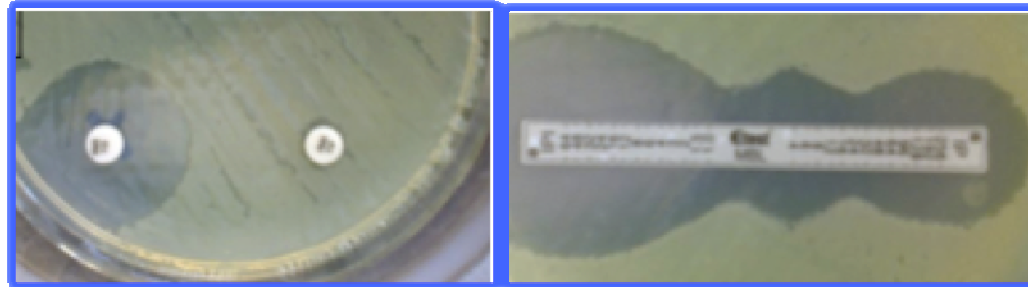
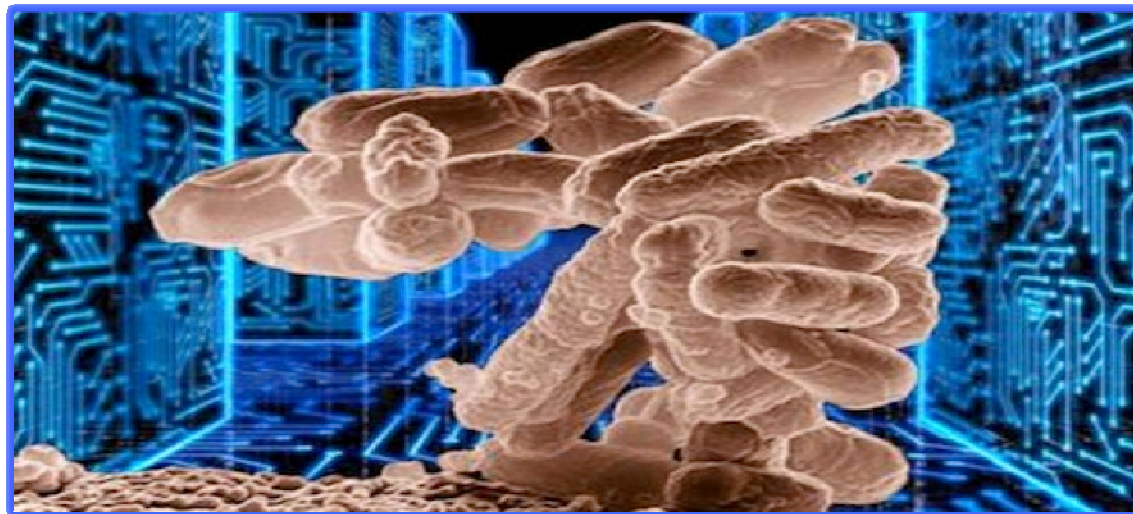


## **Le carbapenemasi: aspetti clinici, diagnostici e misure di prevenzione**

26 febbraio 2014, Auditorium Ospedale S. Chiara Trento



**Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione  
dott.ssa Lucia Collini (Trento)**



# Quando la genotipizzazione

## Protocolli microbiologici

-identificazione delle carbapenemasi in microrganismi isolati da campioni microbiologici clinici

-test di screening per individuare i soggetti colonizzati

## Segnalazione dei singoli casi e degli eventi epidemici

Indicazioni per la prevenzione e il controllo della trasmissione di enterobatteri produttori di carbapenemasi nelle strutture sanitarie e socio sanitarie

Circolare Ministero Salute 26 Febbraio 2013

**Segnalazione delle Batteriemie sostenute da CPE**

  
**Ministero della Salute**  
DIPARTIMENTO DELLA SANITÀ PUBBLICA E DELL'INNOVAZIONE  
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE  
Ufficio 05 ES DCPREV  
Viale Giorgio Ribotta, 5 - 00144 Roma

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

A. Nome _____ Cognome _____	
Sexo <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> M	Data di nascita ____/____/____
Comune di residenza: _____	
Nazionalità: _____	
Data inizio sintomi: ____/____/____	
Ospedale/Struttura _____ Azienda sanitaria _____	
Città _____	Provincia _____ Regione _____

la ASL ovvero il Dipartimento di Prevenzione della ASL competente per territorio invia **entro 7 giorni, esclusivamente questa parte B della presente scheda** alla Regione, al Ministero della salute (malin@sanita.it) e all'ISS (sorveglianza.kpi@iss.it).

**B. Segnalato/Notificato da:** \_\_\_\_\_

Telefono \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ e-mail: \_\_\_\_\_

Data compilazione \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Provincia \_\_\_\_\_ Regione \_\_\_\_\_

**DATI DEL PAZIENTE**

| Sexo  F  M | Età \_\_\_\_/\_\_\_\_ se età < 1 anno, mesi \_\_\_\_/\_\_\_\_ | Provincia di residenza: \_\_\_\_\_ |
| Nazionalità: \_\_\_\_\_ | | Data inizio sintomi: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ |

**Trasmissione dei dati al Sistema di sorveglianza nazionale entro 48 ore.**

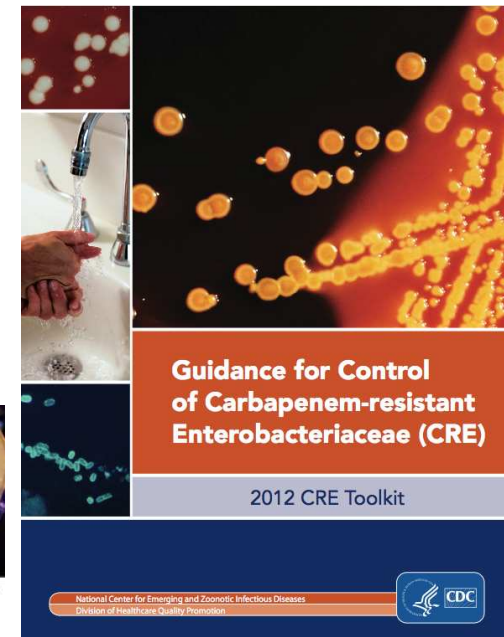


**Controllo degli enterobatteri produttori di carbapenemasi in Emilia-Romagna**

2012-2013



**CRE VITAL SIGNS REPORT**  
www.cdc.gov/vitalsigns



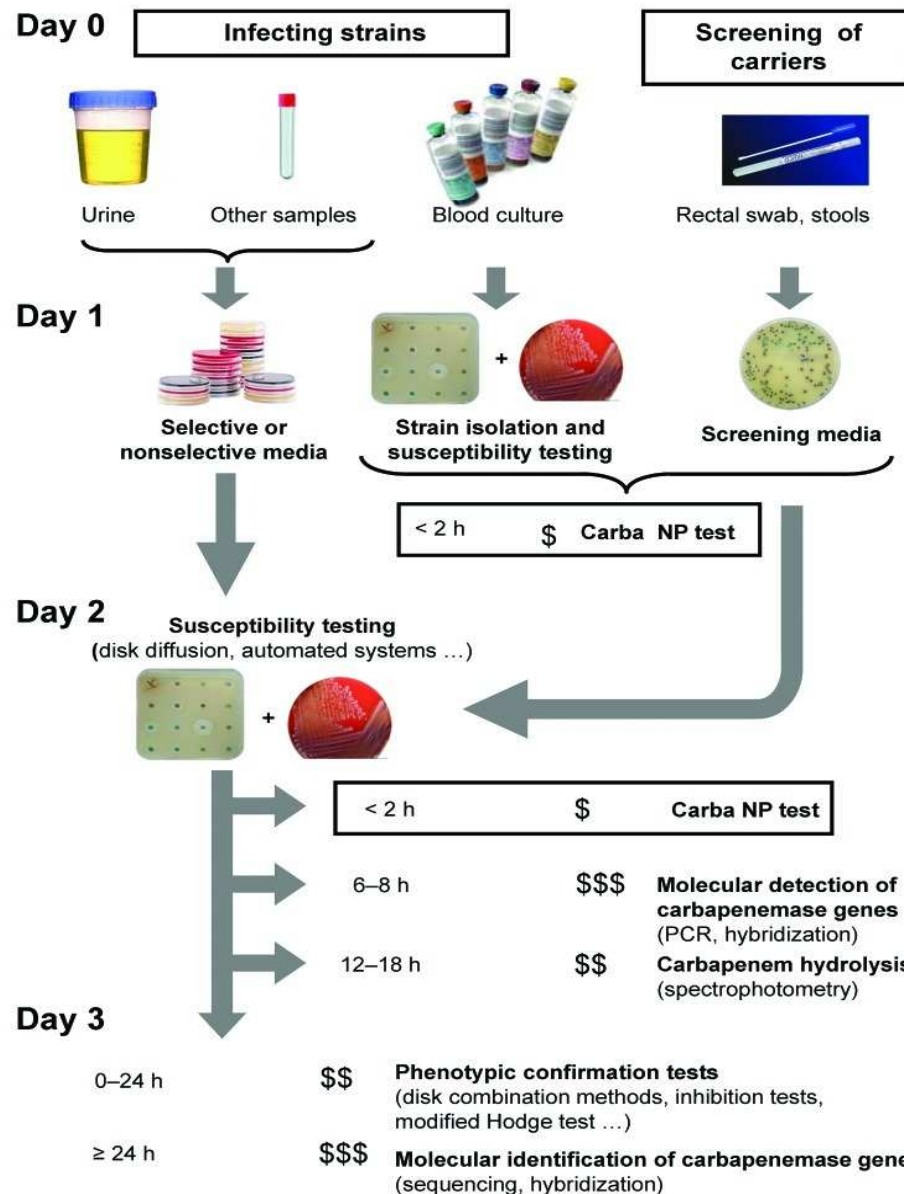
**Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)**

2012 CRE Toolkit

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



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione



in quale momento la genotipizzazione

Strategy for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. The time needed to perform the test is indicated before each test. The number of flasks indicates the degree of specialization needed to perform the test; the number of \$ indicates the relative cost of each test

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

# Perchè la genotipizzazione

soprattutto in caso di sospette condizioni epidemiche  
i test molecolari permettono l'identificazione dei determinanti di resistenza in gioco (AmpC, ESBL, KPC, VIM, IPM, NDM-1, ...)

La mancanza di inibitori specifici  
per alcune carbapenemasi (es. OXA-58)

Le difficoltà nella  
standardizzazione/interpretazione  
dei risultati dei test fenotipici

Gradient strips (e.g., E-test)	Phenotypic identification
Disk diffusion	
Double-disk diffusion	
Hodge test	
Combo disk	
Microdilution	
Agar dilution	
Carba NP test	
Automated test systems	

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

Test di screening genotipico



Linee Guida ESCMID 2012

*Since PCR-based approaches for screening of MDR-GNB are still at an early stage, culture-based methodologies for screening are the most reliable option and remain the most favourable in terms of capacity and costs.*

ESCMID PUBLICATIONS

10.1111/1469-0699.12427

**ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients**

Test di conferma genotipica



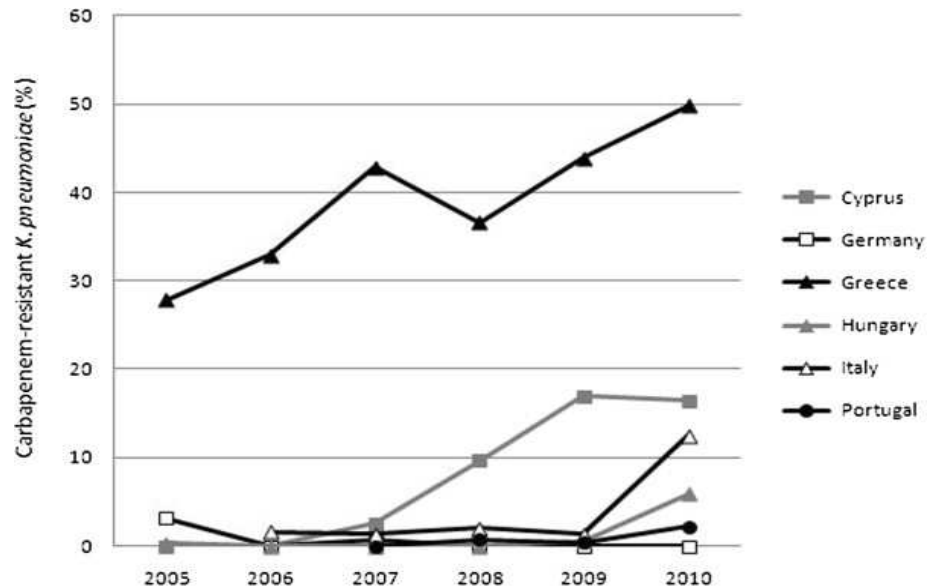
Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

Nell'epidemiologia delle resistenze causate da carbapenemasi possono essere riconosciuti tre momenti fondamentali:

l'introduzione di ceppi produttori in contesti dove non erano mai stati osservati (a),

l'espansione clonale di tali ceppi (b),

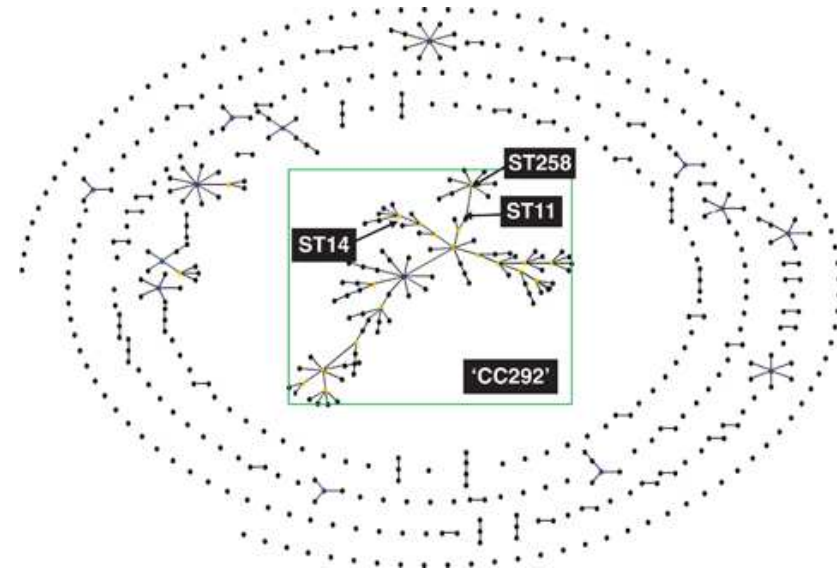
la trasmissione orizzontale dei geni che conferiscono questo tipo di resistenza (c)



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

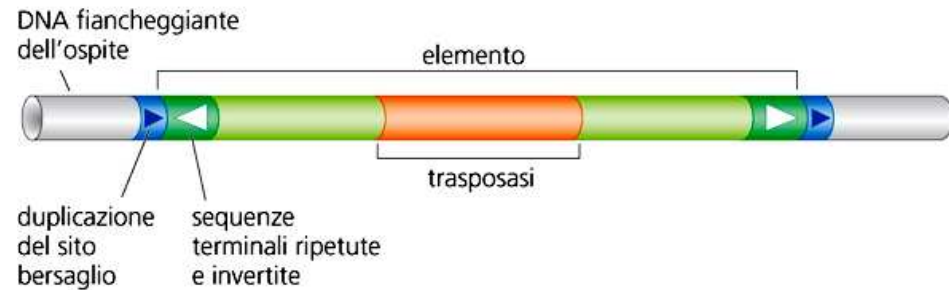
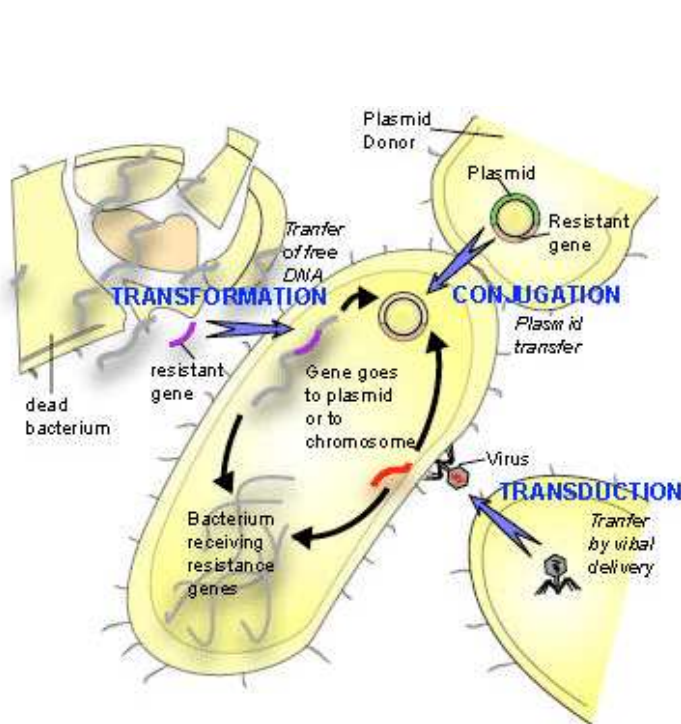
Gli eventi epidemici ospedalieri sostenuti da microrganismi KPC-produttori rappresentano espansioni clonali, in ambito locale, successive a lunghe catene di trasmissione.

È importante riconoscere, tracciando l'epidemiologia molecolare dei ceppi antibiotico-resistenti, i cosiddetti "*high-risk multidrug-resistant clones*", vale a dire quei cloni che hanno dimostrato una spiccata propensione all'espansione clonale.



FEMS Microbiology Reviews Volume 35, 2011

Il supporto di elementi genetici mobili come i plasmidi o i trasposoni può invece consentire il trasferimento intra-specie o inter-specie di tali meccanismi di resistenza.



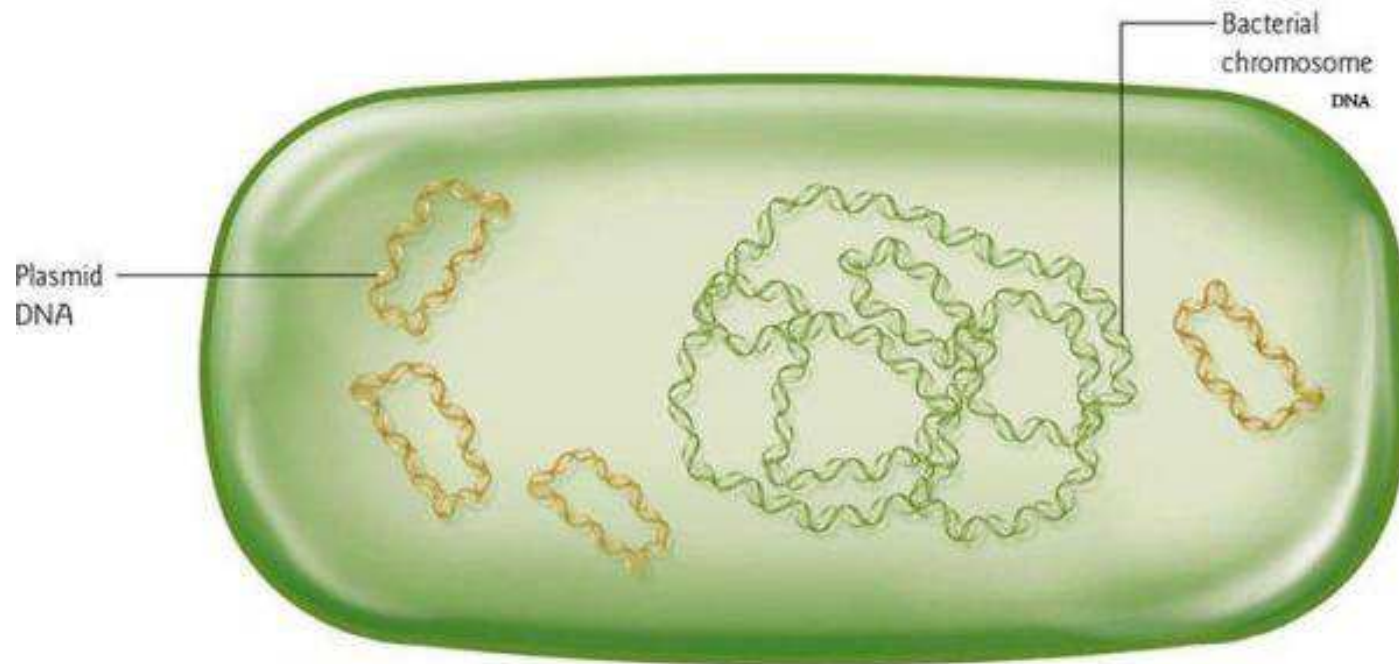
È stata ad esempio documentata la trasmissione mediata da plasmidi di geni *blaKPC* da *K.pneumoniae* a *E.coli*.

Goren MG, et al. Emerg Infect Dis 2010

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione



Le carbapenemasi possono essere codificate sia da geni (*bla*) a localizzazione cromosomiale che da geni trasferibili (attraverso plasmidi e meno frequentemente con il supporto di trasposoni-elemento genetico mobile *Tn 4401*)

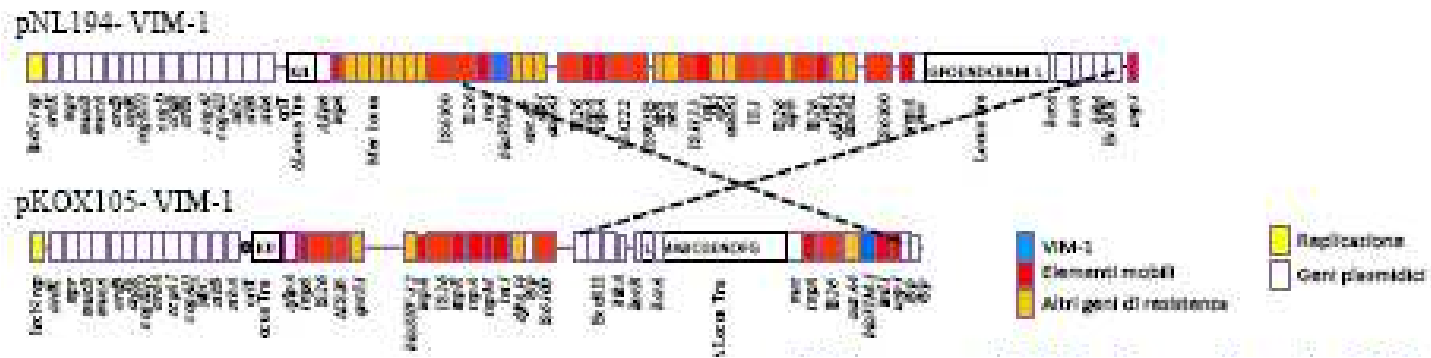


## Plasmidi

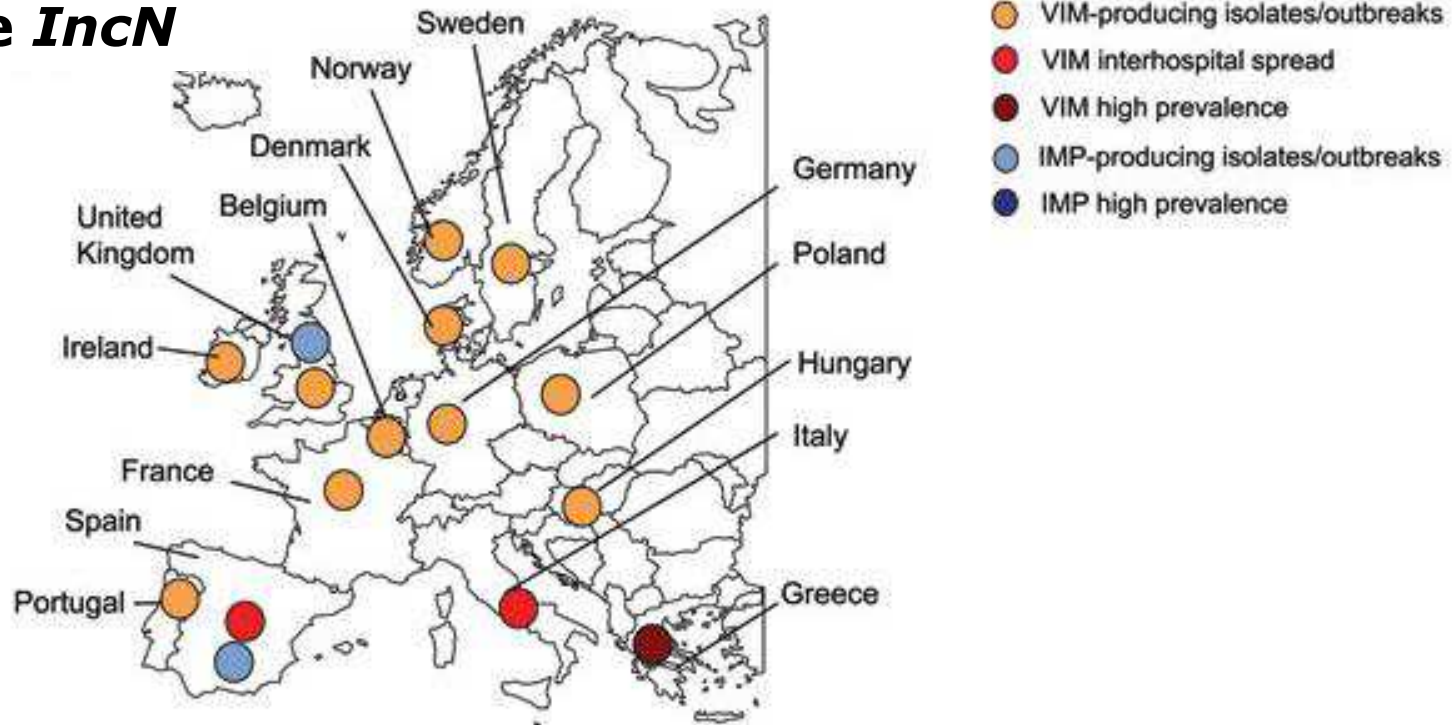
Portano geni accessori (resistenze) di cui promuovono il trasferimento orizzontale

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

# plasmide *IncN*



## VIM-1: Epidemia di un plasmide *IncN*



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

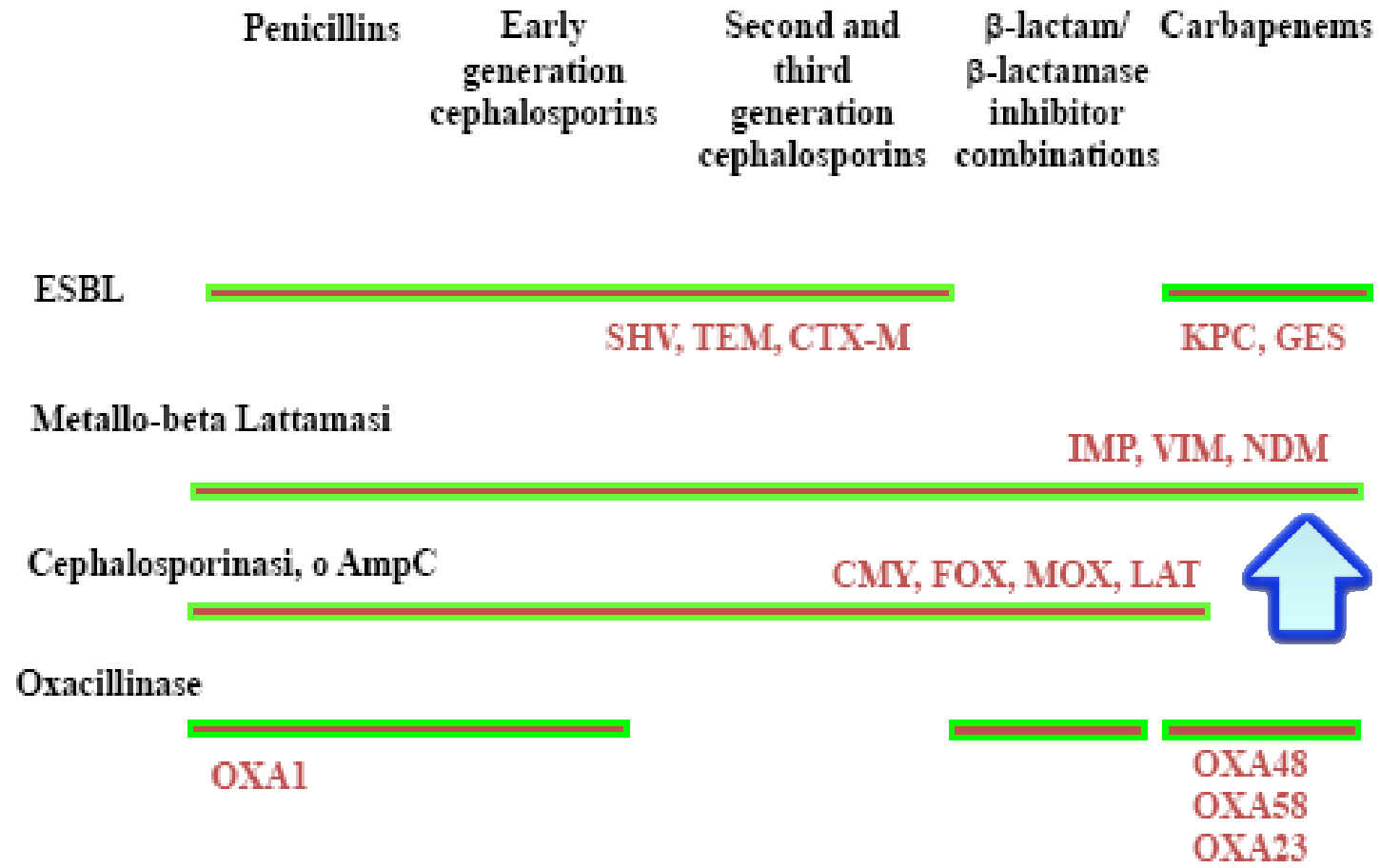
CARBAPENEMASI  classificate in classi (**A,B,C,D**)

**Carbapenemasi più importanti da un punto di vista epidemiologico**

Classe B, metallo beta-lattamasi	Classe A	Classe D
<b>IMP</b> (imipenemasi)	<b>KPC</b> ( <i>K. pneumoniae</i> carbapenemasi) è l'enzima più importante sia da un punto di vista clinico che epidemiologico	Carbapenemasi tipo <b>OXA</b>
<b>VIM</b> ( <i>Verona integron-encoded metallo-beta-lattamasi</i> )	<b>SME</b> ( <i>Serratia marcescens</i> enzyme)	
<b>NDM-1</b> (New Delhi metallo-beta-lattamasi)	<b>NMC-A/IMI</b> ( <i>not metallo enzyme carbapenemase /imipenem-hydrolysing beta-lactamase</i> )	
	<b>GES</b> ( <i>Guiana extended spectrum</i> )	

da Eurosurv. 2010

**KPC** di classe **A** sono enzimi in grado di idrolizzare non solo i carbapenemi ma anche le penicilline, le cefalosporine e l'aztreonam



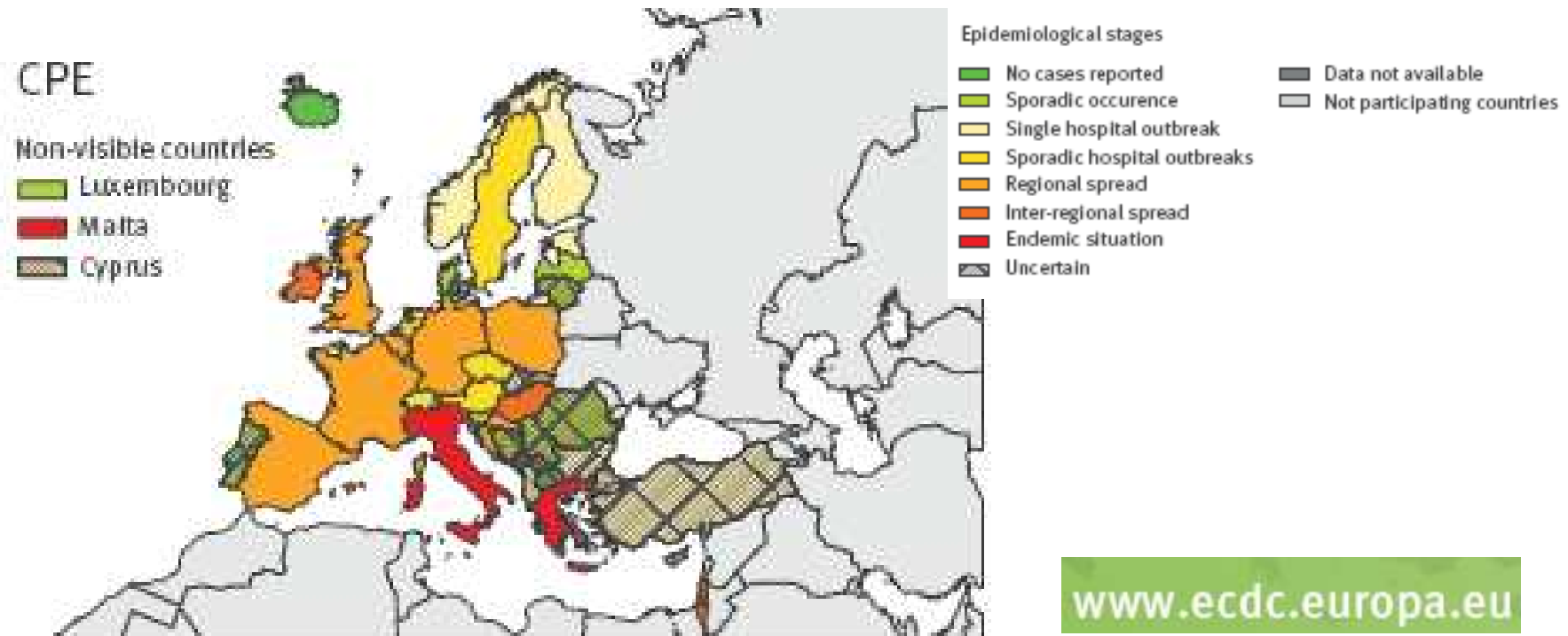
**MBL** di classe **B** esplicano la loro azione idrolitica in presenza di zinco verso tutti i beta-lattamici

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

## CARBAPENEMASI più frequenti:

Metallo- $\beta$ -Lattamasi (MBL,  $\beta$ -lattamasi di classe B)

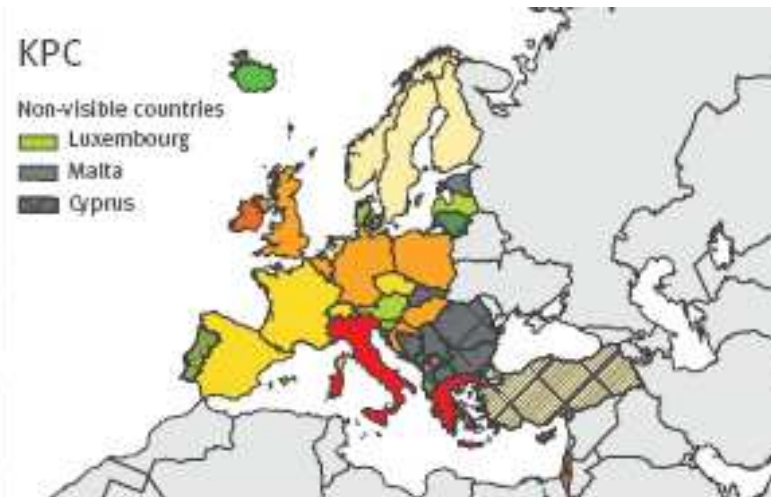
Carbapenemasi a serina ( $\beta$ -lattamasi di classe A e di classe D)

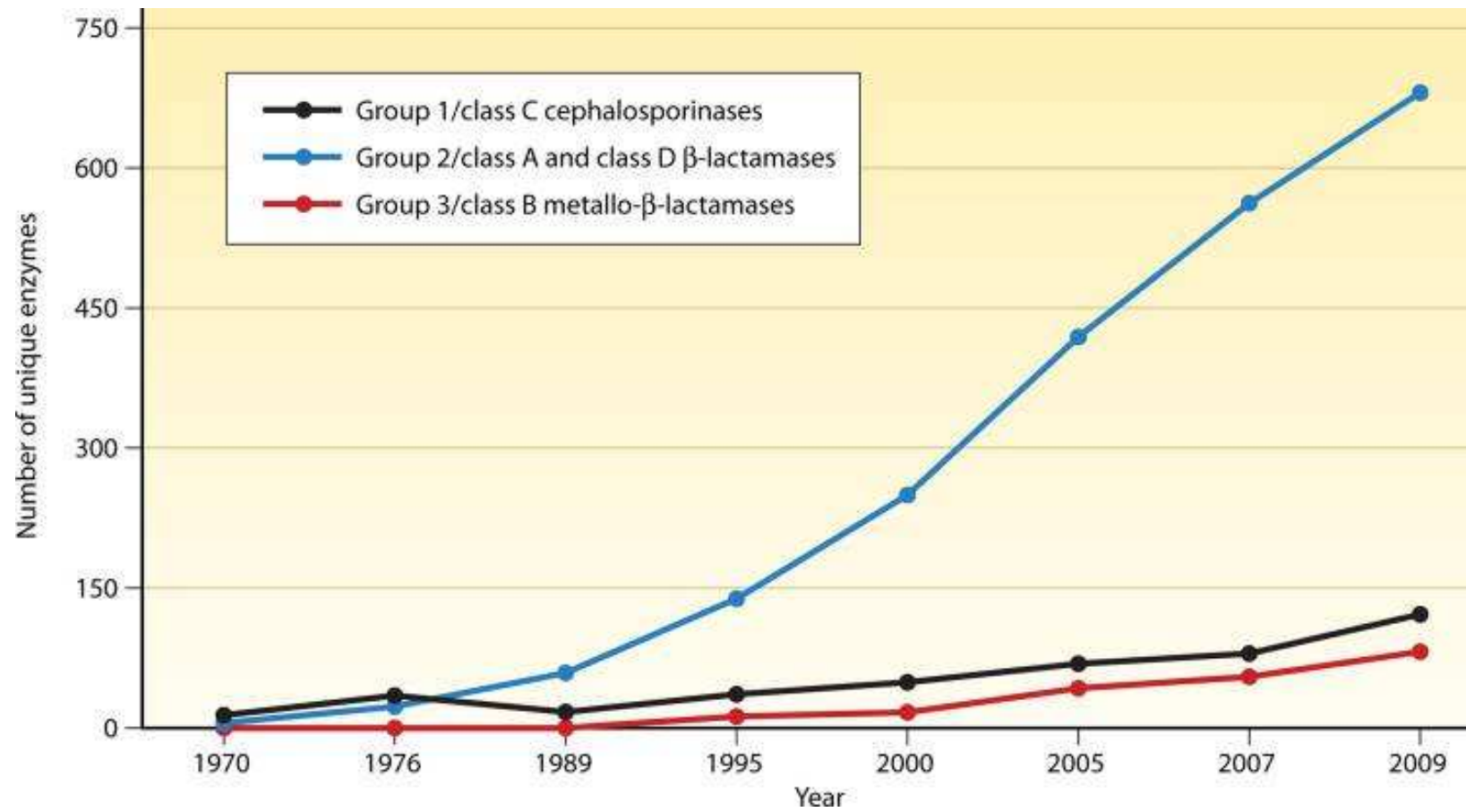


## Carbapenemase-producing bacteria in Europe

Interim results from the European survey on carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) project 2013

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione





## Classificazione e distribuzione delle carbapenemasi

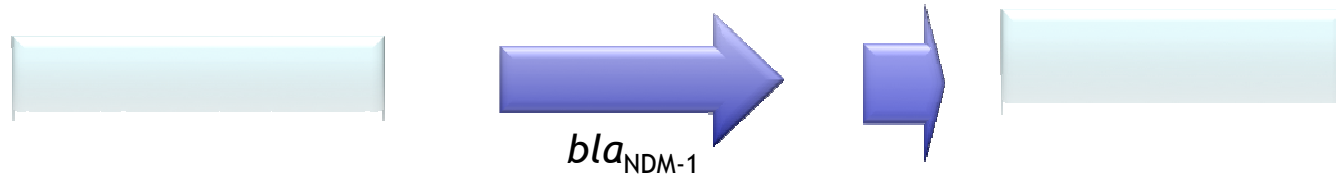
	Metallo- $\beta$ - lattamasi	Carbapenemasi a serina	
	(Classe B) IMP – VIM – NDM...	(Classe A) KPC - GES	(Classe D) OXA
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+		++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+	+
<i>Pseudomonas putida</i>	+	+	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	++	+
<i>Escherichia coli</i>	++	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	+		+
<i>Providencia spp.</i>	+		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	+	+	
<i>Serratia marcescens</i>	+	+	
<i>Enterobacter s pp.</i>	+	+	
<i>Citrobacter freundii</i>	+	+	
<i>Salmonella enterica</i>		+	

+ associazioni specie/enzima riportate solo sporadicamente  
 ++ associazioni specie/enzima prevalentemente riportata adattata e modificata da Miriagou et al. (2010 CMI)

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

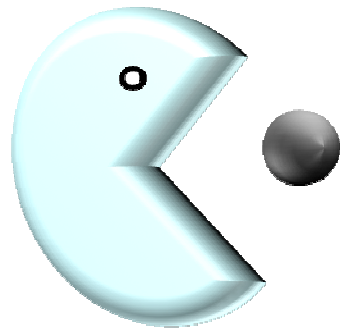


# Identificazione geni delle carbapenemasi



Gene *bla*

Gene a localizzazione cromosomiale o trasferibile che codifica la sintesi delle carbapenemasi



Carbapenemico

Rapida trasmissione della resistenza

Varianti  
KPC 2-11

Varianti  
IMP 1-17  
VIM 1-10

Molte  
varianti  
OXA

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

⇒ Rapida identificazione

⇒ Efficaci misure per il contenimento delle infezioni  
essenziali per il controllo della diffusione

MICROBIAL DRUG RESISTANCE  
Volume 02, Number 03, 2013  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/mdr.2013.0370

MECHANISMS

OPEN ACCESS Freely available online

PLOS ONE

### Emergence of *New Delhi metallo-β-lactamase 1 (NDM-1)* Producing and Multidrug Resistant Uropathogens Causing Urinary Tract Infections in Andaman Islands, India

Debdutta Bhattacharya<sup>1,2\*</sup>, Ramasubhan Thammamani<sup>1\*</sup>, Haimanti Bhattacharya<sup>1</sup>,  
Devarajan Sutharima Sanyal<sup>1</sup>, Nagarajan Muruganandam<sup>1</sup>, Subarna Roy<sup>1,2</sup>,  
and Atiyur Purushothaman Sugunan<sup>1</sup>

### National Surveillance Study on Carbapenem Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: The Emergence and Rapid Dissemination of KPC-2 Carbapenemase

Sheng-Kang Chiu<sup>1,2</sup>, Tsu-Lan Wu<sup>3</sup>, Yin-Ching Chuang<sup>4</sup>, Jung-Chung Lin<sup>5</sup>, Chang-Phong Fung<sup>6</sup>, Po-Liang Lu<sup>6</sup>, Jann-Tay Wang<sup>7</sup>, Lih-Shinn Wang<sup>8</sup>, L. Kristopher Shu<sup>9</sup>, Kuo-Ming Yeh<sup>1\*</sup>

1 Division of Infectious Diseases and Tropical Medicine, Department of Medicine, Tri-Service General Hospital, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan, ROC, 2 Graduate Institute of Medical Sciences, National Defense Medical Center, Taipei, Taiwan, ROC, 3 Department of Laboratory Medicine, Taoyuan, Taiwan, ROC, 4 Department of Medical Research, Chi Mei Medical Center, Tainan Hsien, Taiwan, ROC, 5 Department of Medical Research, National Yang-Ming University, Taipei, Taiwan, ROC, 6 Department of Infectious Diseases, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, ROC, 7 Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan, ROC, 8 Department of Infectious Diseases, Tri-Service General Hospital, Hualien, Taiwan, ROC, 9 Institute of Infectious Diseases and Tropical Medicine, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC

RAPID COMMUNICATIONS

### Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013

JW Decousser (jean-wlnoec.decousser@hmn.aphp.fr)<sup>1,2\*</sup>, C Jansse<sup>2,3</sup>, P Nordmann<sup>4,5</sup>, A Emritan<sup>1,2</sup>, R A Bonnin<sup>6</sup>, L Anis<sup>1</sup>, J C Marlet<sup>1</sup>, L Polrat<sup>1,2</sup>

1. Department of Virology, Bacteriology - Infection Control, Parasitology - Mycology, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), University Hospital Henri Mondor, Créteil, France
2. University Paris East Créteil (UPEC), Faculty of Medicine, Créteil, France
3. Infection Control, Prevention and Epidemiology Unit, AP-HP, University Hospital Henri Mondor, Créteil, France
4. INSERM U914 "Emerging Antibiotic Resistance", Le Kremlin-Bicêtre, France
5. Medical and Molecular Microbiology Unit, Department of Medicine, Faculty of Science, University of Fribourg, Fribourg, Switzerland
6. Department of Anaesthesiology, AP-HP, University Hospital Henri Mondor, Créteil, France

Citation style for this article:  
Decousser JW, Jansse C, Nordmann P, Emritan A, Bonnin RA, Anis L, Marlet JC, Polrat L. Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Euro Surveill*. 2013;18(3): pii=25547. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=25547>

Article submitted on 23 July 2013 / published on 11 A.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy  
Advance Access published July 18, 2013  
Journal of Antimicrobial Chemotherapy

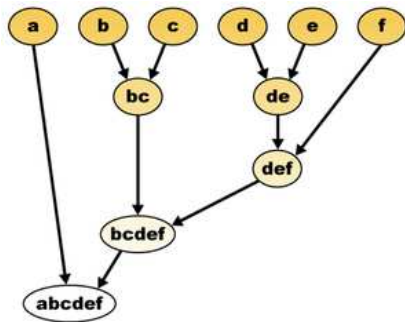
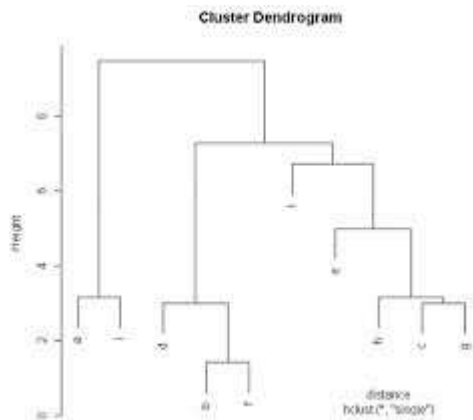
J Antimicrob Chemother  
doi:10.1093/jac/dkt298

### Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil

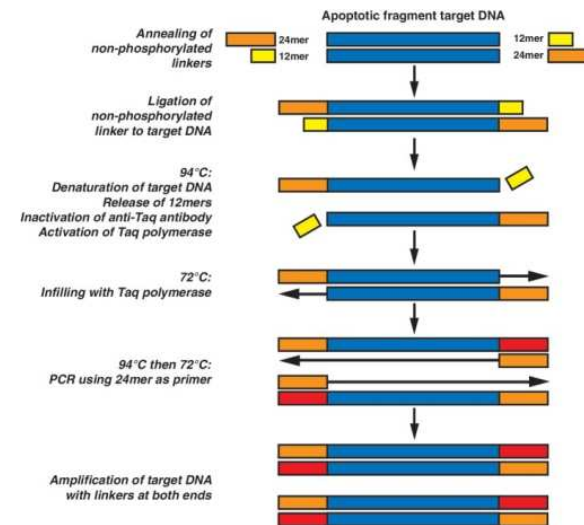
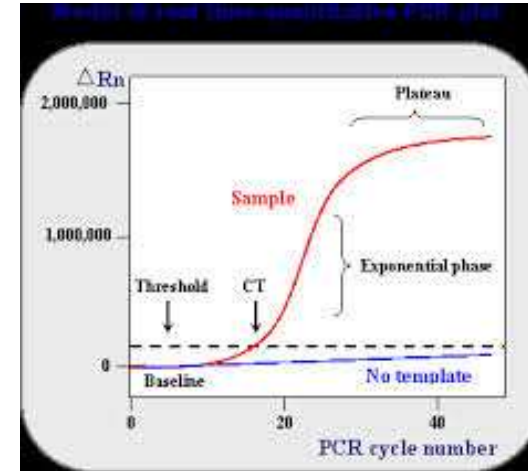
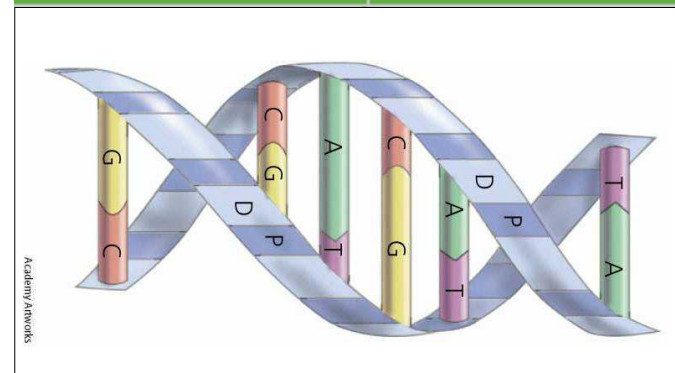
Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef<sup>1\*</sup>, Polyana Silva Pereira<sup>1</sup>, Rodolpho Mattos Albano<sup>2</sup>, Gabriela Casemiro Beria<sup>1</sup>, Thiago Pavoni Gomes Chagas<sup>1</sup>, Loreci Natalina Timm<sup>3</sup>, Renato Cassol Ferreira Da Silva<sup>4</sup>, Diego Rodrigues Falci<sup>4</sup> and Marise Dutra Azeiteiro<sup>1</sup>

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

# Diverse tecniche genotipiche che permettono la conferma della presenza di carbapenemasi sia prodotte commercialmente sia con metodiche "home-made"



Single PCR	Genotypic identification and/or confirmation
Multiplex PCR	
Real-time PCR	
Product sequencing	
Ligation techniques (e.g. Check-Points)	



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

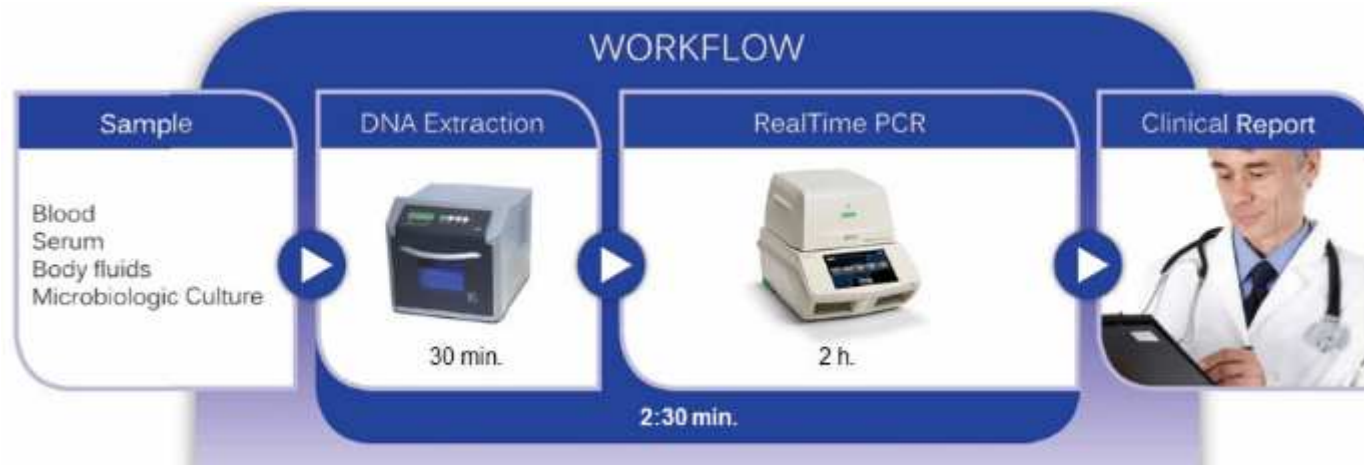
## tecniche genotipiche

<b>Tecnica</b>	<b>Test</b>	<b>Vantaggi</b>	<b>Svantaggi</b>
<b>Ricerca molecolare</b>	<b>PCR</b>	<b>Facile e specifico</b>	<b>Può non trovare nuove varianti e non differenziare tra varianti</b>
	<b>DNA probes</b>	<b>Specifico e costoso</b>	<b>Può non trovare nuove varianti e non differenziare tra varianti e rispondere tardi a epidemiologia in divenire</b>
	<b>Clonaggio e sequenziamento</b>	<b>Gold standard molecolare</b>	<b>difficoltoso</b>

Da Walsh et al. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, 2005, Metallo--Lactamases: the Quiet before the storm?

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

# PCR Real Time



IMVI	24	blaIMP / blaVIM DNA detection / detección ADN	CE-IVD
------	----	--	--------

OXVIKP	24	OXA-48 / VIM / KPC DNA detection / detección ADN <b>NEW</b>	CE-IVD
--------	----	--	--------

KPND	24	blaKPC / blaNDM-1 DNA detection / detección ADN	CE-IVD
------	----	--	--------

OXVI	24	OXA-48 / VIM DNA detection / detección ADN	CE-IVD
------	----	---	--------



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

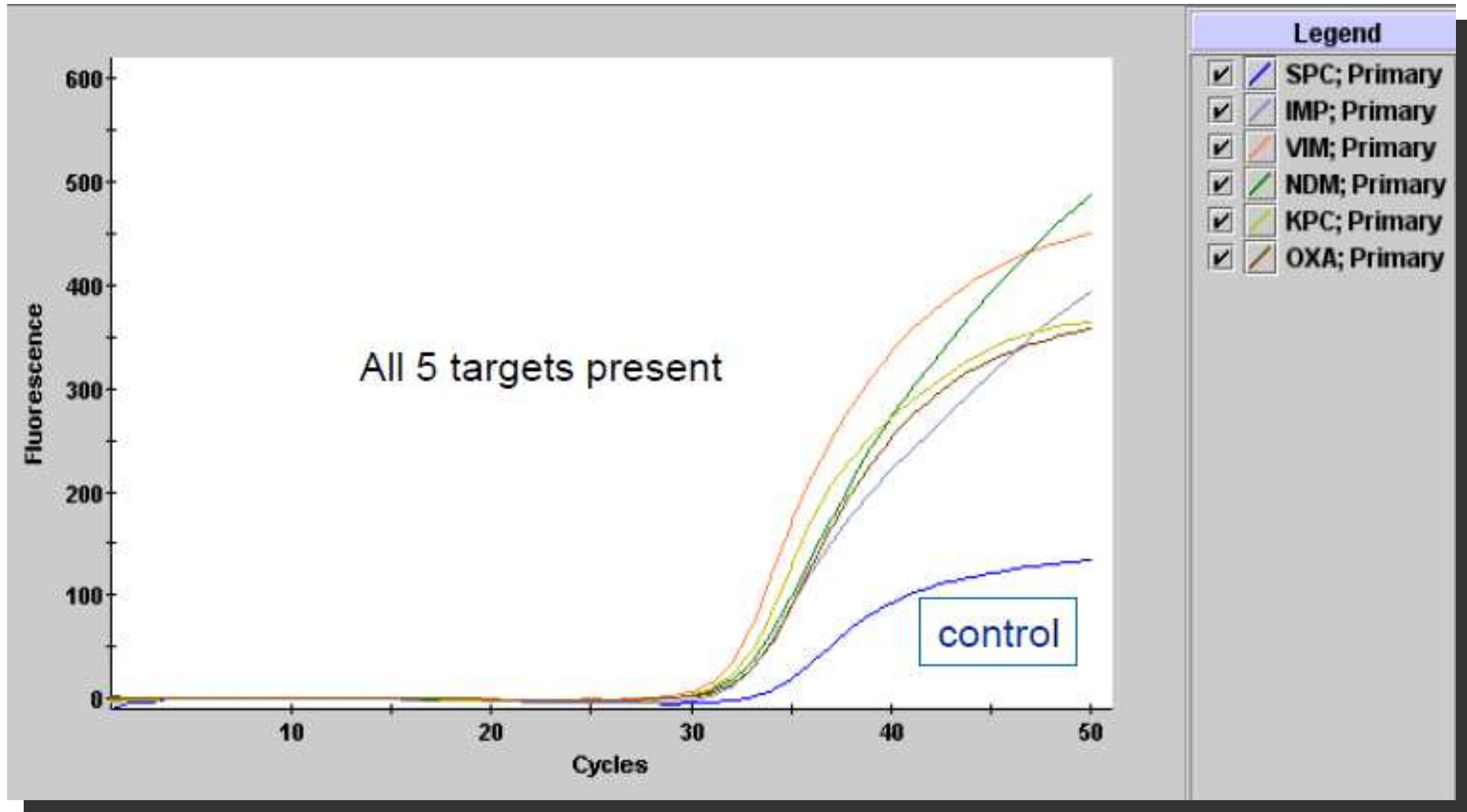
## PCR Real Time Xpert CARBA-R



- La cartuccia identifica cinque classi di geni di resistenza ai carbapenemici:
  - $bla_{KPC}$
  - $bla_{NDM}$
  - $bla_{VIM}$
  - $bla_{OXA-48}$
  - $bla_{IMP-1}$
  
- Campione: tampone rettale/coltura
  
- TAT: 48 minuti

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

# PCR Real Time Xpert CARBA-R



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

# SCREENING CARBAPENEMASI

## eazyplex<sup>®</sup> SuperBug complete



Direttamente da tampone

Senza estrazione di DNA

Tempo di analisi: 30 minuti

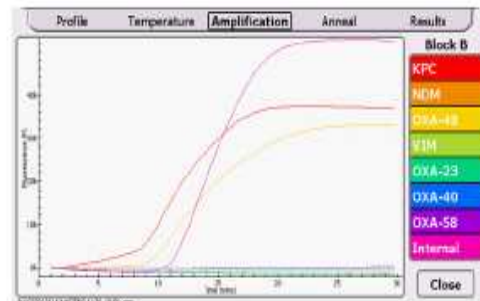
Mix pronte all'uso, liofilizzate

Conservabili a temperatura ambiente

Strumento compatto e trasportabile

Visualizzazione risultati in tempo reale per:

KPC  
NDM  
OXA-48  
VIM  
OXA-23  
OXA-40  
OXA-58  
Controllo Interno



# RESISTENZA GRAM - Test di conferma

## eazyplex<sup>®</sup> SuperBug CRE (*enterobacteriaceae*)



Direttamente da colonia

Senza estrazione di DNA

Tempo di analisi: 15 minuti

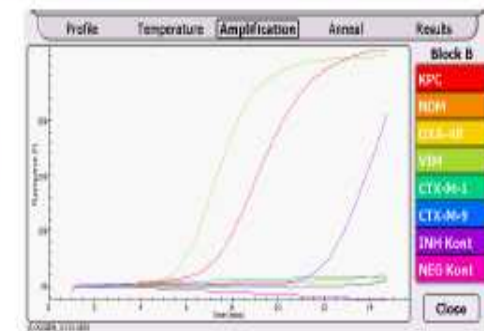
Mix pronte all'uso, liofilizzate

Conservabili a temperatura ambiente

Strumento compatto e trasportabile

Visualizzazione risultati qualitativi in tempo reale per:

KPC  
NDM  
VIM  
OXA-48 (no OXA-181)  
CTX-M-1  
CTX-M-9  
Controllo Interno



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione



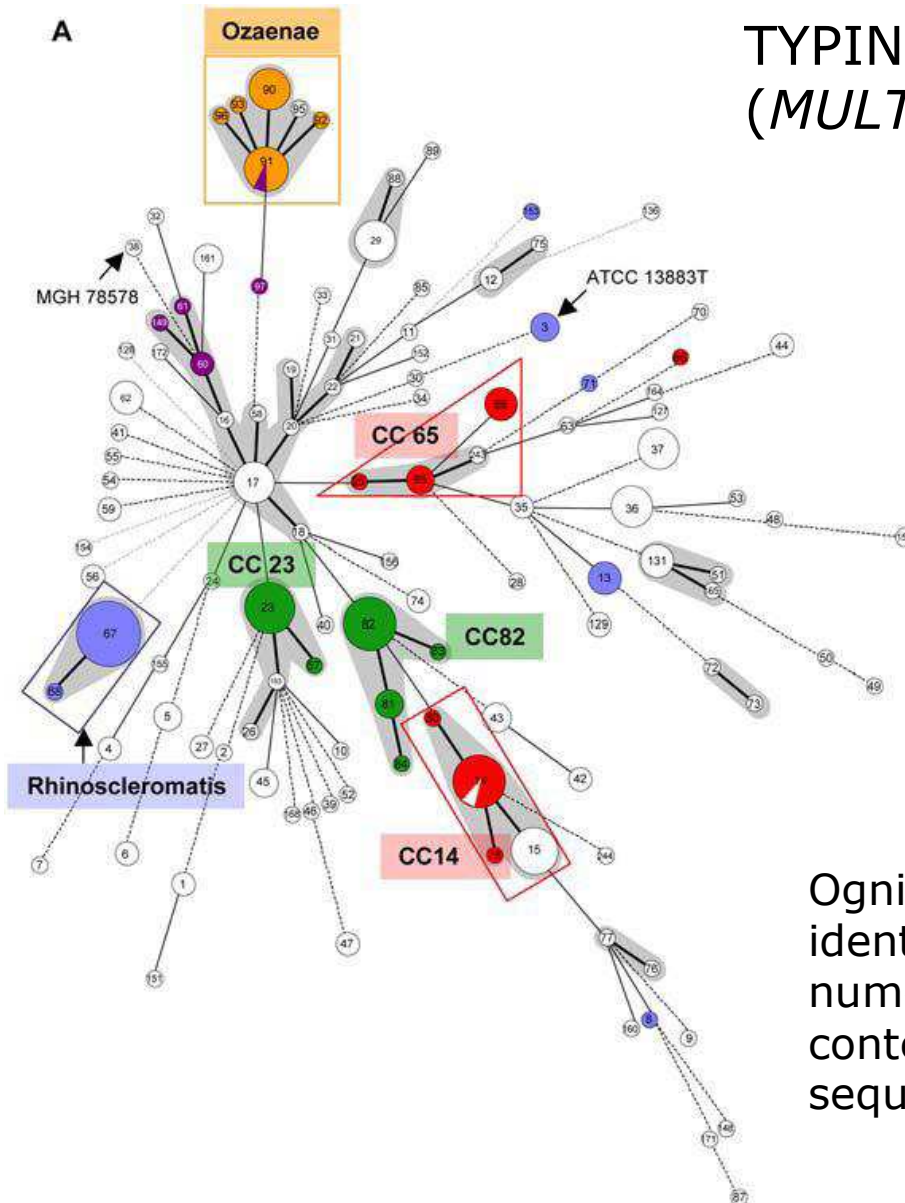
# TYPING MLST (*MULTI LOCUS SEQUENCE TYPING*):

Tipizzazione dei ceppi

Basato su  
amplificazione e  
sequenziamento di  
sette geni  
*housekeeping*  
(conservati) : *gapA*,  
*infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*,  
*rpoB* e *tonB*

Ogni allele per ciascun *locus* viene  
identificato numericamente, il codice  
numerico, confrontato con una banca dati  
contenente tutti gli alleli fino ad oggi  
sequenziati identifica il ST dell'isolato

(<http://www.pasteur.fr>)



Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

Primer	Sequence, 5' → 3'	Gene	Product size, bp
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTC	<i>blaIMP</i>	232
IMP-R	TCGGTTTAAYAAAACAACCACC		
VIM-F	GATGATGTTTGGTGGCATA	<i>blaVIM</i>	390
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG		
OXA-48-F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	<i>blaOXA-48</i>	438
OXA-48-R	CATCAAGTTCAADCCAAACCG		
NDM-F	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	<i>blaNDM</i>	621
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC		
KPC-F <sub>m</sub>	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	<i>blaKPC</i>	798
KPC-R <sub>m</sub>	CTTGTCATGCTTGTTAGGCG		

Altri metodi di sequenziamento:  
pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis, PCR fingerprinting e multiple-locus variable tandem repeat number analysis (MVLA).

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione

Check-Direct CPE



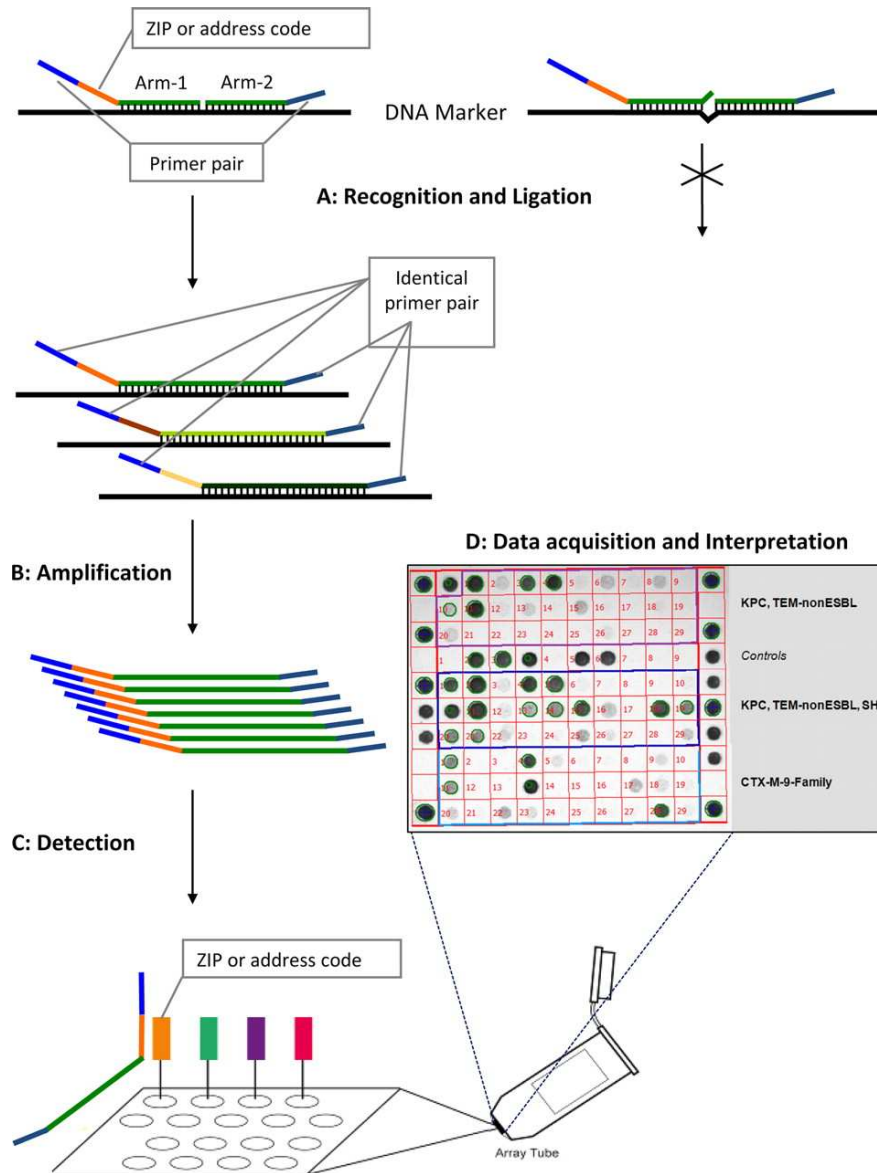
Carbapenemases detected:

- Ambler Class A: KPC
- Ambler Class B: NDM, VIM
- Ambler Class D: OXA-48

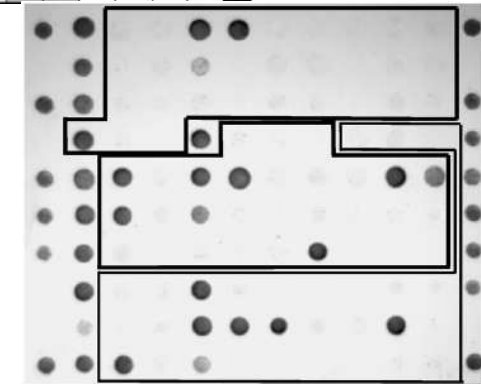
Detection from:

- Rectal or Perianal Swabs (without pre-enrichment)
- Bacterial cells suspension

# Schematic flowchart representing the different steps used by the Check-Points KPC/ESBL platform to recognize specific *bla* genes



HlyC	NDM	TEM	DNAC	TEM	TEM	TEM	CMY	CMY	
	ELDHK	ELDHK		all	R164S	R164C	R164H	I	I
CTR	NDM	TEM	DNAC	SHV	SHV	SHV	SHV	SHV	SHV
	G236S	G236S		2380I	G238S	G238A	2400I	2400I	2400I
CTR	GHA	ACT/MIR	negC	CMYU	ACC	CTX-	CTX-	CTX-	CTX-
				MOX	M1	M2	M9	M25	M25
FOX	KPC	KPC	HlyC	FOX	KPC	SFC	FOX	KPC	KPC
CTR	NDM	TEM	DNAC	TEM	TEM	TEM	CMY	CMY	
	ELDHK	ELDHK		all	R164S	R164C	R164H	I	I
HlyC	NDM	TEM	DNAC	SHV	SHV	SHV	SHV	SHV	SHV
	G236S	G236S		2380I	G238S	G238A	2400I	2400I	2400I
CTR	GHA	ACT/MIR	negC	CMYU	ACC	CTX-	CTX-	CTX-	CTX-
				MOX	M1	M2	M9	M25	M25
CTR	NDM	TEM	DNAC	TEM	TEM	TEM	CMY	CMY	
	ELDHK	ELDHK		all	R164S	R164C	R164H	I	I
negC	NDM	TEM		SHV	SHV	SHV	SHV	SHV	SHV
	G236S	G236S		2380I	G238S	G238A	2400I	2400I	2400I
CTR	GHA	ACT/MIR	DNAC	CMYU	ACC	CTX-	CTX-	CTX-	CTX-
				MOX	M1	M2	M9	M25	M25

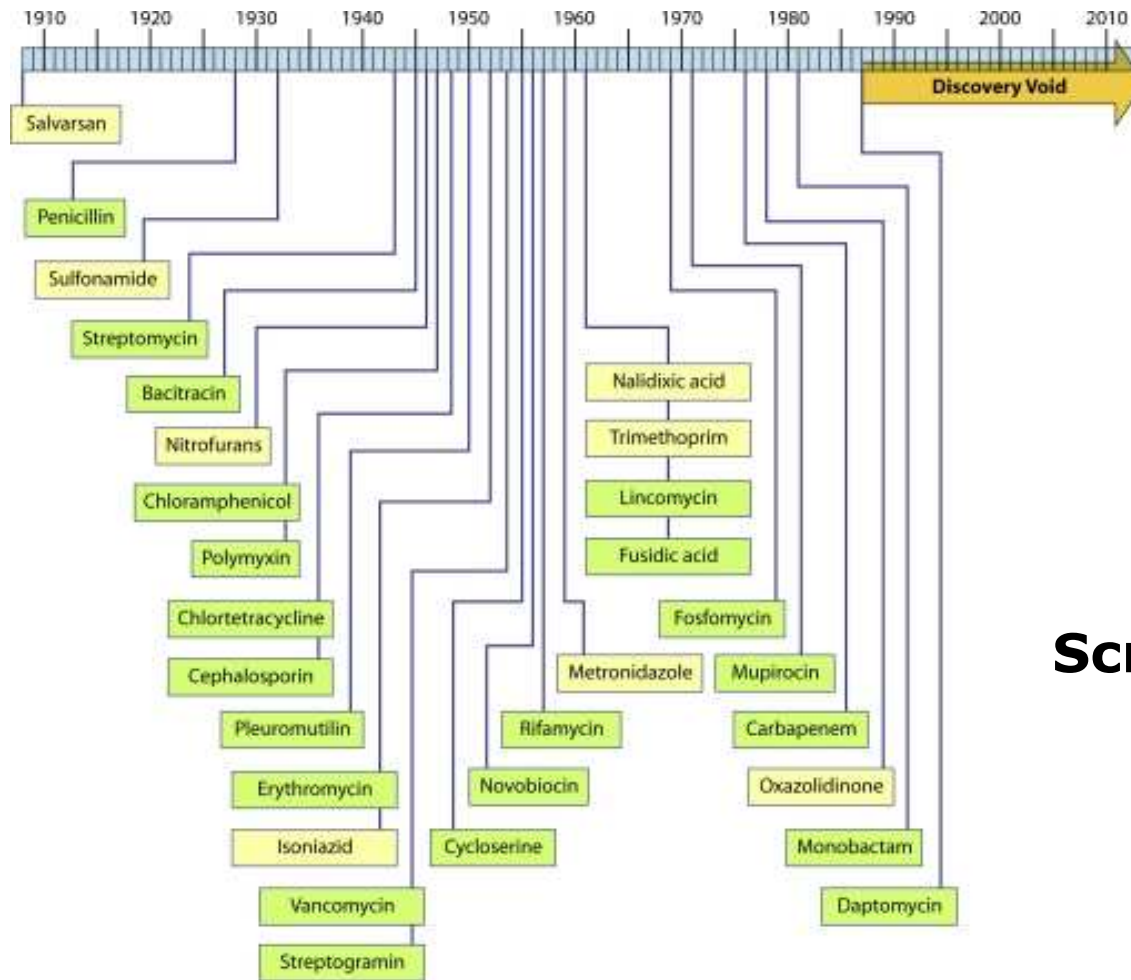


DNA microarray fisso al fondo di una fiala di micro-reazione.

Il microarray consiste di oligonucleotidi complementari (CZIP) rivolti verso singole sonde, a ibridazione avvenuta tra i prodotti di PCR ligation amplificati e il microarray si ha rilevazione colorimetrica.

Ogni pannello definisce i risultati della tipizzazione di un ceppo e si compone di punti di controllo e di specifici punti marcatori, numerati da 1 a 96.

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione



Discovery void

**Screening genotipico**

**O**

**Conferma genotipica**

**???**

Diagnosi di laboratorio: genotipizzazione