



# Diagnosi di laboratorio: screening, fenotipizzazione e genotipizzazione

**Le carbapenemasi: aspetti clinici, diagnostici e misure  
di prevenzione**

**26 febbraio 2014**

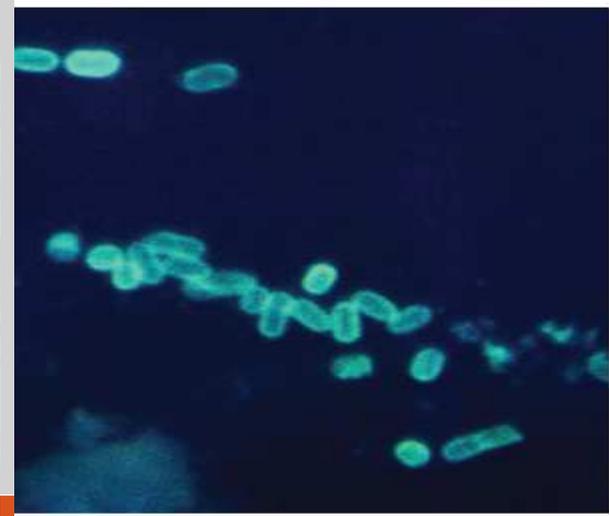
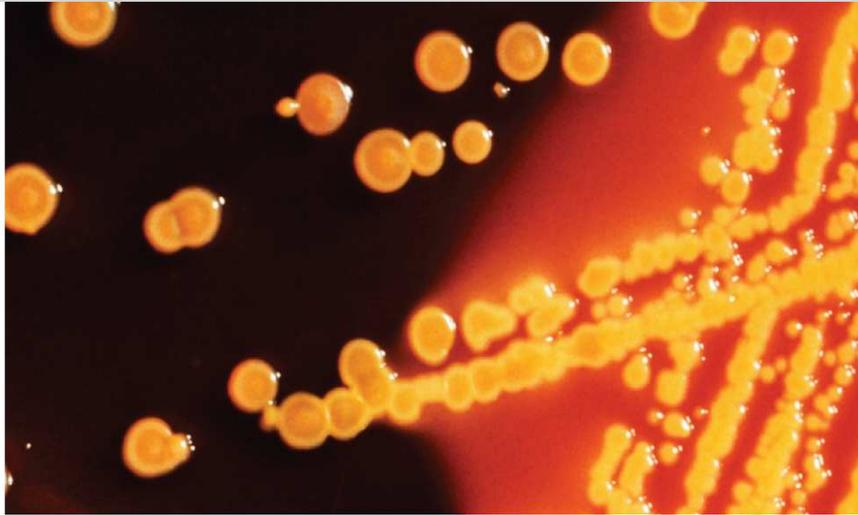
**Auditorium Ospedale S. Chiara  
Trento**

**M. Gaino**

**U.O. Microbiologia e Virologia  
Osp. S. Chiara Trento**



*Azienda Provinciale  
per i Servizi Sanitari  
Provincia Autonoma di Trento*



# Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)

National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases  
Division of Healthcare Quality Promotion



Appendix A: Previous and Current Clinical and Laboratory Standards  
Institute Interpretive Criteria for Carbapenems and Enterobacteriaceae

Agent	Previous Breakpoints (M100-S19) MIC (µg/mL)			Current Breakpoints (M100-S22) MIC (µg/mL)		
	Susceptible	Intermediate	Resistant	Susceptible	Intermediate	Resistant
Doripenem	-	-	-	≤1	2	≥4
Ertapenem	≤2	4	≥8	≤0.5	1	≥2
Imipenem	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4
Meropenem	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement (January 2012). CLSI document M100-S22. Wayne, Pennsylvania, 2012.



**Indicazioni pratiche e protocolli operativi per la diagnosi, la sorveglianza e il controllo degli enterobatteri produttori di carbapenemasi nelle strutture sanitarie e socio-sanitarie**

**Gennaio 2013**

# Algoritmo per l'identificazione fenotipica e la refertazione degli enterobatteri produttori di carbapenemasi

## **Il ruolo del laboratorio di Microbiologia**



SELEZIONE DEI CEPPI DA TESTARE



CONFERMA FENOTIPICA/genotipica



REFERTAIONE

# Identificazione delle carbapenemasi in microrganismi isolati da campioni clinici

**SORVEGLIANZA** di laboratorio

**PASSIVA**



MONITORAGGIO

**ATTIVA**



SCREENING

# SORVEGLIANZA PASSIVA



*Ministero della Salute*

DIPARTIMENTO DELLA SANITÀ PUBBLICA E DELL'INNOVAZIONE  
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE  
Ufficio 05 Ex DGPREV  
Viale Giorgio Ribotta, 5 - 00144 Roma

**Oggetto:** Circolare “Sorveglianza, e controllo delle infezioni da batteri produttori di carbapenemasi (CPE)”

Sistema di Sorveglianza Nazionale delle batteriemie da *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produttori di carbapenemasi

**Ministero della Salute  
DGPRE**

**0004968-P-26/02/2013**

# SORVEGLIANZA ATTIVA



Maggio 2012

**Indicazioni per lo *screening* colturale dei pazienti colonizzati da Enterobatteri produttori di carbapenemasi**

**Comitato di Studio AMCLI per gli Antimicrobici (CoSA)**

## Test di screening per la rilevazione dei soggetti colonizzati

- Tampone rettale (o coprocoltura/tampone faringeo)



- A) Semina diretta su terreni cromogeni
- B) Semina diretta su McConkey con dischetto di meropenem
- C) Arricchimento in terreno liquido addizionato di carbapenemico e semina su McConkey

# Test di **screening** per la rilevazione dei soggetti colonizzati

## 1) Semina diretta su terreni cromogeni

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

### *Vantaggi:*

- lettura risultati dopo 18-24 ore
- facile riconoscimento delle colonie sospette
- identificazione presuntiva di specie

### *Limiti:*

- costi, sensibilità e specificità da valutarsi in relazione al terreno utilizzato



## Test di **screening** per la rilevazione dei soggetti colonizzati

### 2) Semina diretta su McConkey con dischetto di meropenem

- Posizionare un dischetto di meropenem 10 $\mu$ g nell'area di semina più densa. Considerare sospette le colonie con morfologia tipica per Enterobacteriaceae cresciute all'interno di un'area dell'alone di inibizione corrispondente a  **$\leq 25$  mm**
- *Vantaggi:*
  - lettura risultati dopo 24-48h
  - facile riconoscimento delle colonie sospette
  - costi irrisori
- *Limiti:* pazienti colonizzati in carica molto bassa potrebbero risultare falsamente negativi

## Test di **screening** per la rilevazione dei soggetti colonizzati

### 3) Arricchimento in terreno liquido addizionato di carbapenemico e semina su McConkey

È la metodica consigliata dai CDC e prevede la semina del tampone rettale in 5 ml di *Tryptic Soy Broth* contenente un dischetto di ertapenem o meropenem 10 µg (concentrazione finale 2 µg/ml), seguita da incubazione a 35°C in aria ambiente per 18 ore, quindi una sottocoltura su agar McConkey (incubato anch'esso a 35°C in aria ambiente per 24-48 ore)

#### *Vantaggi:*

- facile riconoscimento delle colonie sospette
- costi irrisori

#### *Limiti:*

- lettura dei risultati dopo 48-72 ore
- impegno operativo lievemente maggiore rispetto a quello richiesto con i metodi precedenti
- l'eventuale sviluppo prevalente nel brodo di arricchimento di altri generi di bacilli Gram - resistenti ai carbapenemi (*Acinetobacter*, *Pseudomonas*...) potrebbe comportare risultati falsamente negativi

## Test di screening-caratterizzazione degli isolati sospetti

Le colonie evidenziate come “sospette” utilizzando una delle tre metodiche descritte dovranno essere caratterizzate con:

- **Identificazione**
- **Antibiogramma**
- **ev. Test fenotipici e/o genotipici**

## Identificazione delle carbapenemasi in microrganismi isolati da campioni clinici

- Sia **CLSI** che **EUCAST** raccomandano di effettuare test fenotipici per la conferma della produzione di carbapenemasi solo per **scopi epidemiologici o di controllo delle infezioni**
- In molte aree la rilevazione e la caratterizzazione delle carbapenemasi è raccomandata o obbligatoria allo scopo di un controllo delle infezioni

## Identificazione delle carbapenemasi in microrganismi isolati da campioni clinici

- I laboratori di Microbiologia clinica devono acquisire dimestichezza nel corretto riconoscimento di tali ceppi sia per il loro elevato **impatto clinico** sia al fine di implementare adeguate misure di **infection control**
- La **conferma fenotipica** della produzione di carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae rappresenta uno dei maggiori problemi interpretativi dell'antibiogramma
- Ad oggi non esiste un unico test fenotipico risolutivo per tutti i casi possibili
- L'utilizzo combinato di più test permette di riconoscere questo meccanismo di resistenza con buona sensibilità e specificità



**EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance**

**Version 1.0  
December 2013**



**Marzo 2012**

## **Indicazioni per la conferma fenotipica della produzione di carbapenemasi nelle Enterobacteriaceae**

**Comitato di Studio AMCLI per gli Antimicrobici (CoSA)**

## Identificazione delle carbapenemasi in microrganismi isolati da campioni clinici

- Selezione dei ceppi →  
quando sospettare la produzione di carbapenemasi?
- In linea teorica, in tutti gli isolati di Enterobacteriaceae con MIC per carbapenemi superiori ai rispettivi cut-off epidemiologici (ECOFF) dei rispettivi ceppi Wild Type
- Tuttavia, i sistemi utilizzati nella pratica di laboratorio non consentono in genere di misurare valori di MIC dei carbapenemi nel range degli ECOFF



# EUCAST

EUROPEAN COMMITTEE  
ON ANTIMICROBIAL  
SUSCEPTIBILITY TESTING

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

Table 1. Clinical breakpoints and screening cut-off values for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (according to EUCAST methodology).

Carbapenem	MIC (mg/L)		Disk diffusion zone diameter (mm) with 10 µg disks	
	S/I breakpoint	Screening cut-off	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem <sup>1</sup>	≤2	>0.12	≥22	<25 <sup>2</sup>
Imipenem <sup>3</sup>	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem <sup>4</sup>	≤0.5	>0.12	≥25	<25

<sup>1</sup>Best balance of sensitivity and specificity

<sup>2</sup>In some cases zone diameters for OXA-48-producers are up to 26 mm, so <27 mm may be used as a screening cut-off in countries where OXA-48 is endemic, but at the expense of lower specificity.

## Identificazione delle carbapenemasi in Enterobatteri isolati da campioni clinici

→ è consigliabile quindi

**sospettare la produzione di carbapenemasi in presenza di una ridotta sensibilità al meropenem:**

**MIC  $\geq$  0.25 mg/l o diametro di inibizione  $\leq$  25 mm.**

→ qualora il sistema utilizzato nella routine diagnostica test il meropenem a concentrazioni maggiori, dovranno essere sottoposti a conferma fenotipica i ceppi che presentino una MIC superiore alla più bassa concentrazione testata

## Identificazione delle carbapenemasi in Enterobatteri isolati da campioni clinici

- **MEROPENEM** → indicatore preferibile in quanto dotato di maggiore specificità vs. imipenem ed ertapenem soprattutto in *E. coli* e *K. pneumoniae*
- Se meropenem non saggiato, può essere considerato indicativo lo stesso valore di MIC per **imipenem**  
(tranne che per *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp.: queste specie hanno MIC elevate per imipenem)
- L'utilizzo di **ertapenem** aumenta la sensibilità ma riduce la specificità (→ eccessivo ricorso ai test di conferma)

# Test di conferma fenotipica

- **Test di sinergia**

mediante metodica “di combinazione” su dischetto o striscia

- test raccomandato
- il ceppo viene testato nei confronti del carbapenemico in presenza di specifici **inibitori** delle carbapenemasi

- **Test di Hodge** (MHT- **modified Hodge test**): di seconda scelta, si basa sulla riduzione di attività del carbapenemico saggiato nei confronti di un ceppo indicatore sensibile, mediata dalla carbapenemasi prodotta dal microorganismo in esame

# Test di conferma fenotipica

- **TEST DI SINERGIA O “DI COMBINAZIONE”  
SU DISCHETTO**

Posizionare i dischetti su piastra di Mueller-Hinton agar seminata con il ceppo da testare (sospensione 0.5 McFarland)

- Meropenem 10 $\mu$ g
  - Meropenem 10 $\mu$ g + acido boronico
  - Meropenem 10 $\mu$ g + acido dipicolinico
  
  - Meropenem 10 $\mu$ g + EDTA
  - Cloxacillina
  - Temocillina
- Incubare in aria amb. a 35 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C  
per 18-24h

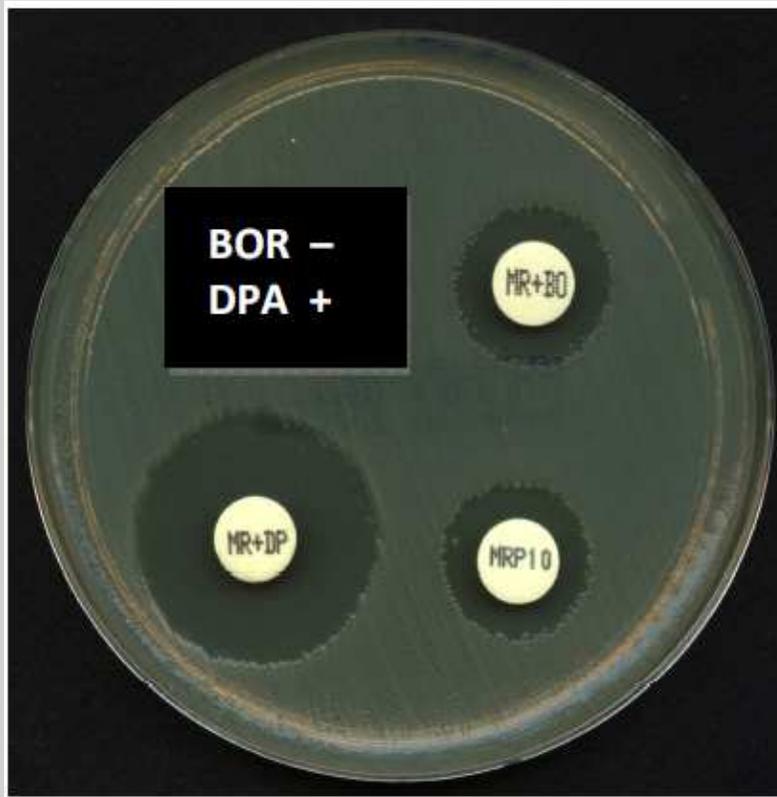
# Test di combinazione su dischetto - interpretazione -

**Misurare l'alone di inibizione del carbapenemico vs.  
alone di inibizione carbapenemico +inibitore**

**Viene considerato significativo un aumento dell'alone di  
inibizione  $\geq 5$  mm**

- La sinergia con acido **boronico** (BOR) è indicativa della produzione di **KPC**
- La sinergia con acido **dipicolinico** (DPA) e/o EDTA è indicativa della produzione di **MBL**

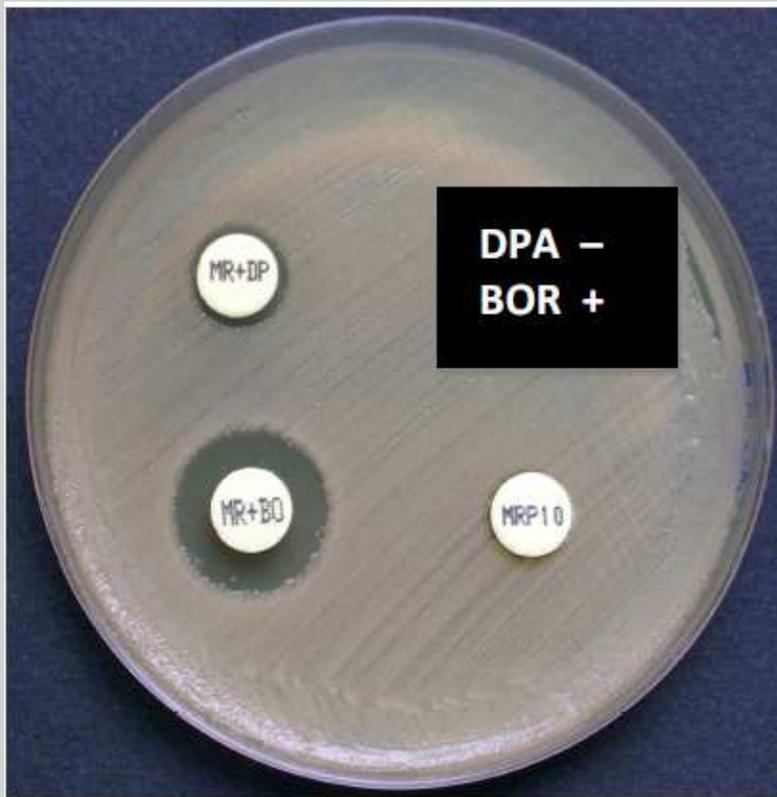
## Test di conferma fenotipica



- Sinergia con acido dipicolinico (DPA)

indicativa della produzione di **MBL**

## Test di conferma fenotipica

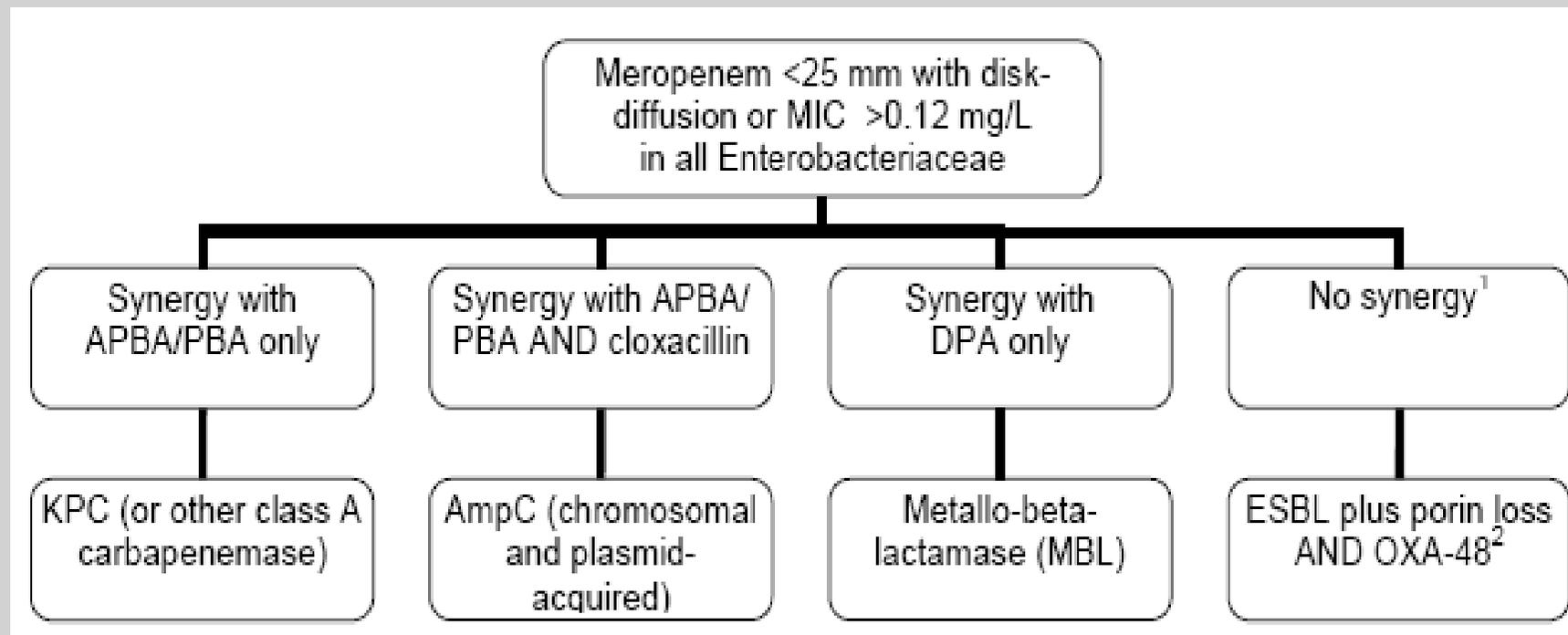


- Sinergia con acido boronico (BOR)

indicativa della produzione di **KPC**

- Ceppi iperproduttori di AmpC e con ridotta permeabilità possono essere determinati con il sinergismo con Cloxacillina (es. *Enterobacter* spp.)
- In assenza di sinergia, la resistenza a Temocillina può individuare la presenza di OXA-48; non esistono infatti a tutt'oggi inibitori di queste carbapenemasi

# Algoritmo per l'identificazione fenotipica delle carbapenemasi



Algorithm for carbapenemase detection.

## Interpretazione dei test fenotipici

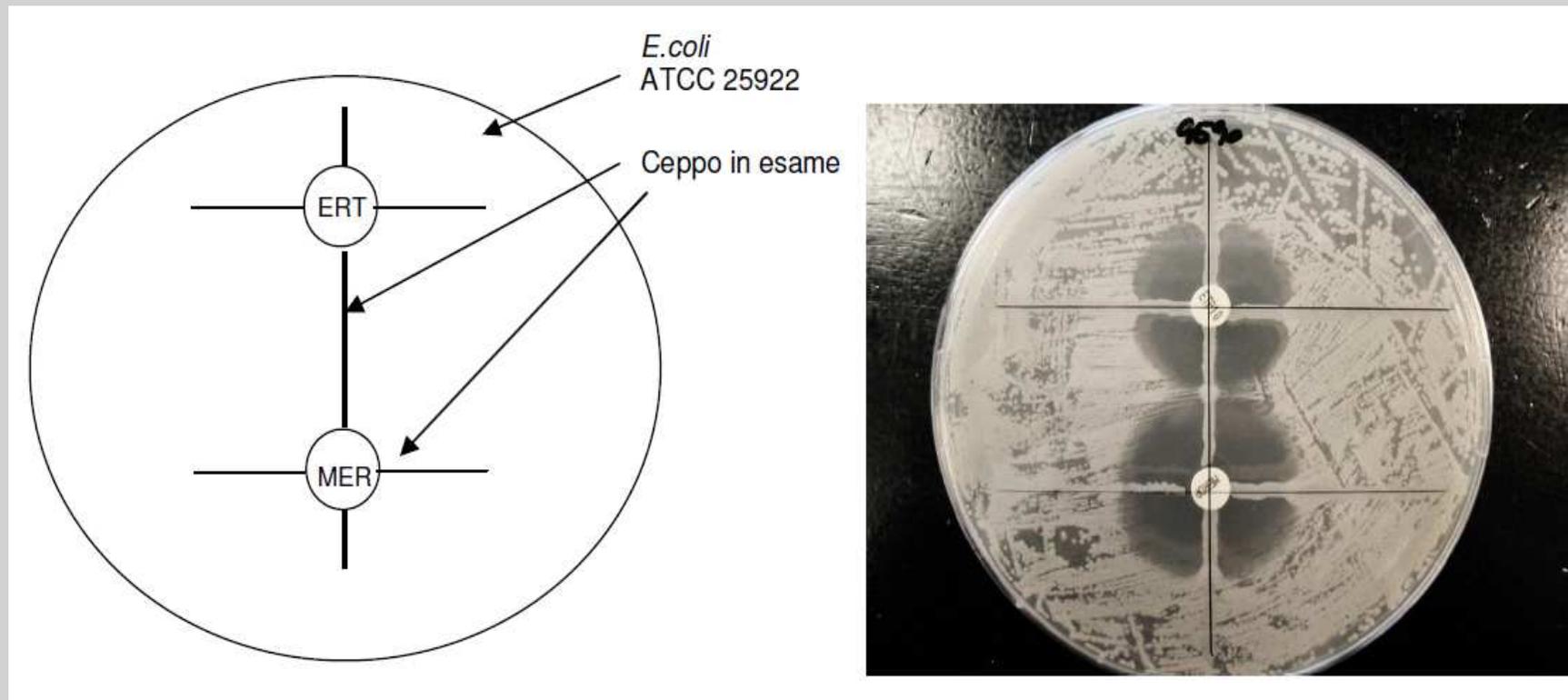
$\beta$ -lactamase	Synergy observed as increase in zone diameter (mm) with 10 $\mu$ g meropenem disk/tablet				Temocillin MIC >32 mg/L or zone diameter <11 mm
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	CLX	
<b>MBL</b>	+	-	-	-	Variable <sup>1</sup>
<b>KPC</b>	-	+	-	-	Variable <sup>1</sup>
<b>MBL + KPC<sup>2</sup></b>	Variable	Variable	+	-	Variable <sup>1</sup>
<b>OXA-48-like</b>	-	-	-	-	Yes
AmpC + porin loss	-	+	-	+	Variable <sup>1</sup>
ESBL + porin loss	-	-	-	-	No

# Tabella per l'interpretazione delle carbapenemasi

		Meropenem + Phenylboronic MRPBO	Meropenem + DPA MRPDP	Meropenem + Cloxacillin MRPCX	Temocilin 30 µg
AmpC + porin loss	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4mm and	≤ 3 mm	≥ 5mm	≥ 12mm
ESBL + porin loss (a)	Meropenem 10 µg MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12mm
KPC	Meropenem 10 µg MRP10	≥ 4mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Variable
	Meropenem + Cloxacillin (MRPCX)	≥ 4mm	-	-	-
MβL	Meropenem 10 µg MRP10	< 4mm	≥ 5mm	≤ 3 mm	Variable
OXA-48 and similars	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	No zone of inhibition
OXA-48 + ESBL (a)	Meropenem 10 ug MRP10	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	No zone of inhibition

(a) : synergism CAZ / Clavulanate.

# Test di Hodge



Seminare su MH agar una sospensione 0,5 McFarland di ceppo ATCC E.coli 25922; posizionare i dischetti e inoculare il ceppo da testare con una linea retta a partenza dal dischetto; incubare in aria a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  per 18 h.

# Test di Hodge

- a. Non permette la distinzione fra le diverse classi di carbapenemasi ma evidenzia solo la presenza di attività carbapenemasi
- b. Difficilmente standardizzabile, necessita di esperienza nell'interpretazione dei risultati
- c. Possibili false negatività in caso di ridotta espressione di carbapenemasi
- d. False positività in ceppi iperproduttori di AmpC o ESBL + difetto di porine
- a. Di utilità quando test di sinergia negativi (es. produzione di OXA-48)

# Test di combinazione su striscia a gradiente di diffusione

- **Imipenem + EDTA** (Gram neg. non Enterobact.)
- **Meropenem + EDTA** (Gram neg. Enterobacteriaceae)



Interpretazione:

Ceppo produttore di **MBL**:

- rapporto tra MIC merop e MIC merop+EDTA  $\geq 8$
- MIC merop e MIC merop+EDTA  $\geq 3$  concentraz.
- presenza di “zona fantasma”
- deformazione dell’ellisse

# Controlli di qualità

- *K. pneumoniae* ATCC BAA – 1705 (KPC+ Test di Hodge+)
- *K. pneumoniae* ATCC BAA – 2146 (MBL/NDM+)
- *K. pneumoniae* ATCC BAA – 1705 (Test di Hodge -)



## Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

Importance of detection of resistance mechanism	
Required for antimicrobial susceptibility categorization	No
Infection control	Yes
Public health	Yes

# Refertazione

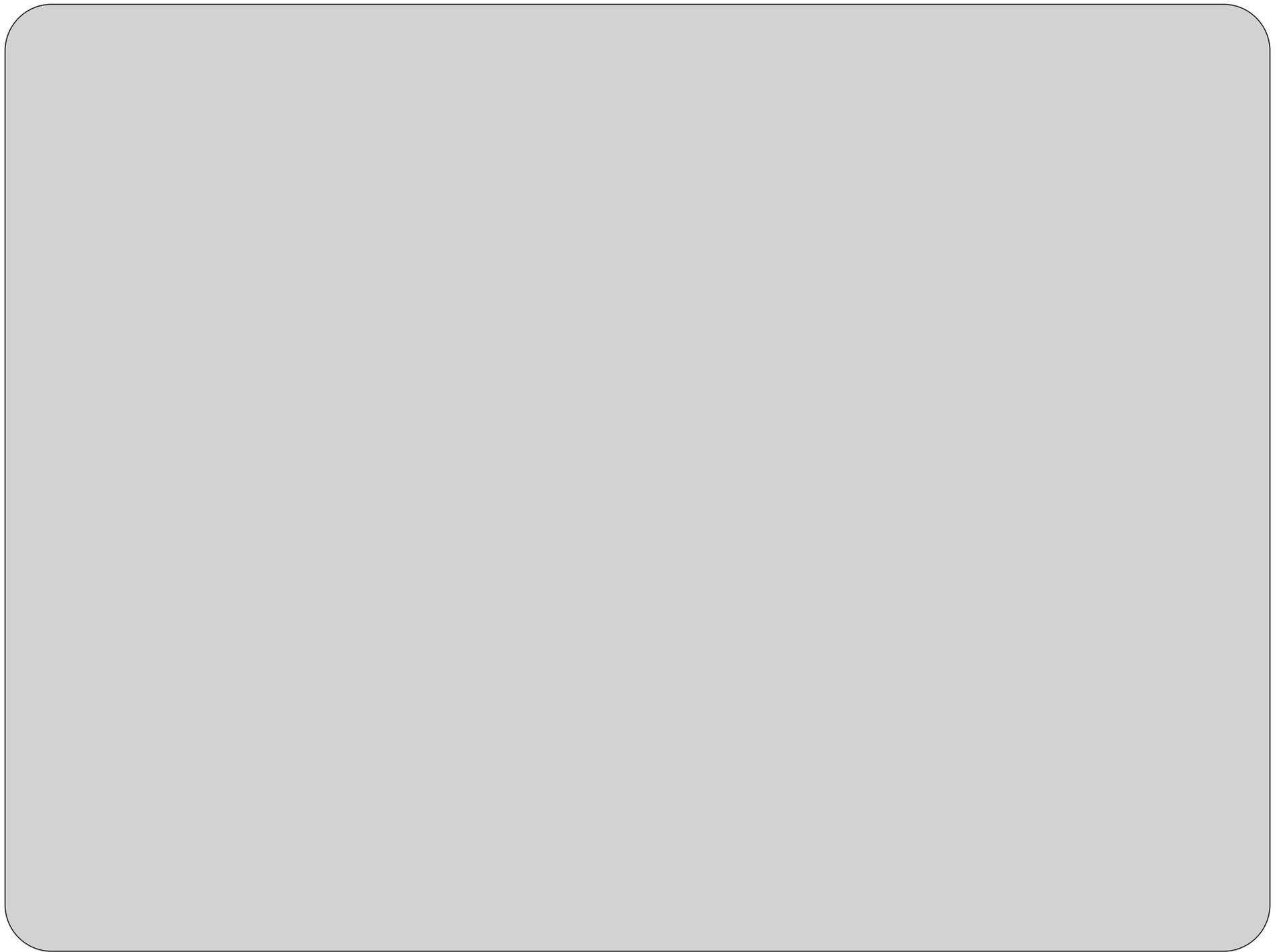
➔ **Antibiogramma:** riportare nel referto le MIC così come rilevate

➔ Inserire un **commento** al risultato

produzione carbapenemasi      *POSITIVA*

*ATTENZIONE: Ceppo produttore di carbapenemasi soggetto a sorveglianza epidemiologica ospedaliera. La terapia con beta-lattamici, compresi i carbapenemi, potrebbe risultare scarsamente efficace o inefficace anche se sensibili in vitro. Si consiglia eventuale consulenza infettivologica*

**GRAZIE PER L'ATTENZIONE**



ndm

oxa-48

kpc



mbi

vim

imp