tra i campioni analizzati negli anni più recenti (Tabella 2, Grafico 4).

Anno	*%Negativo*	*%Positivo*
2025/26	71.5	28.5
2024/25	71.1	28.9
2023/24	69.6	30.4
2022/23	60.5	39.5
2021/22	56.3	43.7

Tabella 2: Distribuzione percentuale dei tamponi rettali positivi e negativi allo screening microbiologico per microrganismi multiresistenti (MDR) nel periodo 2021/22–2025/26.

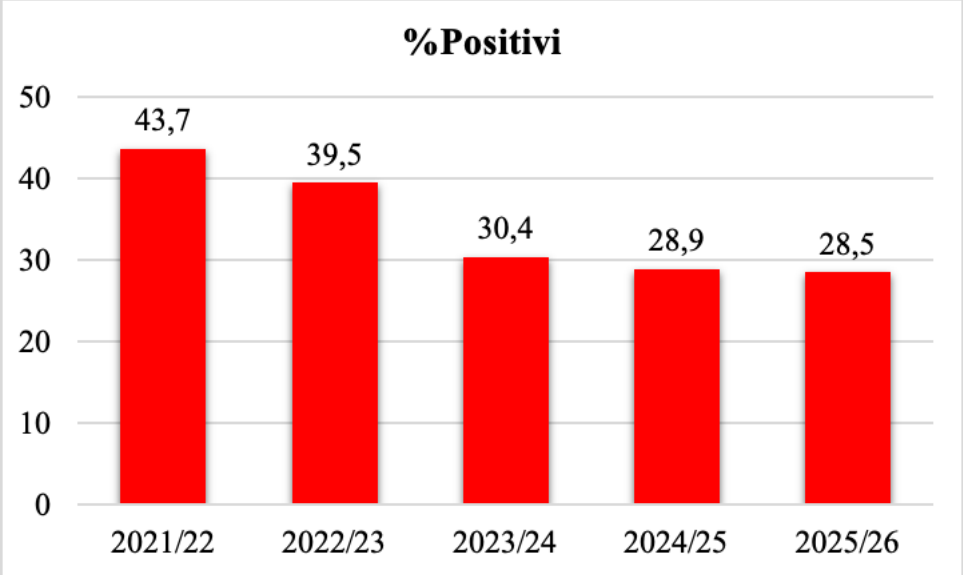


Grafico 4: Andamento annuale della percentuale di tamponi rettali risultati positivi allo screening microbiologico per MDR nel periodo 2021/22–2025/26.

La riduzione più evidente si osserva tra il 2022/23 e il 2023/24, quando la percentuale di positività diminuisce dal 39,5% al 30,4%. Negli anni successivi, invece, si osserva una sostanziale stabilizzazione, con valori che si mantengono intorno al 29%. Questo andamento potrebbe riflettere una progressiva riduzione della circolazione dei microrganismi MDR all'interno della struttura sanitaria, potenzialmente associata al rafforzamento delle misure di prevenzione e controllo delle

infezioni (*Infection Prevention and Control*, IPC). Tra queste rientrano l'igiene delle mani, l'adozione di precauzioni da contatto per i pazienti colonizzati, la sanificazione ambientale e l'applicazione di programmi di *Antimicrobial Stewardship*, finalizzati a promuovere un utilizzo appropriato degli antibiotici e a limitare la diffusione delle resistenze.

Sebbene la percentuale di positività dei tamponi rettali abbia mostrato una progressiva diminuzione nel corso del periodo di studio, il numero assoluto di campioni risultati positivi è rimasto relativamente costante. Questo andamento suggerisce che la riduzione percentuale osservata sia principalmente riconducibile all'aumento del numero totale di tamponi eseguiti, piuttosto che a una reale diminuzione del numero di soggetti colonizzati da CPE. (Grafico 5).

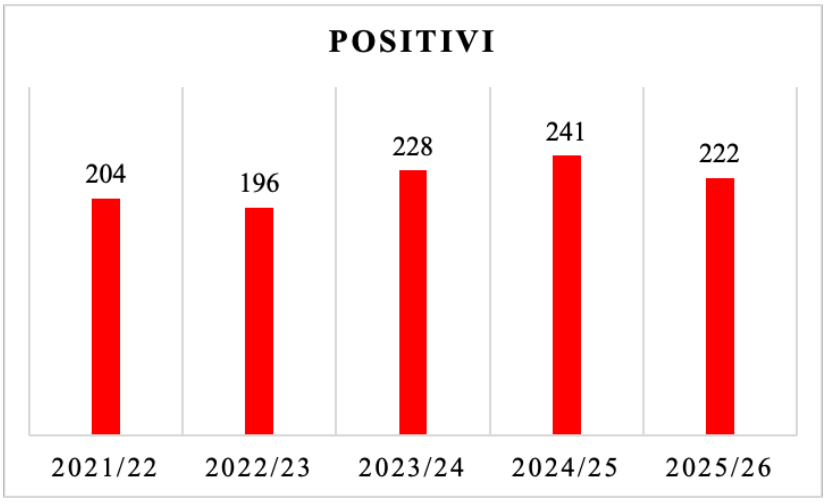


Grafico 5: Andamento annuale del numero assoluto di tamponi rettali positivi allo screening microbiologico per microrganismi multiresistenti (MDR) nel periodo 2021/22–2025

Questi dati evidenziano come il fenomeno della colonizzazione da microrganismi MDR continui a rappresentare una problematica rilevante, anche in presenza di una diminuzione della prevalenza relativa.

Di conseguenza, l'aumento dell'attività di screening ha consentito di sorvegliare un numero simile o leggermente superiore, nel corso degli anni, di pazienti colonizzati, migliorando la capacità di intercettare precocemente e di isolare i soggetti a rischio di trasmissione. Nel complesso questi dati mostrano un incremento dell'attività di sorveglianza associato a una progressiva riduzione delle percentuali di pazienti colonizzati.

Questo aspetto sottolinea l'efficacia delle strategie di prevenzione e controllo adottate, senza diminuire l'attenzione del fenomeno.

Distribuzione per sesso dei pazienti sottoposti a screening

Nel periodo di osservazione è emersa una costante predominanza del sesso maschile nella distribuzione dei tamponi rettali effettuati. Complessivamente, su N. 3.325 campioni analizzati, 2.135 (64,2%) erano di pazienti di sesso maschile e 1.190 (35,8%) di pazienti di sesso femminile, con un rapporto uomini/donne pari a 1,8:1. Tale differenza si è riscontrata in tutti gli anni considerati, come riportato nel Grafico 6.

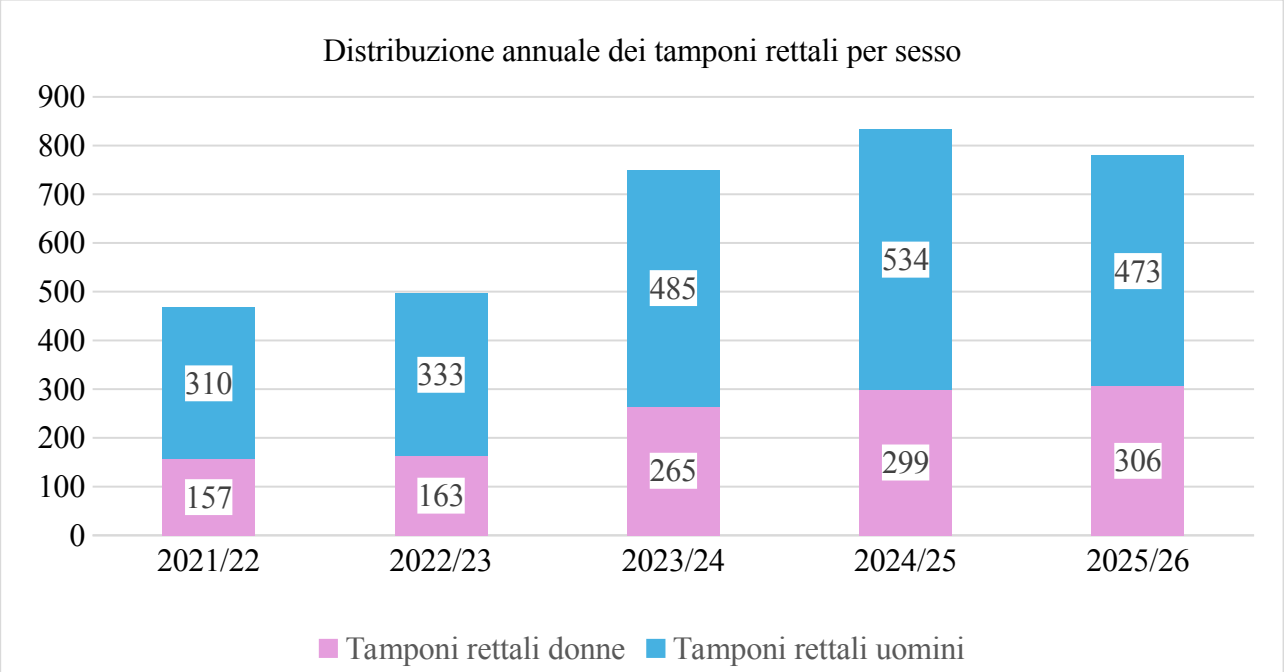


Grafico 6: Distribuzione annuale del numero di tamponi rettali effettuati per lo screening dei microrganismi multiresistenti (MDR), suddivisi in base al sesso dei pazienti, nel periodo 2021/22–2025/26.

Si è osservato, inoltre, un aumento del numero di tamponi rettali effettuati sia nei pazienti di sesso maschile sia in quelli di sesso femminile, in linea con l'incremento complessivo dell'attività di sorveglianza microbiologica descritto in precedenza. In particolare, i campioni provenienti da pazienti di sesso femminile sono quasi raddoppiati, passando da N. 157 nel 2021/22 a 306 nel 2025/26, mentre quelli relativi ai pazienti di sesso maschile sono aumentati da 310 a 473.

Considerando la distribuzione percentuale e non il numero assoluto, è emersa una lieve ma progressiva crescita dei tamponi effettuati su pazienti di sesso femminile che è passata dal 33,6% nel 2021/22 al 39,3% nel 2025/26, mentre quella relativa ai pazienti di sesso maschile si è ridotta dal 66,4% al 60,7% (Grafico 7).

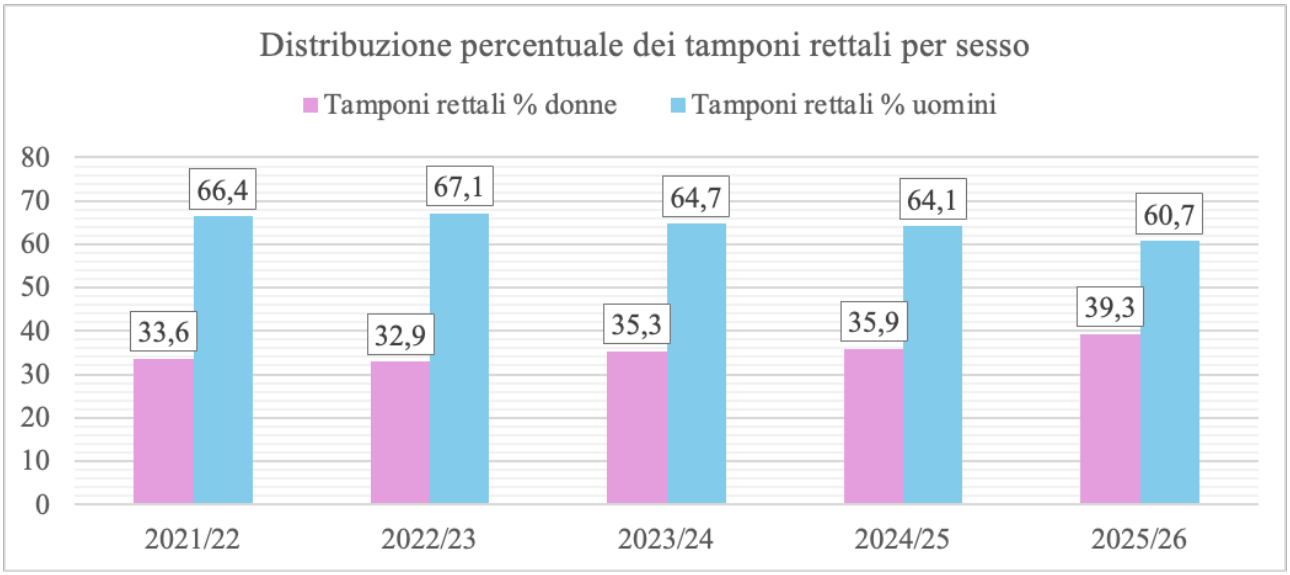


Grafico 7: Distribuzione percentuale annuale dei tamponi rettali effettuati per lo screening dei microrganismi multiresistenti (MDR), suddivisi in base al sesso dei pazienti, nel periodo 2021/22–2025/26.

Nonostante la maggiore rappresentazione del sesso maschile durante tutto il periodo di osservazione, negli ultimi anni si è evidenziata una distribuzione leggermente più equilibrata dei tamponi rettali tra uomini e donne. Tale andamento potrebbe essere legato a variazioni nelle caratteristiche della popolazione assistita, nella composizione dei pazienti ricoverati nei diversi reparti oppure nei criteri adottati per l'esecuzione dello screening.

Distribuzione per fascia d'età e sesso: anno 2025/26

Per approfondire le caratteristiche della popolazione sottoposta a screening, l'analisi della distribuzione dei tamponi rettali in relazione al sesso e alla fascia d'età è stata condotta sull'annualità 2025-2026, scelta in quanto comprendente il periodo di tirocinio sperimentale durante il quale è stata svolta l'attività di ricerca.

Complessivamente, sono stati esaminati 473 campioni provenienti da pazienti di sesso maschile e 306 da pazienti di sesso femminile. In entrambi i gruppi, la maggior parte dei tamponi è stata effettuata nella popolazione di età compresa tra 60 e 89 anni, evidenziando una maggiore concentrazione dell'attività di screening nelle fasce d'età più avanzate (Tabelle 3 e 4).

Tamponi Rettali Anno 2025/2026		UOMINI		
Fasce d'età	N.Negativi	N.Positivi	N.totale	% Positivi
15-29	10	11	21	52.4
30-44	12	9	21	42.8
45-59	57	22	79	27.8
60-74	119	69	188	36.7
75-89	109	40	149	26.8
>90	10	5	15	33.3

Tabella 3: Distribuzione dei tamponi rettali effettuati su pazienti di sesso maschile nell'anno 2025/26, suddivisi per fascia d'età, con indicazione del numero di campioni positivi e negativi, del totale analizzato e della percentuale di positività per ciascuna fascia.

Tamponi Rettali Anno 2025/2026		DONNE		
Fasce d'età	N.Negativi	N.Positivi	N.totale	% Positivi
15-29	10	2	12	16.7
30-44	9	1	10	10
45-59	29	9	38	23.7
60-74	78	27	105	25.7
75-89	102	22	124	17.7
>90	12	5	17	29.4

Tabella 4: Distribuzione dei tamponi rettali effettuati su pazienti di sesso femminile nell'anno 2025/26, suddivisi per fascia d'età, con indicazione del numero di campioni positivi e negativi, del totale analizzato e della percentuale di positività per ciascuna fascia.

Dall'analisi delle Tabelle 3 e 4 emergono alcune differenze nella distribuzione dei risultati positivi tra i due sessi e le diverse fasce d'età:

- Nei pazienti di sesso maschile, il maggior numero di tamponi è stato effettuato nella fascia 60–74 anni, con 188 campioni analizzati, di cui 69 positivi alla crescita microbica (36,7%).

- La percentuale di positività più elevata si è osservata tuttavia nella fascia 15–29 anni (52,4%), seguita da quella di 30–44 anni (42,8%). Questi valori devono essere considerati tenendo conto del numero più limitato di campioni analizzati nelle fasce d'età più giovani.
- Nelle pazienti di sesso femminile, invece, il maggior numero di tamponi è stato effettuato nella fascia 75–89 anni, con 124 campioni, di cui 22 positivi (17,7%).
- Il numero più elevato di risultati positivi si è registrato nella fascia 60–74 anni, con 27 campioni positivi su 105 analizzati (25,7%).
- La percentuale di positività più alta si è osservata nelle donne di età superiore ai 90 anni (29,4%).

In conclusione, la percentuale di positività alla crescita microbica è risultata superiore nei campioni provenienti da pazienti di sesso maschile (33,0%) rispetto a quelli di sesso femminile (21,6%).
La prevalenza di colonizzazione è risultata quindi circa 1.5 volte superiore nel sesso maschile rispetto a quello femminile. Analizzando le singole fasce d'età, gli uomini hanno mostrato una percentuale di positività superiore alle donne in tutte le fasce d'età, con differenze più evidenti nei gruppi più giovani. Questo dato deve però, essere interpretato con prudenza vista la ridotta numerosità campionaria.
Inoltre, questi dati dovrebbero anche essere considerati in relazione a soggetti selezionati sulla base di specifici fattori di rischio.

Distribuzione dei determinanti di antibiotico-resistenza nei tamponi rettali positivi alla crescita microbica nel periodo 2025/26

L'analisi dei tamponi rettali risultati positivi per enterobatteri produttori di carbapenemasi (CPE), con successiva caratterizzazione dei determinanti di resistenza mediante test immunocromatografico NG-Test CARBA 5, ha evidenziato una netta predominanza di NDM (New Delhi metallo-β-lattamasi), rilevata in 118 isolati. Seguivano i ceppi produttori di KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasi), pari a 74 isolati, mentre i determinanti VIM e OXA-48 sono risultati significativamente meno rappresentati, con 12 e 1 isolato rispettivamente. Erano inoltre presenti alcuni isolati caratterizzati dalla co-produzione di due carbapenemasi, a testimonianza della crescente complessità dei meccanismi di resistenza osservati. Le diverse associazioni riscontrate sono riportate nella Tabella 5.

TAMPONI RETTALI Determinanti di resistenza anno 2025/26	
NDM	118
KPC	74
VIM	12
NDM+KPC	9
NDM+VIM	5
NDM+OXA 48	3
OXA 48	1

Tabella 5: Distribuzione delle carbapenemasi identificate nei campioni di tampone rettale positivi per *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) nell'anno 2025/26, con indicazione del numero di riscontri per ciascuna tipologia e delle associazioni tra più carbapenemasi.

La presenza di isolati che co-esprimono più determinanti di resistenza riveste particolare interesse epidemiologico perché rivela la circolazione di batteri caratterizzati da profili genetici complessi e potenzialmente associati a una maggior capacità di diffusione e persistenza nell'Istituto Maugeri.
Nel complesso, dall'analisi dei dati si evince, nella struttura Maugeri, nel periodo considerato, la predominanza delle carbapenemasi metallo-beta-lattamasi, rappresentate soprattutto da NDM. Questo dato appare coerente con i recenti assetti epidemiologici osservati in numerose realtà sanitarie italiane e europee, nelle quali si assiste ad un progressivo aumento di ceppi di *Enterobacteriaceae* NDM produttori accanto alla tradizionale presenza di isolati KPC (Bassetti et., al 2020).
La co-espressione di differenti carbapenemasi all'interno della struttura testimonia la complessità dell'epidemiologia locale delle resistenze e sottolinea l'importanza di programmi continuativi di sorveglianza microbiologica.
Dal punto di vista clinico-assistenziale, la predominanza di isolati NDM ha assunto particolare rilevanza poiché i ceppi produttori di metallo-beta-lattamasi presentano opzioni terapeutiche più limitate rispetto ad altri meccanismi di resistenza.
Inoltre, l'identificazione precoce dei pazienti colonizzati mediante screening rettale ha consentito l'applicazione tempestiva delle misure di isolamento e delle strategie di prevenzione della trasmissione crociata, contribuendo al contenimento della diffusione dei microrganismi multiresistenti.

Andamento dei pazienti con sepsi da CPE

Nel quinquennio 2021/22–2025/26 sono stati registrati complessivamente 136 casi di sepsi da microrganismi CPE, con una media di circa 27 casi all'anno (Tabella 6).

Anno	Pazienti con sepsi da CPE	
2025/26	**32**	
2024/25	**23**	
2023/24	**27**	
2022/23	**24**	
2021/22	**30**	

Tabella 6: Distribuzione annuale del numero di pazienti con sepsi da *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) nel periodo 2021/22–2025/26.

A differenza di quanto osservato per lo screening mediante tampone rettale, caratterizzato da un incremento del numero di campioni analizzati e da una progressiva riduzione della percentuale di positività, il numero di pazienti con sepsi da CPE non ha mostrato una corrispondente tendenza alla diminuzione. Dopo una riduzione iniziale da 30 casi nel 2021/22 a 24 nel 2022/23, si sono osservate oscillazioni negli anni successivi, fino al raggiungimento del valore massimo di 32 casi nel 2025/26. Questo andamento ha evidenziato come la riduzione percentuale dei tamponi rettali positivi non fosse stata accompagnata da una diminuzione altrettanto evidente dei casi di sepsi da CPE.
I due fenomeni, pur essendo strettamente collegati dal punto di vista clinico ed epidemiologico, non seguono necessariamente lo stesso andamento, poiché lo sviluppo di un'infezione invasiva dipende da diversi fattori, tra cui le condizioni cliniche del paziente, le eventuali comorbidità e l'esposizione a procedure assistenziali invasive.
La persistenza di casi di sepsi durante l'intero periodo di osservazione ha sottolineato quindi l'importanza di affiancare all'attività di screening microbiologico adeguate misure di prevenzione e controllo delle infezioni, programmi di *antimicrobial stewardship* e una particolare attenzione ai pazienti maggiormente vulnerabili. L'integrazione di questi interventi rappresenta un elemento essenziale per affrontare non soltanto la diffusione dei microrganismi multiresistenti, ma anche le possibili conseguenze cliniche associate alle infezioni invasive da CPE

Tempo di progressione dalla colonizzazione alla batteriemia nel periodo2025/26

Nel periodo 2025/2026, nei 32 pazienti che hanno sviluppato batteriemia da CPE dopo il riscontro di positività del tampone rettale eseguito all'ingresso, l'intervallo di tempo tra il primo isolamento dell'isolatoa livello intestinale e la successiva positivizzazione dell'emocoltura variava da 3 a 120 giorni, con un valore medio di 37,9 giorni (Tabella 7).

Paziente	gg
1	15
2	20
3	90
4	25
5	30
6	20
7	40
8	20
9	14
10	3
11	3
12	60
13	40
14	120
15	10
16	60
17	20
18	30
19	15
20	10
21	90
22	60
23	4
24	60
25	60
26	90
27	90
28	10
29	60
30	30
31	7
32	7

Tabella 7: Intervallo temporale, espresso in giorni, tra il primo riscontro di colonizzazione intestinale mediante tampone rettale e la successiva positività dell'emocoltura per CPE nei 32 pazienti analizzati nell'anno 2025/26.

L’analisi dell’intervallo temporale tra la colonizzazione intestinale e lo sviluppo della batteriemia ha evidenziato che la progressione all’infezione può verificarsi sia in tempi molto rapidi sia a distanza di diversi mesi dal primo riscontro microbiologico. Infatti, alcuni pazienti hanno sviluppato sepsi entro pochi giorni dalla positività del tampone rettale (3-7 gg) suggerendo che al momento dello screening fossero già presenti condizioni cliniche favorevoli allo sviluppo dell’infezione. Al contrario altri pazienti hanno manifestato batteriemia dopo periodi più lunghi (90-120 gg), indicando la possibilità di una persistenza prolungata dello stato di colonizzazione e di un rischio infettivo che può mantenersi nel tempo.

Il valore medio da noi documentato è di circa 38 giorni e questo ha suggerito che la colonizzazione intestinale da CPE rappresenti un fattore di rischio non solo immediato ma anche a medio termine.

Quindi è importantissimo mantenere un alto livello di sorveglianza clinica e microbiologica costante tra i pazienti ricoverati e colonizzati, soprattutto nei soggetti fragili, portatori di dispositivi invasivi o sottoposti a terapie antibiotiche prolungate.

In sintesi, possiamo concludere che il tampone rettale positivo può precedere di diverse settimane l’insorgenza della batteriemia, offrendo quindi una finestra temporale potenzialmente utile per l’identificazione dei pazienti a maggior rischio e per l’attuazione di strategie preventive mirate.

Confronto fra il numerodi pazienti colonizzati da CPE e con sepsi negli annni considerati

Confrontando il numero di pazienti colonizzati da CPE e di pazienti con sepsi da CPE (Tabella 8) si è osservato che:

- Il numero di soggetti colonizzati è rimasto relativamente stabile (circa 196-241 casi/anno);
- Il numero assoluto di sepsi è comparabile negli anni considerati (23-32 casi/anno).

Anno	N. pazienti colonizzati	N. pazienti con sepsi da CPE
2025/2026	222	32
2024/2025	241	23
2023/2024	228	27
2022/2023	196	24
2021/2022	204	30

Tabella 8: Confronto annuale tra il numero di tamponi rettali positivi per CPE e il numero di pazienti con sepsi da CPE nel periodo 2021/22-2025/26

Questi dati sottolineano la persistenza del rischio di progressione dalla colonizzazione all'infezione invasiva in pazienti fragili. Inoltre, è importante segnalare nel periodo 2025/26 l'incremento delle sepsi da CPE nei soggetti colonizzati, nonostante si fosse registrato una percentuale di colonizzazione inferiore rispetto agli anni iniziali dello studio. Questo potrebbe essere legato sia alla maggior complessità dei pazienti ricoverati, sia alla persistente pressione selettiva antibiotica, sia dalla diffusione di ceppi particolarmente virulenti e caratterizzati da elevata capacità di invasione.

Relazione tra colonizzazione intestinale e sepsi da CPE in base ai determinanti di resistenza (anno 2025/26)

Sono stati, inoltre, confrontati i determinanti di resistenza ai carbapenemi riscontrati tra i tamponi rettali positivi alla crescita microbica e quelli rilevati nelle emocolture positive per CPE nei pazienti colonizzati (Tabella 9).

Anno 2025/2026	T. Rettali	Emocolture
NDM	118	11
KPC	74	16
OXA-48	1	1
VIM	12	1
NDM+KPC	9	3
NDM+VIM	5	-
NDM+OXA-48	3	-

Tabella 9: Confronto della distribuzione dei determinanti di resistenza ai carbapenemi identificati nei tamponi rettali e nelle emocolture positive per CPE nell'anno 2025/26, comprese le associazioni tra più carbapenemasi.

Nei tamponi rettali il determinante di resistenza predominante è risultato NDM, mentre KPC rappresenta il secondo meccanismo di resistenza per frequenza.

Al contrario nelle emocolture dei pazienti colonizzati la situazione è esattamente all'opposto: KPC era il determinante più frequentemente associato all'infezione invasiva (N. 16 casi) superando i microrganismi NDM-produttori (N. 11).

Un dato particolarmente interessante riguarda il rapporto tra colonizzazione e infezione.

Sebbene NDM fosse il genotipo più frequentemente isolato nei tamponi rettali, KPC è risultato associato a un numero maggiore di sepsi (16 casi contro 11).
Tale osservazione potrebbe suggerire una maggiore capacità dei ceppi KPC di determinare infezioni invasive oppure riflettere differenti caratteristiche cliniche dei pazienti colonizzati.
Tuttavia, per confermare questa ipotesi sarebbero necessari ulteriori approfondimenti relativi ai fattori di rischio individuali e alla virulenza dei microrganismi coinvolti.
Le carbapenemasi OXA-48 e VIM sono state riscontrate con frequenza decisamente inferiore sia nei pazienti colonizzati sia nei casi di sepsi. In particolare, OXA-48 è stata identificata in un solo campione rettale e in una sola emocoltura, mentre VIM è stata rilevata in 12 tamponi rettali ma associata a un unico episodio di sepsi.
Questo dato potrebbe indicare una minore diffusione di tali meccanismi di resistenza nel contesto studiato.
Particolarmente rilevante è anche il riscontro di ceppi che co-esprimono 2 carbapenemasi (NDM+KPC) sia nei tamponi rettali sia nelle emocolture. La presenza di tali isolati ha indicato la circolazione di isolati con profili di resistenza estremamente complessi, potenzialmente associati a opzioni terapeutiche limitate e una maggior difficoltà di controllo epidemiologico.
Nel complesso, i risultati hanno evidenziato come NDM e KPC rappresentino i principali meccanismi di -resistenza ai carbapenemi sia nei pazienti colonizzati che nelle infezioni ematiche. Inoltre, questi dati confermano la necessità di mantenere elevati livelli di sorveglianza microbiologica e di rafforzare le misure di controllo delle infezioni, soprattutto nei confronti dei pazienti colonizzati, che costituiscono il principale serbatoio per la diffusione di questi patogeni ad elevato impatto clinico.

Confronto dei profili di antibiotico-resistenza

L'analisi comparativa dei profili fenotipici ha evidenziato una sovrapponibilità fenotipica tra i ceppi di *Enterobacterales* carbapenemasi produttori da tamponi rettali e quelli identificati successivamente nelle emocolture dei medesimi pazienti.
Tutti gli isolati sono stati caratterizzati mediante test di sensibilità antimicrobica fenotipica. Le concentrazioni minime inibitorie (MIC) sono state determinate secondo i breakpoint attuali dell'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (eucast.org) e i ceppi produttori di carbapenemasi, confermati con meccanismi immunocromatografici.
Per il presente studio, gli isolati appartenenti all'ordine *Enterobacterales* sono stati considerati produttori di carbapenemasi (CPE) quando risultati resistenti a meropenem e/o imipenem secondo i criteri EUCAST. Sono stati inoltre inclusi gli isolati che, pur non rientrando nei criteri di resistenza, presentavano valori di sensibilità ridotta o prossimi ai valori soglia epidemiologici (ECOFF). In

tutti i casi, la presenza di carbapenemasi è stata successivamente confermata mediante test immunocromatografico. Il confronto dei profili di antibiotico-resistenza ha mostrato sovrapponibilità, suggerendo che l'isolato responsabile della batteriemia fosse verosimilmente lo stesso precedentemente rilevato come colonizzante a livello intestinale (Tabella 10, Grafico 8).

Antibiotico	**MIC**	**%S**	**%R**
amoxicillina-ac.clavulanico	>=32	0	100
piperacillina tazobactam	>=128	0	100
cefotaxime	>=64	0	100
ceftazidime	>=64	0	100
ceftazidime-avibactam	<=2	80	20
cefepime	>=16	0	100
cefiderocol	<=2	100	0
ceftalozano-tazobactam	>=64	0	100
ertapenem	>2	0	100
imipenem	>=16	0	100
meropenem	>=64	0	100
meropenem-vaborbactam	>=64	20	80
amikacina	>=32	46	54
gentamicina	>=64	37	63
ciprofloxacina	>=16	3	97
colistina	<=4	100	0
trimethoprim-sulfametozzazolo	>=8	33	67

Tabella 10: Profilo di sensibilità agli antibiotici degli isolati di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE), con indicazione delle concentrazioni minime inibitorie (MIC) e delle percentuali di sensibilità (%S) e resistenza (%R) ai diversi antimicrobici analizzati.



Grafico 8: Distribuzione percentuale della sensibilità e della resistenza agli antibiotici degli isolati di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE), sulla base dei risultati dei test di sensibilità antimicrobica.

Un ulteriore dato di rilievo emerso è lo studio del profilo di resistenza dei ceppi di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) che ha evidenziato un'elevata percentuale di resistenza nei confronti della maggior parte delle classi antibiotiche testate.

In particolare, tutti gli isolati sono risultati resistenti ad amoxicillina/acido clavulanico, piperacillina/tazobactam, cefotaxime, ceftazidime, cefepime, ceftolozano/tazobactam, ertapenem, imipenem e meropenem.

L'attività di alcuni antibiotici, come amikacina, gentamicina, ciprofloxacina e trimethoprim -sulfametozzazolo variava al variare del tipo di carbapenemasi prodotta dal ceppo considerato.

Tra le molecole di più recente introduzione, la combinazione ceftazidime/avibactam ha mostrato un'elevata attività, con una percentuale di sensibilità pari all'80%, mentre meropenem/vaborbactam è risultata attiva solo nel 20% degli isolati. Tale differenza è attribuibile alla diversa distribuzione dei meccanismi enzimatici di resistenza presenti nella popolazione studiata, poiché l'efficacia degli inibitori di B-lattamasi varia in funzione della classe di carbapenemasi prodotta. Al contrario, cefiderocol ha mantenuto si è dimostrato attivo in *vitro* nei confronti di tutti gli isolati analizzati (100% di sensibilità), confermandosi tra le molecole maggiormente efficaci nel trattamento delle infezioni da CPE.

È opportuno sottolineare che il profilo di sensibilità agli antibiotici variava in funzione del meccanismo di resistenza responsabile della produzione di carbapenemasi, con differenze tra i diversi enzimi identificati. Infatti, avibactam e vaborbactam sono inibitori efficaci nei confronti delle carbapenemasi di classe A, in particolare KPC, mentre non possiedono attività nei confronti delle metallo-β-lattamasi (NDM, VIM e IMP); inoltre, vaborbactam non è attivo nei confronti delle carbapenemasi di classe D (OXA-48-like) (Bush & Bradford, 2019).

Di conseguenza, la presenza nella popolazione studiata di differenti meccanismi enzimatici giustifica la variabilità dei profili di sensibilità.

Un ulteriore dato di rilievo emerso dallo studio è rappresentato dalla completa sovrapponibilità del profilo fenotipico tra gli isolati ottenuti dai tamponi rettali e quelli isolati dalle emocolture nei medesimi pazienti.

Tale osservazione suggerisce che il ceppo responsabile della batteriemia potrebbe derivare dalla flora intestinale precedentemente colonizzante, confermando il ruolo della colonizzazione da CPE quale importante fattore di rischio per lo sviluppo di infezioni invasive.

Possiamo, però, solo parlare di "sovrapponibilità fenotipica" e di "elevata probabilità di correlazione epidemiologica" tra i ceppi, ma non si può affermare con certezza che "si tratta certamente dello stesso ceppo" perché questa conclusione richiederebbe l'utilizzo di metodiche di tipizzazione molecolare. Pertanto, possiamo concludere in base ai risultati rilevati dell'identificazione biochimica e dell'antibiogramma, che i ceppi isolati nell'emocoltura hanno mostrato profili fenotipici uguali a quelli precedentemente riscontrati nei tamponi rettali dei medesimi pazienti, suggerendo una correlazione epidemiologica e un'origine endogena dell'infezione invasiva.

Infatti, la coincidenza del profilo fenotipico e del meccanismo di resistenza costituisce un forte elemento a sostegno dell'origine comune dei due isolati. Questo risultato sottolinea l'importanza dello screening microbiologico mediante tampone rettale non solo per finalità di sorveglianza epidemiologica e di controllo delle infezioni, ma anche come strumento utile a orientare

precocemente la terapia antibiotica empirica nei pazienti ad elevato rischio di sviluppare infezioni invasive da CPE.

5 CONCLUSIONI

Il presente studio ha analizzato l'epidemiologia della colonizzazione intestinale da isolati di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) e la sua possibile relazione con lo sviluppo di infezioni invasive in una popolazione ospedaliera sottoposta a sorveglianza microbiologica attiva nel periodo 2021/22–2025/26.

L'analisi dei dati ha evidenziato come l'implementazione sistematica dello screening mediante tampone rettale abbia consentito un progressivo ampliamento dell'attività di sorveglianza, documentato dall'incremento del numero di esami eseguiti nel corso del quinquennio.

Contestualmente è stata osservata una riduzione della percentuale di positività, passata dal 43,7% al 28,5%, suggerendo una diminuzione della prevalenza della colonizzazione da CPE nella popolazione sottoposta a controllo.

Tale andamento potrebbe riflettere l'efficacia delle misure di prevenzione e controllo delle infezioni adottate all'interno della struttura, comprese le procedure di isolamento, il rafforzamento delle pratiche di igiene, la sorveglianza microbiologica attiva e le strategie di *antimicrobial stewardship*.

Nonostante questa apparente riduzione della pressione epidemiologica, il fenomeno della colonizzazione da CPE continua a rappresentare una problematica di rilevante impatto clinico.

Infatti, il numero assoluto di soggetti colonizzati è rimasto elevato durante tutto il periodo di osservazione e una quota significativa di tali pazienti ha successivamente sviluppato un'infezione invasiva. Questo dato conferma come la colonizzazione intestinale non costituisca un semplice reperto microbiologico, bensì una condizione dinamica e potenzialmente evolutiva, in grado di rappresentare il punto di partenza per eventi infettivi gravi.

Dal punto di vista epidemiologico, uno dei risultati più significativi emersi dallo studio riguarda la profonda differenza della distribuzione dei determinanti di resistenza ai carbapenemi.

Nei primi anni di osservazione la popolazione CPE era dominata dai ceppi produttori di KPC, storicamente considerati il principale meccanismo di resistenza ai carbapenemi-nel contesto nazionale.

Nel corso del tempo si è tuttavia assistito a una progressiva espansione dei ceppi NDM-produttori, che hanno gradualmente sostituito gli isolati produttori di KPC fino a diventare il determinante prevalente negli ultimi anni dello studio.

La crescente diffusione di NDM assume particolare rilevanza dal punto di vista clinico. Le metallo-β-lattamasi sono infatti associate a limitate opzioni terapeutiche e rappresentano una delle principali sfide della moderna microbiologia clinica (Tan et al., 2021).

L'identificazione, negli anni più recenti, di ceppi caratterizzati dalla contemporanea presenza di più carbapenemasi evidenzia inoltre una crescente complessità dello scenario epidemiologico locale e suggerisce l'esistenza di processi di acquisizione e trasferimento genetico che meritano un attento monitoraggio.

Un ulteriore aspetto di rilievo è rappresentato dalla possibile relazione osservata tra colonizzazione intestinale e batteriemia.

Sebbene il numero complessivo di sepsi da CPE sia rimasto relativamente stabile nel tempo, variando tra 23 e 32 casi annui, il confronto con i dati di sorveglianza microbiologica ha dimostrato che tutti i pazienti che hanno sviluppato una batteriemia risultavano precedentemente colonizzati.

Questo risultato assume particolare valore poiché conferma il ruolo della colonizzazione intestinale quale principale serbatoio epidemiologico dei CPE e supporta l'ipotesi che l'infezione invasiva derivi frequentemente da una progressione endogena del microrganismo già presente nel tratto gastrointestinale.

La sostanziale sovrapponibilità dei profili fenotipici osservata tra gli isolati ottenuti dai tamponi rettali e quelli successivamente identificati nelle emocolture rafforza ulteriormente questa interpretazione.

Pur in assenza di tecniche di tipizzazione molecolare, la concordanza degli antibiogrammi suggerisce una stretta correlazione epidemiologica tra colonizzazione e infezione, indicando che il ceppo responsabile della batteriemia fosse verosimilmente lo stesso precedentemente identificato durante lo screening.

Particolarmente significativo è il dato relativo alla progressione dalla colonizzazione all'infezione invasiva. Nel corso del quinquennio, tra il 10% e il 15% dei pazienti colonizzati ha sviluppato una batteriemia da CPE. In termini clinici, ciò significa che circa un paziente colonizzato ogni sette-otto ha sviluppato una condizione infettiva grave. Tale percentuale è rimasta relativamente costante nel tempo, anche in presenza della riduzione della prevalenza di colonizzazione, suggerendo che il rischio individuale di sviluppare una batteriemia nei soggetti colonizzati continui a essere elevato e fortemente influenzato dalle condizioni cliniche dell'ospite.

L'analisi temporale effettuata sui casi di sepsi dell'ultimo anno di osservazione ha inoltre evidenziato un intervallo medio di circa 38 giorni tra il primo isolamento del CPE mediante tampone rettale e la comparsa della batteriemia, con una notevole variabilità individuale compresa tra 3 e 120 giorni. Questo risultato dimostra che la colonizzazione può precedere di settimane o mesi l'insorgenza dell'infezione invasiva, offrendo una finestra temporale potenzialmente utile per l'identificazione dei pazienti a maggior rischio e per l'attuazione di interventi preventivi mirati.

Nel loro insieme, i risultati ottenuti confermano che lo screening rettale rappresenta uno strumento fondamentale non soltanto per il controllo della trasmissione ospedaliera dei CPE, ma anche per l'individuazione precoce dei soggetti suscettibili allo sviluppo di infezioni invasive.

Il valore dello screening emerge quindi sia sul piano epidemiologico, attraverso il monitoraggio dell'evoluzione dei meccanismi di resistenza, sia sul piano clinico, quale supporto alla stratificazione del rischio infettivo e alla gestione dei pazienti più fragili.

Alla luce dei risultati ottenuti, appare essenziale mantenere e rafforzare i programmi di sorveglianza attiva, integrandoli con strategie multidisciplinari di *infection prevention and control* e con programmi di uso appropriato degli antibiotici.

L'evoluzione osservata verso una crescente diffusione dei ceppi NDM-produttori e l'emergere di microrganismi portatori di molteplici determinanti di resistenza rendono infatti necessario un continuo aggiornamento delle politiche di controllo e delle strategie terapeutiche.

In conclusione, questo studio dimostra che la colonizzazione intestinale da CPE costituisce un evento epidemiologicamente rilevante e clinicamente significativo, strettamente associato allo sviluppo di batteriemia.

Il tampone rettale si conferma uno strumento indispensabile per la sorveglianza microbiologica e per l'identificazione precoce dei pazienti a rischio, contribuendo in maniera determinante alla prevenzione, al controllo e alla gestione delle infezioni sostenute da microrganismi MDR in ambito ospedaliero.

6 BIBLIOGRAFIA

- **Adeolu M., et al.** – "Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov.", International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016; 66(12):5575-5599.
- **Ambretti S., et al.** – "Screening for carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in settings of high endemicity: a position paper from an Italian working group on CRE infections", Antimicrobial Resistance & Infection Control, 2019; 8:136.
- **Armbruster C.E., Mobley H.L.T.** – "Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of Proteus mirabilis", Nature Reviews Microbiology, 2012; 10(11):743-754.
- **Bassetti M., et al.** – "How to manage KPC infections", Therapeutic Advances in Infectious Disease, 2020; 7:2049936120912049.
- **Blair J.M.A.,** et al. – "Molecular mechanisms of antibiotic resistance", Nature Reviews Microbiology, 2015; 13(1):42-51.
- **Budia-Silva M.,** et al. – "International and regional spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Europe", Nature Communications, 2024; 15(1):5092.
- **Bush K., Bradford P.A.** – "Epidemiology of β-Lactamase-Producing Pathogens", Clinical Microbiology Reviews, 2020; 33(2):e00047-19.
- **Bush K., Bradford P.A.** – "Interplay between β-lactamases and new β-lactamase inhibitors", Nature Reviews Microbiology, 2019; 17(5):295–306.
- **Bush K., Jacoby G.A**. – "Updated Functional Classification of β-Lactamases", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010; 54(3):969-976.
- **Campos-Madueno E.I., et al.** – "Intestinal colonization with multidrug-resistant Enterobacterales: screening, epidemiology, clinical impact, and strategies to decolonize carriers", European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2023; 42(3):229-254.
- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** – "Antimicrobial Resistance Threats in the United States, 2021–2022", Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, 2024.

- **Centers for Disease Control and Prevention (CDC)** – "Carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) Infection Control", Centers for Disease Control and Prevention, 2025.
- **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** – "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing", 19th Informational Supplement, CLSI Document M100-S19, Wayne, Pennsylvania, 2009; 29(3).
- **Dehò G., Galli E**. – "Biologia dei Microrganismi", 3ª edizione, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 2019; pp. 312–337.
- **Di Franco S., et al.** – "Blood Stream Infections from MDR Bacteria", Life, 2021; 11(6):575.
- **Ding L., et al.** – "Comparison of Four Carbapenemase Detection Methods for blaKPC-2 Variants", Microbiology Spectrum, 2021; 9(3):e00954-21.
- **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)** – "Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer", ECDC Technical Report, Stockholm, 2011.
- **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)** – "Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, second update – 26 September 2019", Rapid Risk Assessment, ECDC, Stockholm, 2019.
- **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)** – "Carbapenem-resistant Enterobacterales – third update", Rapid Risk Assessment, ECDC, Stockholm, 2025.
- **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)** – "Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters".
- **GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators** – "Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990–2021: a systematic analysis with forecasts to 2050", The Lancet, 2024; 404(10459):1199-1226.
- **Iacchini S., et al**. – "AR-ISS: sorveglianza nazionale dell'Antibiotico-Resistenza. Dati 2024", Rapporti ISS Sorveglianza, 2025a; RIS-5/2025.
- **Iacchini S., et al**. – "CRE: sorveglianza nazionale delle batteriemie da enterobatteri resistenti ai carbapenemi. Dati 2024", Rapporti ISS Sorveglianza, 2025b; RIS-4/2025.
- **Jacoby G.A.** – "AmpC β-Lactamases", *Clinical Microbiology Reviews*, 2009; 22(1):161–182.
- **Kaper J.B., et al.** – "Pathogenic Escherichia coli", Nature Reviews Microbiology, 2004; 2(2):123-140.

- **Katzung B.G.** – "Basic & Clinical Pharmacology", 11th edition, McGraw-Hill, New York, 2009.
- **Keith J.W., Pamer E.G.** – "Enlisting Commensal Microbes to Resist Antibiotic-Resistant Pathogens", Journal of Experimental Medicine, 2019; 216(1):10-19.
- **Kim S., et al.** – "The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens", Immunological Reviews, 2017; 279(1):90-105.
- **Lee C.R., et al.** – "Global Dissemination of Carbapenemase-Producing Klebsiella pneumoniae: Epidemiology, Genetic Context, and Treatment Options", Frontiers in Microbiology, 2016; 7:895.
- **Madigan M.T., et al**. – "Brock Biology of Microorganisms", 9th edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2000; 991 pp.
- **Madigan M.T., et al**. – "Brock Biology of Microorganisms", 11th edition, Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2006.
- **Madigan M.T., et al.** – "Brock Biology of Microorganisms", 15th edition, Pearson, New York, 2018.
- **Magiorakos A.P., et al.** – "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance", Clinical Microbiology and Infection, 2012; 18(3):268-281.
- **Ministero della Salute** – "Sorveglianza e controllo delle infezioni da Enterobacteriaceae produttrici di carbapenemasi (CPE)", Ministero della Salute, Roma, 2013.
- **Ministero della Salute** – "Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022–2025", Ministero della Salute, Roma, 2023.
- **Moreira de Gouveia M.I., et al.** – "Enterobacteriaceae in the Human Gut: Dynamics and Ecological Roles in Health and Disease", Biology, 2024; 13(3):142.
- **Munita J.M., Arias C.A.** – "Mechanisms of Antibiotic Resistance", Microbiology Spectrum, 2016; 4(2):VMBF-0016-2015.
- **O'Neill J.**–"Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations", Review on Antimicrobial Resistance, 2016; 80 pp.
- **Paczosa M.K., Mecsas J.** – "Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense", Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2016; 80(3):629-661.

- **Parlamento europeo e Consiglio dell'Unione europea** – "Regolamento (UE) 2019/6 dell'11 dicembre 2018 relativo ai medicinali veterinari e che abroga la direttiva 2001/82/CE", Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 2019; L 4:43-167.
- **Partridge S.R., et al.** – "Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance", Clinical Microbiology Reviews, 2018; 31(4):e00088-17.
- **Queenan A.M., Bush K.** – "Carbapenemases: The Versatile β-Lactamases", Clinical Microbiology Reviews, 2007; 20(3):440-458.
- **Raetz C.R.H., Whitfield C.** – "Lipopolysaccharide Endotoxins", Annual Review of Biochemistry, 2002; 71:635-700.
- **Roson-Calero N., et al.** – "Insights into Current Strategies to Decolonize Gut Multidrug-Resistant Bacteria: Pros and Cons", Antibiotics, 2023; 12:1074.
- **Sarowska J., et al.** – "Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic Escherichia coli isolated from different sources: recent reports", Gut Pathogens, 2019; 11:10.
- **Sauvage E., et al.** – "The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis", FEMS Microbiology Reviews, 2008; 32(2):234-258.
- **Sawa T.**, **Kooguchi K., Moriyama K.** – "Molecular diversity of extended-spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance", Journal of Intensive Care,2020;8:13. DOI: 10.1186/s40560-020-0429-6
- **Singer M. et al.** – "The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)", JAMA, 2016;315(8):801–810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287
- **Suay-García B., Pérez-Gracia M.T.** – "Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae(CRE)Infections", Antibiotics,2019;8(3):122.DOI:10.3390/ antibiotics8030122
- **Temkin E., et al.** – "Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: biology, epidemiology, and management", Annals of the New York Academy of Sciences, 2014; 1323(1):22-42.
- **Tan X. et., al** – "Therapeutic Options for Metallo-β-Lactamase-Producing Enterobacterales", Infection and Drug Resistance, 2021; 14:125–142.

- **Tooke C.L., et al.** – "β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century", Journal of Molecular Biology, 2019; 431(18):3472-3500.
- **World Health Organization (WHO)** – "Guidelines for the prevention and control of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa in health care facilities", World Health Organization, Geneva, 2017; 74 pp.
- **World Health Organization (WHO)** – "Antimicrobial stewardship programmes in health-care facilities in low- and middle-income countries: a WHO practical toolkit", World Health Organization, Geneva, 2019; 71 pp.
- **World Health Organization (WHO)** – "World leaders and experts call for action to protect the environment from antimicrobial pollution", World Health Organization, 2022.
- **Wu W., et al.** – "NDM Metallo-β-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings", Clinical Microbiology Reviews, 2019; 32(2):e00115-18.
- **Werner G., et al.** – "Re: How to: ECOFFs—the why, the how and the don'ts of EUCAST epidemiological cutoff values", *Clinical Microbiology and Infection*, 2022; 28(7):1028–1029.
- **Zasler N.D., et al.** – "Brain Injury Medicine: Principles and Practice", 3rd edition, Springer Publishing Company, 2021.
- **Zingg W., et al.** – "Hospital organisation, management, and structure for prevention of health-care-associated infection: a systematic review and expert consensus", The Lancet Infectious Diseases, 2015; 15(2):212-224.