

# **E**nterobacteriales **multiresistenti**

**DAL LABORATORIO ALLA CLINICA**



**BRUNO VIAGGI  
CARLO TASCINI  
GIAN MARIA ROSSOLINI**

# **E**nterobacterales multiresistenti

**DAL LABORATORIO ALLA CLINICA**

**Bruno Viaggi**

*Dipartimento di Anestesia  
SOD Neuroanestesia e Rianimazione  
Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze*

**Carlo Tascini**

*Prima Divisione Malattie Infettive  
Ospedale Cotugno, Napoli*

**Gian Maria Rossolini**

*Dipartimento Medicina Sperimentale e Clinica  
Università degli Studi di Firenze  
SOD Microbiologia e Virologia  
Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi, Firenze*

EDIZIONI INTERNAZIONALI s.r.l.

**EDMES**

Edizioni Medico Scientifiche - Pavia



© Copyright 2018 **Edizioni Medico Scientifiche - Pavia**

Edizioni Internazionali srl  
Divisione EDIMES  
Edizioni Medico-Scientifiche - Pavia

Via Riviera, 39 - 27100 Pavia  
Tel. 0382526253 - Fax 0382423120  
E-mail: [edint.edimes@tin.it](mailto:edint.edimes@tin.it)

Tutti i diritti sono riservati.  
Nessuna parte può essere riprodotta in alcun modo  
(compresi i microfilm e le copie fotostatiche)  
senza il permesso scritto dell'editore.

Immagine di copertina: ©Guido Vrola / 123RF.com

ISBN 978-88-88541-02-0

# INDICE

<b>Introduzione</b> .....	5
<b>La resistenza agli antibiotici negli enterobatteri</b> .....	7
La resistenza agli antibiotici $\beta$ -lattamici .....	7
Le $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL).....	8
Le $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC.....	9
Le carbapenemasi .....	10
La resistenza agli aminoglicosidi .....	12
La resistenza alla colistina.....	13
La resistenza alla fosfomicina .....	14
La resistenza al ceftazidime-avibactam.....	14
La resistenza al ceftolozano-tazobactam .....	15
<b>Diagnostica di laboratorio delle infezioni da <i>Enterobacterales</i> multiresistenti</b> .....	16
Le metodiche diagnostiche convenzionali .....	17
Le metodiche diagnostiche innovative.....	19
<b>Aspetti peculiari sulle nuove associazioni <math>\beta</math>-lattamico/inibitore delle <math>\beta</math>-lattamasi per le infezioni da <i>Enterobacterales</i> multiresistenti</b> .....	25
Ceftolozano/tazobactam .....	25
Ceftazidime/avibactam.....	33
Meropenem/Vaborbactam .....	41
Imipenem/Relebactam .....	46
Aztreonam/Avibactam .....	49

<b>Terapia delle ESBL: tra evidenze ed epidemiologia locale .....</b>	<b>52</b>
<b>Terapia delle AmpC tra enzimi espressi ed inducibili: come deve orientarsi il clinico .....</b>	<b>59</b>
<b>Terapia della KPC oggi: dal malato fragile alle infezioni semplici .....</b>	<b>63</b>
Terapia delle MBL ed OXA-48.....	73
<b>Algoritmi</b>	
Algoritmo trattamento infezioni da GN MDR.....	77
Algoritmo interpretazione antibiogramma <i>Enterobacterales</i> ESBL/AmpC espressa.....	78
Algoritmo interpretazione antibiogramma <i>Enterobacterales</i> AmpC inducibile.....	79
Algoritmo terapia del paziente infetto con colonizzazione nota da <i>Enterobacteriaceae</i> produttori di carbapenemasi di tipo KPC .....	80
Algoritmo terapia delle batteriemie da <i>Enterobacteriaceae</i> produttori di carbapenemasi di tipo KPC .....	81
<b>Bibliografia .....</b>	<b>82</b>

# INTRODUZIONE

Gli enterobatteri sono una famiglia di bacilli Gram-negativi aerobi-anaerobi facoltativi che comprende molte specie diverse, alcune di grande rilevanza clinica. Quali componenti tipici del microbiota intestinale dell'uomo e di molti altri animali hanno una distribuzione ubiquitaria e possono ritrovarsi nell'ambiente, dove la loro presenza è utilizzata anche come indicatore di contaminazione fecale. Alcune specie hanno evoluto specifici determinanti di patogenicità che le rendono capaci di causare malattie anche nell'ospite normale (e. g. *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Escherichia coli* enteropatogeni) mentre altre si comportano tipicamente da patogeni opportunisti, potendo causare infezioni in sedi extra-intestinali in concomitanza di una compromissione delle difese dell'ospite (e. g. *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella morganii*, *Providencia* spp.). Complessivamente gli enterobatteri sono tra le cause più frequenti di infezioni associate alle pratiche assistenziali [1], e sono altresì responsabili di molte infezioni di origine comunitaria (ad es. infezioni intestinali, infezioni urinarie e sepsi).

Nel corso degli anni la tassonomia degli enterobatteri è stata oggetto di numerose revisioni. Del tutto recentemente è stata proposta una ulteriore revisione sulla base delle nuove conoscenze rese disponibili con i dati di sequenziamento genomico su larga scala, che hanno portato a riclassificare le varie specie originariamente comprese nella famiglia *Enterobacteriaceae* in un ordine denominato *Enterobacterales*, all'interno del quale sono comprese più famiglie (*Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*,

*Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budviciaceae*) [2]. In questa nuova classificazione molte specie di rilevanza clinica sono ancora parte della famiglia *Enterobacteriaceae* (es. quelle appartenenti ai generi *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter* ed *Enterobacter*) mentre altre sono ricomprese in altre famiglie (es. *Yersinia* e *Serratia* fanno parte della famiglia *Yersiniaceae*; *Proteus*, *Providencia* e *Morganella* fanno parte della famiglia *Morganellaceae*).

# LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI NEGLI ENTEROBATTERI

Gli enterobatteri sono naturalmente sensibili a molte classi di antibiotici, con alcune differenze tra le varie specie per quanto riguarda il profilo di sensibilità naturale [3], ma hanno mostrato una notevole capacità ad evolvere resistenze acquisite nei confronti degli antibiotici che funzionano sui ceppi *wild-type*. L'accumulo progressivo di determinanti di resistenza ha portato all'emergenza progressiva di ceppi con fenotipi di multiresistenza (ceppi MDR), che talvolta assumono le caratteristiche di resistenza estesa (XDR) e in qualche caso anche di panresistenza (PDR). La specie maggiormente interessata dal problema delle multiresistenze estese è *Klebsiella pneumoniae*, ma il fenomeno interessa anche molte altre specie di comune isolamento clinico.

Di seguito vengono brevemente riassunti i principali meccanismi di resistenza acquisita degli enterobatteri nei confronti delle principali classi di antibiotici utilizzati per la terapia delle infezioni da *Enterobacterales* multiresistenti.

## La resistenza agli antibiotici $\beta$ -lattamici

Per la loro efficacia e tollerabilità gli antibiotici  $\beta$ -lattamici sono tra i più utilizzati per la terapia delle infezioni da enterobatteri sia in ambito ospedaliero sia in ambito comunitario. La produzione di  $\beta$ -lattamasi, enzimi che degradano l'anello  $\beta$ -lattamico rendendo il farmaco inattivo, rappresenta il principale meccanismo di resistenza ai  $\beta$ -lattamici negli enterobatteri an-

che se altri meccanismi (es. ridotta permeabilità della membrana esterna per alterazione delle porine) possono contribuire variabilmente.

Le  $\beta$ -lattamasi sono enzimi evoluti in natura, nell'ambito dei fenomeni di competizione tra microrganismi, come meccanismo di resistenza agli antibiotici  $\beta$ -lattamici naturali. L'introduzione dei  $\beta$ -lattamici per uso clinico, a partire dalla metà del secolo scorso, ha creato una nuova pressione selettiva in questo contesto favorendo la diffusione in ambito clinico di ceppi produttori di  $\beta$ -lattamasi e l'acquisizione di nuove  $\beta$ -lattamasi mediate da plasmidi, capaci di conferire resistenza alle varie famiglie di  $\beta$ -lattamici via via introdotte. Attualmente, gli enzimi più importanti dal punto di vista clinico, per epidemiologia e implicazioni di resistenza, sono le  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL), le  $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC, e le carbapenemasi.

## Le $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL)

Le ESBL sono capaci di degradare le penicilline, le cefalosporine (comprese quelle di terza e quarta generazione e quelle con attività anti MRSA) e i monobattami, ma non i carbapenemi. Le ESBL sono generalmente sensibili agli inibitori convenzionali (e. g. clavulanato, sulbactam, tazobactam) e a quelli di nuova generazione (e. g. diazabicicloottani, boronati), ed i ceppi produttori di ESBL sono spesso sensibili alle combinazioni  $\beta$ -lattamico + inibitore (BLIC) [4]. La sensibilità alle BLIC dei ceppi produttori di ESBL può tuttavia dipendere dal tipo di BLIC e dal ceppo, e deve essere confermata mediante antibiogramma.

Le ESBL hanno iniziato a diffondersi tra gli enterobatteri a partire dalla metà degli anni '80 del secolo scorso, in risposta alla pressione selettiva generata dall'uso estensivo di cefalospo-

rine di terza generazione, e sono andate rapidamente incontro ad una diffusione globale, facilitata dal fatto di essere mediate da plasmidi trasferibili tra gli enterobatteri. Inizialmente rappresentate da mutanti puntiformi delle  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro di tipo TEM ed SHV, già largamente prevalenti in ambito clinico, le ESBL hanno successivamente presentato una evoluzione epidemiologica caratterizzata dalla comparsa di nuovi tipi di enzimi, tra i quali i più importanti sono quelli di tipo CTX-M, che in poco tempo hanno largamente rimpiazzato le altre varianti e raggiunto prevalenze anche molto elevate in molti contesti epidemiologici [5-6].

## Le $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC

Le  $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC sono capaci di degradare penicilline e cefalosporine, comprese le cefalosporine di terza generazione e le cefamicine, mentre hanno scarsa attività nei confronti delle cefalosporine di quarta generazione e non sono attive sui carbapenemi. A differenza delle ESBL, le AmpC sono generalmente resistenti agli inibitori convenzionali, mentre sono inibite dai nuovi inibitori (diazabicicloottani e boronati) [7-4].

Enzimi di tipo AmpC sono codificati da geni cromosomici inducibili residenti in alcune specie di *Enterobacterales* (es. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* complex, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*), che esprimono di conseguenza una resistenza intrinseca nei confronti dei  $\beta$ -lattamici che funzionano contemporaneamente da induttori e da substrati (es. ampicillina, amoxicillina-clavulanato, cefalosporine a spettro ristretto, cefoxitina). Le cefalosporine di terza generazione sono substrati di AmpC ma non sono induttori, e generalmente mantengono una attività in vitro nei confronti dei ceppi

che producono AmpC in modo inducibile. Tuttavia, in corso di terapia con questi farmaci possono essere selezionati facilmente mutanti resistenti che producono l'enzima in modo costitutivo, e per questo motivo l'uso delle cefalosporine di terza generazione nei confronti delle specie produttrici di AmpC inducibile è sconsigliato anche se il ceppo in vitro appare sensibile. Alcune specie di *Enterobacterales* (es. *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis*) sono sprovviste di AmpC cromosomiche e di altre  $\beta$ -lattamasi cromosomiche, e sono naturalmente sensibili anche all'ampicillina e alle cefalosporine a spettro ristretto. *Escherichia coli* e *Shigella*, infine, sono provviste di geni cromosomici per AmpC, ma in queste specie gli enzimi sono espressi solo a livelli molto bassi e in modo non inducibile, con un fenotipo che ricorda quello delle specie sprovviste di  $\beta$ -lattamasi cromosomiche [7].

Alcuni geni per AmpC sono stati mobilizzati su plasmidi trasferibili, e salvo alcune eccezioni, in questi casi vengono generalmente espressi in forma costitutiva. L'acquisizione di questi plasmidi conferisce generalmente un fenotipo di resistenza tipico dei mutanti derepressi (resistenza alle cefalosporine di terza generazione, sensibilità residua al cefepime) che, quando presente in una specie sprovvista di AmpC, suggerisce la presenza di una AmpC plasmidica. Anche se segnalate da tempo, le AmpC plasmidiche hanno per il momento raggiunto una diffusione minore delle ESBL e restano complessivamente determinanti di resistenza più rari come causa di resistenza alle cefalosporine di terza generazione [8].

## **Le carbapenemasi**

Negli enterobatteri, la resistenza acquisita ai carbapenemi è rimasta rara per molto tempo, ma negli ultimi anni ha iniziato

a diffondersi in modo consistente, e l'emergenza degli enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE) è considerata uno dei più importanti problemi di antibiotico-resistenza presentatisi negli ultimi anni.

Negli enterobatteri la resistenza ai carbapenemi può essere mediata da una ridotta permeabilità della membrana esterna per perdita di porine in associazione con la produzione di  $\beta$ -lattamasi di tipo ESBL o AmpC, oppure da una produzione di  $\beta$ -lattamasi capaci di degradare efficientemente i carbapenemi (carbapenemasi). La produzione di carbapenemasi rappresenta il principale meccanismo di resistenza acquisita ai carbapenemi negli enterobatteri, ed è anche quello di maggiore rilevanza epidemiologica dal momento che sono mediate da plasmidi trasferibili che possono diffondersi rapidamente tra gli enterobatteri [9].

**Tabella 1** - *Caratteristiche differenziali delle principali carbapenemasi diffuse nei ceppi di enterobatteri resistenti ai carbapenemi.*

	Tipo di carbapenemasi		
	KPC	OXA-48-like	Metallo-enzimi (VIM, NDM, IMP)
Attività carbapenemasi	Forte	Debole	Forte
Spettro di attività	Tutti i $\beta$ -lattamici	Penicilline, cefalosporine a spettro ristretto, carbapenemi	Tutti i $\beta$ -lattamici ad eccezione di aztreonam (e piperacillina per IMP)
Sensibilità ad inibitori	Boronati (e. g. vaborbactam), Diazabiccicloottani (e. g. avibactam, relebactam)	Avibactam	EDTA

Le principali carbapenemasi emerse negli enterobatteri sono gli enzimi di tipo KPC (carbapenemasi a serina, di classe molecolare A), gli enzimi OXA-48-like (carbapenemasi a serina, di classe molecolare D) e le metallo- $\beta$ -lattamasi (carbapenemasi a zinco, di classe molecolare B) che a loro volta comprendono gli enzimi di tipo VIM, NDM ed IMP. Le varie carbapenemasi presentano caratteristiche funzionali diverse in termini di spettro di attività e sensibilità agli inibitori, che sono riassunte nella *Tabella 1*, e anche una diversa distribuzione epidemiologica [10]. In Italia la specie batterica maggiormente interessata dalla diffusione di carbapenemasi è la *K. pneumoniae*, e le carbapenemasi più frequenti sono quelle di tipo KPC, che rappresentano oltre il 90% degli isolati produttori di carbapenemasi [11-12].

## **La resistenza agli aminoglicosidi**

Negli enterobatteri i principali meccanismi di resistenza acquisita agli aminoglicosidi sono rappresentati dalla produzione di enzimi che modificano il farmaco (acetil-trasferasi, adenil-trasferasi e fosfo-trasferasi) o di enzimi (es. ArmA, RmtB) che modificano il bersaglio ribosomiale, per metilazione dell'rRNA 16S, rendendolo insensibile a questi farmaci [8, 13]. Mentre gli enzimi che modificano gli aminoglicosidi hanno profili di attività variabili, che comprendono solo alcuni aminoglicosidi, e conferiscono un profilo di resistenza differenziato a seconda del tipo di enzima prodotto, la modificazione del bersaglio ribosomiale per metilazione conferisce resistenza di alto livello a tutti gli aminoglicosidi disponibili per uso clinico compreso il nuovo aminoglicoside plazomicina, prossimo all'introduzione in clinica, e compromette in modo definitivo la possibilità di utilizzare questi farmaci.

## La resistenza alla colistina

La colistina è stata recentemente recuperata come farmaco *last-resort* per le infezioni da batteri Gram-negativi multiresistenti, compresi i CRE e in particolare i ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi. L'incremento nell'uso della colistina in ambito clinico ha portato rapidamente alla selezione di ceppi colistino-resistenti, specialmente in *K. pneumoniae*. In Italia, percentuali di colistino-resistenza intorno al 30-40% sono state riportate in *K. pneumoniae* produttrice di carbapenemasi da studi di sorveglianza nazionale (11, 14).

Il principale meccanismo di resistenza alla colistina negli enterobatteri è rappresentato da una modificazione del bersaglio del farmaco (il lipide A del lipopolisaccaride batterico (LPS)) per l'aggiunta di residui di fosfoetanolamina o di aminodeossiarabinosio che ne neutralizzano la carica negativa riducendo l'affinità per la colistina [15]. Tale modificazione può essere operata dai sistemi endogeni di modificazione dell'LPS, in seguito a mutazioni cromosomiche che attivano questi sistemi, oppure da enzimi con attività fosfoetanolamina trasferasica codificati da plasmidi trasferibili (enzimi Mcr) [15]. Le mutazioni cromosomiche responsabili della resistenza alla colistina possono interessare numerosi geni regolatori [15]. In *K. pneumoniae* di particolare importanza per la loro frequenza risultano le mutazioni che portano alla inattivazione del gene *mgrB*, un regolatore negativo del sistema PhoP-PhoQ che controlla a sua volta il sistema di modificazione dell'LPS e molte altre funzioni cellulari [16]. Gli enzimi di tipo Mcr sono stati scoperti solo recentemente, in isolati di enterobatteri (prevalentemente *E. coli* e *Salmonella*, ma anche altre specie) di origine animale ma anche umana ed ambientale. La selezione e diffusione dei plasmidi codificanti per questi enzimi si ritiene sia stata promossa dall'uso estensivo della colistina

in ambito veterinario [17-18]. La possibilità di trasferimento di questi determinanti di resistenza in ambito clinico ha generato molta preoccupazione in considerazione del ruolo della colistina come farmaco *last-resort* per la terapia delle infezioni da CRE. Al momento la diffusione di resistenze trasferibili alla colistina in ambito clinico resta limitata, e interessa soprattutto *E. coli* [15], ma la sorveglianza del fenomeno riveste evidentemente una notevole importanza.

## **La resistenza alla fosfomicina**

Come la colistina, anche la fosfomicina per uso endovenoso è stata recentemente recuperata come farmaco *last-resort* per le infezioni da enterobatteri multiresistenti, e in particolare quelli produttori di carbapenemasi, nei confronti dei quali la fosfomicina mantiene una discreta attività [19-21].

Negli enterobatteri la resistenza alla fosfomicina può essere dovuta a mutazioni a carico dei sistemi di trasporto del farmaco all'interno della cellula, necessari per permettere al farmaco di raggiungere il bersaglio intracellulare (l'enzima MurA, coinvolto nelle fasi precoci di sintesi della parete batterica), o all'acquisizione di enzimi che modificano la fosfomicina inattivandola (enzimi Fos, tra i quali il più importante è l'enzima FosA), codificati da plasmidi trasferibili [22].

## **La resistenza al ceftazidime-avibactam**

Avibactam è un nuovo inibitore delle  $\beta$ -lattamasi di natura non- $\beta$ -lattamica, che a differenza degli inibitori convenzionali è in grado di inibire un ampio spettro di  $\beta$ -lattamasi di rilevanza

clinica comprese le ESBL, le  $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC ed alcune carbapenemasi (KPC, OXA-48) [23].

Avibactam è stato inizialmente sviluppato in associazione con il ceftazidime per coprire i patogeni Gram-negativi multiresistenti, e la combinazione ceftazidime-avibactam è stata recentemente introdotta nella pratica clinica per la terapia di alcune infezioni comprese quelle da batteri Gram-negativi multiresistenti con limitate opzioni terapeutiche. Le caratteristiche microbiologiche, farmacologiche e cliniche di ceftazidime-avibactam sono discusse più dettagliatamente in seguito. La resistenza a ceftazidime-avibactam negli enterobatteri è rara, fatta eccezione per i ceppi produttori di metallo  $\beta$ -lattamasi che sono naturalmente resistenti al ceftazidime-avibactam. Tuttavia, la emergenza di ceppi di *K. pneumoniae* produttori di carbapenemasi di tipo KPC resistenti al ceftazidime-avibactam è stata recentemente documentata, e può essere dovuta a uno o più meccanismi quali:

- 1) alterazioni a carico delle porine;
- 2) iperproduzione della carbapenemasi;
- 3) mutazioni dell'enzima, che lo rendono resistente all'inibizione di avibactam.

In questo ultimo caso le mutazioni spesso riducono contemporaneamente la capacità dell'enzima di idrolizzare alcuni substrati, compresi i carbapenemi, e i ceppi resistenti al ceftazidime-avibactam per questo tipo di meccanismo possono presentare una sensibilità ai carbapenemi e simulare il fenotipo di ceppi ESBL-produttori [24].

## **La resistenza al ceftolozano-tazobactam**

Il ceftolozano è una nuova cefalosporina a spettro esteso con elevata attività nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa*.

Come le altre cefalosporine a spettro esteso, tuttavia, la molecola non è stabile nei confronti delle ESBL. Per questo motivo viene utilizzata in associazione con il tazobactam, un inibitore delle  $\beta$ -lattamasi. L'associazione ceftolozano-tazobactam ha una buona attività nei confronti degli enterobatteri, inclusi molti ceppi produttori di ESBL, ma non è attiva nei confronti dei ceppi produttori di carbapenemasi perchè questi enzimi non sono inibiti dal tazobactam e sono attivi sul ceftolozano.

# DIAGNOSTICA DI LABORATORIO DELLE INFEZIONI DA *ENTEROBACTEREALES* MULTIRESISTENTI

La diagnostica di laboratorio delle infezioni da *Enterobacterales* multiresistenti può rivolgersi a due quesiti principali: la diagnosi di infezione e la diagnosi di colonizzazione.

La **diagnosi eziologica delle infezioni da enterobatteri multiresistenti** è importante per la scelta della terapia antibiotica appropriata, soprattutto nel caso di infezioni causate da ceppi con fenotipo di resistenza estesa a molti antibiotici, come è il caso dei CRE. Infatti, con l'eccezione di alcune situazioni particolari, la terapia empirica delle infezioni (anche gravi) generalmente non copre i CRE e, in questi casi, una diagnosi rapida della presenza di un ceppo con queste caratteristiche è essenziale per rivedere rapidamente la terapia antibiotica in modo da coprire il patogeno responsabile dell'infezione.

La **ricerca di uno stato di colonizzazione da enterobatteri multiresistenti** ha assunto negli ultimi anni una crescente importanza, non solo come intervento necessario per la implementazione di buone pratiche di prevenzione e controllo delle infezioni (IPC), ma anche come strumento utile per la *antimicrobial stewardship*. L'individuazione dei pazienti colonizzati da CRE al momento dell'ammissione è attualmente considerato uno *standard-of-care* per prevenire e controllare la diffusione di queste infezioni all'interno delle strutture assistenziali, ed è raccoman-

dato dalle linee guida in associazione agli interventi di isolamento mirati a prevenire la cross-trasmissione dei ceppi multiresistenti [25]. D'altra parte, è noto che la colonizzazione con ceppi di enterobatteri multiresistenti rappresenta un fattore di rischio per una successiva infezione [26], e la conoscenza di uno stato di colonizzazione sempre più spesso rappresenta un elemento decisionale nella scelta della terapia empirica in caso di infezione.

L'intestino è la sede più tipicamente colonizzata dagli enterobatteri, e la ricerca dello stato di colonizzazione viene generalmente effettuata a partire dal tampone rettale, anche se altre sedi possono essere colonizzate (cute, vagina, cavo orale, alte vie respiratorie) e valutate per la ricerca di una colonizzazione da enterobatteri multiresistenti, in situazioni particolari.

La diagnostica di laboratorio delle infezioni da *Enterobacterales* si avvale di metodiche convenzionali ben consolidate e di metodiche diagnostiche innovative, di più recente introduzione, che possono offrire notevoli vantaggi in alcuni percorsi diagnostici in termini di rapidità della risposta e della sensibilità ed accuratezza dell'indagine diagnostica.

## **Le metodiche diagnostiche convenzionali**

L'**isolamento in coltura** degli enterobatteri non pone in genere particolari problemi, e rappresenta a tutt'oggi il *gold standard* per la diagnostica delle infezioni e delle colonizzazioni da enterobatteri multiresistenti. Per la ricerca delle colonizzazioni sono disponibili terreni selettivi cromogeni che consentono una identificazione presuntiva dei ceppi produttori di ESBL e dei ceppi di CRE a partire da tampone rettale o da altri campioni di screening, che hanno largamente rimpiazzato le originali procedure che prevedevano una tappa iniziale di arricchimento in brodo

selettivo e la successiva subcoltura per identificare i ceppi selezionati e comportavano tempi di risposta ancora più lunghi [27].

L'identificazione delle *Enterobacteriales* è generalmente fatta sulla base del profilo biochimico oppure utilizzando la spettrometria di massa MALDI-ToF, e non pone generalmente problemi per le specie di isolamento più comune. Le recenti rivisitazioni tassonomiche di questo gruppo di batteri, tuttavia, richiedono un costante aggiornamento dei database utilizzati dai sistemi di identificazione, che talvolta risultano obsoleti. Inoltre, i sistemi di identificazione utilizzati nei laboratori diagnostici non sempre consentono una identificazione precisa all'interno di alcuni raggruppamenti tassonomici. Ad esempio, la distinzione tra *Klebsiella pneumoniae sensu stricto* e le altre specie di *Klebsiella* correlate che sono state recentemente definite (e. g. *Klebsiella variicola*, *Klebsiella quasipneumoniae* e *Klebsiella quasivariicola*) non viene correttamente effettuata dai sistemi di identificazione comunemente utilizzati nei laboratori diagnostici, e tutti gli isolati di queste specie vengono identificati come *K. pneumoniae* a meno di non utilizzare metodiche molecolari [28].

L'antibiogramma è indispensabile per definire il profilo di sensibilità degli enterobatteri isolati da campioni clinici ed impostare una terapia definitiva in modo razionale. L'antibiogramma può essere effettuato con vari sistemi, ma è importante tenere presente che l'accuratezza di alcuni sistemi può essere ridotta per il saggio di certi antibiotici, cosa che può assumere particolare rilevanza quando si tratta di ceppi di enterobatteri con fenotipi complessi di multiresistenza, come i CRE, e di farmaci di riserva per questi ceppi. Ad esempio, il **saggio di sensibilità alla colistina** deve essere effettuato mediante metodiche di microdiluizione in brodo perché altri sistemi di saggio non sono accurati. La diffusione in gradiente, in particolare, che è diffusa come test di conferma presso alcuni laboratori diagnostici, tende a

sottostimare la resistenza e a categorizzare come sensibili ceppi resistenti [29]. Analoghi problemi si incontrano con il **saggio di sensibilità alla fosfomicina**, che deve essere effettuato mediante agar-diluzione, che è il metodo di riferimento [30]. Uno studio recente, effettuato con ceppi di isolamento clinico di *K. pneumoniae* MDR produttori di carbapenemasi KPC ha dimostrato una scarsa correlazione tra i risultati relativi alla sensibilità alla fosfomicina ottenuti con il metodo di riferimento e quelli ottenuti con altri metodi (sistemi semiautomatici, microdiluzione in brodo, disco diffusione e diffusione in gradiente) [31].

## **Le metodiche diagnostiche innovative**

Recentemente, alla diagnostica convenzionale si sono affiancate metodiche diagnostiche innovative basate sulla ricerca diretta di molecole di DNA o proteine batteriche nei campioni clinici o negli isolati batterici (diagnostica molecolare) oppure su particolari tecnologie di *imaging*.

La **diagnostica molecolare** rappresenta un'opzione aggiuntiva molto importante nei percorsi diagnostici per le infezioni e le colonizzazioni da enterobatteri multiresistenti e, in particolare da CRE, permettendo di fornire informazioni sulla identificazione e sul profilo di resistenza in tempi significativamente più brevi rispetto alle metodiche convenzionali basate sulla coltivazione batterica e l'antibiogramma fenotipico.

Le indagini molecolari che ricercano regioni specifiche del genoma batterico, basate su tecnologie di amplificazione degli acidi nucleici (nucleic acid amplification technologies, NAAT) possono essere utilizzate sia per l'identificazione batterica a livello di genere o specie (**identificazione molecolare**) sia per la ricerca di determinanti genetici di antibiotico-resistenza. Con

questo approccio, definito spesso **antibiogramma molecolare**, si ricavano informazioni relative a possibili fenotipi di resistenza conferiti dalla presenza dei determinanti genetici di resistenza ricercati in tempi più rapidi rispetto a quelli dell'antibiogramma convenzionale. Le informazioni fornite dall'antibiogramma molecolare, tuttavia, non sono sovrapponibili a quelle dell'antibiogramma convenzionale in quanto la presenza di un gene di resistenza non necessariamente correla con la sua espressione. Inoltre, l'antibiogramma molecolare non fornisce valori di MIC dei vari antibiotici, e si limita a dare informazioni rilevanti essenzialmente sul profilo di resistenza a quegli antibiotici interessati dal meccanismo di resistenza cercato, ma non sul profilo di sensibilità/resistenza ad altri antibiotici [32].

Nonostante questi limiti intrinseci, le tecniche di diagnostica molecolare risultano molto utili per l'identificazione rapida degli enterobatteri multiresistenti e dei loro determinanti di resistenza (in particolare  $\beta$ -lattamasi di vario tipo) sia a partire da ceppi isolati in coltura, sia a partire direttamente da campioni clinici (es. emocoltura positiva o campioni dalle basse vie respiratorie) o da campioni per lo screening dei portatori (es. tamponi rettali). **Nel caso delle emocolture positive**, i sistemi di diagnostica molecolare attualmente disponibili consentono di identificare rapidamente (in 1-2 ore) i principali enterobatteri responsabili di sepsi e i principali tipi di  $\beta$ -lattamasi clinicamente rilevanti (ESBL e carbapenemasi) [33], permettendo una rivalutazione più rapida della terapia empirica che è stata iniziata ai fini dell'appropriatezza terapeutica. Nel caso dei campioni di sorveglianza, i sistemi per la ricerca molecolare dei CRE consentono di avere una informazione sullo stato di colonizzazione in tempi molto più rapidi (entro qualche ora) rispetto alla coltura [34], e di poter gestire le buone pratiche di IPC in modo molto più efficiente. Infatti, la possibilità di escludere rapidamente uno stato di colonizzazione

da CRE permette di evitare di sottoporre a misure di isolamento preventivo tutti i pazienti soggetti allo screening fino a quando non si rendono disponibili i risultati delle colture di sorveglianza, che possono richiedere qualche giorno, consentendo un significativo risparmio sui costi dell'isolamento preventivo.

Alcuni sistemi di diagnostica molecolare sono completamente automatizzati e richiedono una manualità minima per l'allestimento. Questi sistemi si prestano anche ad essere utilizzati per soluzioni *near-patient*, che possono essere utili in strutture sprovviste di un laboratorio diagnostico facilmente accessibile.

Recentemente si sono rese disponibili anche indagini molecolari che ricercano direttamente le principali carbapenemasi prodotte dai ceppi di CRE (KPC, OXA-48, VIM, NDM, IMP), utilizzando tecniche immunocromatografiche. Con queste metodiche è possibile analizzare isolati batterici ma anche emocolture positive, ed avere un risultato nell'arco di pochi minuti e a costi contenuti [35-36].

Tra i sistemi diagnostici innovativi per l'analisi delle emocolture positive vi è anche la *automated time-lapse microscopy* (ATLM), un sistema automatizzato che utilizza metodiche di ibridazione in situ con sonde fluorescenti per l'identificazione dei batteri presenti nell'emocoltura, e un particolare tipo di *imaging* delle singole cellule batteriche presenti nel campione clinico ed esposte ai diversi antibiotici per dedurre la loro attività in termini di concentrazioni minime inibenti nell'arco di 7 ore [37]. La ATLM è un sistema potenzialmente molto utile per accorciare i tempi di risposta nell'analisi delle emocolture positive, restituendo le stesse informazioni delle metodiche diagnostiche convenzionali che potrebbe pertanto sostituire. La reale utilità per la diagnostica delle infezioni da enterobatteri multiresistenti dipenderà dalla possibilità di disporre di pannelli di antibiotici che comprendono anche quelli *last-resort* per i CRE.

Le infezioni da *Enterobacterales* sono tra le infezioni più frequenti sia a livello del torrente ematico che delle vie urinarie ed intra-addominali. Sono causa di riacutizzazione di BPCO e tra le cause più frequenti di infezioni polmonari nosocomiali, comprese le *VAP/IVAC* (*ventilator-associated pneumonia/infections-related ventilator-associated complications*). Tra gli enterobatteri le resistenze sono frequenti. La resistenza alle cefalosporine è mediata dalle *ESBL* e dalle *AmpC*. Il riconoscimento del meccanismo di resistenza può essere molto utile per impostare un'appropriata terapia antibiotica mirata. I carbapenemici sono stati per lungo tempo la terapia più prescritta per il trattamento sia empirico sia mirato di queste infezioni. Le alternative sono stati i *BLIC* ( $\beta$  lactam inhibitor combination), specialmente nell'ottica della strategia *carbapenem-sparing*. Nelle infezioni gravi molti autori hanno messo in dubbio l'efficacia dei BLIC, sia nei casi in cui la terapia non era fatta al meglio dal punto di vista farmacodinamico sia per l'effetto inoculo che può indebolire l'efficacia dei BLIC. Alternative ai classici BLIC, possono essere le nuove combinazioni come ceftazidime-avibactam.

Invece più problematica è la terapia degli enterobatteri produttori di carbapenemasi: tra questi il più frequente, almeno in Italia, è la *KPC*, più rare le carbapenemasi a metallo (Metallo- $\beta$ -lattamasi) e le *OXA-48*. La terapia classica si basava su colistina, tigeciclina e meropenem in caso di MIC inferiori a 16 mg/L, ultimamente l'introduzione del ceftazidime-avibactam ha permesso di avere una terapia con un  $\beta$ -lattamico efficace, almeno per le *KPC* ed *OXA-48*. Poiché gli studi registrativi non hanno contemplato lo studio delle *KPC*, il modo e l'associazione migliore del ceftazidime-avibactam non è ancora ben definita, anche se alcune case-series e studi retrospettivi hanno dato indicazioni preliminari.

Inoltre nella pipe-line ci sono nuove molecole che possono avere uno spazio terapeutico.

Il riconoscimento del fenotipo di resistenza e la terapia più appropriata per gli enterobatteri devono essere parte integrante del bagaglio culturale dei medici che gestiscono le infezioni nel paziente critico.

# ASPETTI PECULIARI SULLE NUOVE ASSOCIAZIONI $\beta$ -LATTAMICO/INIBITORE DELLE $\beta$ -LATTAMASI PER LE INFEZIONI DA ENTEROBACTEREALES MULTIRESISTENTI

## **Ceftolozano/tazobactam**

Ceftolozano/tazobactam (C/T) è la associazione di una nuova cefalosporina con il tazobactam, noto inibitore delle  $\beta$ -lattamasi. Il ceftolozano rappresenta un'evoluzione delle cefalosporine di quarta generazione; quello che la caratterizza principalmente è la presenza in posizione C3 della struttura di-idrotiazinica di un gruppo aminopirazolico in sostituzione del gruppo piridinico del ceftazidime e del gruppo N-metil-pirrolidinico del cefepime. Le caratteristiche strutturali della molecola conferiscono ad essa una potente attività anti *Pseudomonas*. In pratica il ceftolozano può essere considerato come un cefepime potenziato. È appunto la modifica in posizione C3 che conferisce al ceftolozano una grande capacità di penetrazione attraverso i canali porinici dei Gram negativi ed in particolare di *Pseudomonas*. Il tazobactam, storico inibitore suicida delle  $\beta$ -lattamasi protegge il ceftolozano dalla idrolisi delle  $\beta$ -lattamasi di classe A come le TEM, le SHV e le CTX-M. Inoltre la presenza del derivato pirazolico con ammonio quaternario in C3 conferisce alla molecola anche una relativa stabilità nei confronti delle AmpC in *Pseudomonas* [38]. Al pari di tutte le cefalosporine il ceftolozano esercita la sua azione

battericida inibendo la sintesi della parete cellulare del batterio legandosi alle PBP (Penicillin Binding Protein), ma a differenza di molecole come il ceftazidime che si legano solo a 2 PBP il ceftolozano è capace di legarsi addirittura a 4 PBP avvicinandosi molto ai carbapenemici, capaci di legarsi a tutte e 5 le PBP. Tra le PBP ritenute essenziali per la cellula batterica troviamo le PBP1b, PBP1c, PBP2 e le PBP3. Il ceftolozano/tazobactam è il più potente inibitore nei confronti di PBP1b e PBP3. Verso la PBP4 l'affinità del ceftolozano/tazobactam è addirittura 15 volte più bassa rispetto a quella dimostrata dall'imipenem e questo le permette appunto di essere uno scarso induttore di AmpC. Diversi studi hanno valutato l'impatto dell'"overexpression" delle pompe di efflusso (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY) e la riduzione delle porine su ceftolozano/tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa* e tutti in maniera univoca hanno confermato la non influenza di tali meccanismi di resistenza sulla molecola [39-41]. Nei confronti del ceppo wild-type PAO1 di *Pseudomonas* che del suo mucoide (mucA) o ipermutante il ceftolozano/tazobactam si è dimostrato superiore rispetto ad altre molecole antimicrobiche di confronto in termini di attività anti-biofilm all'interno di un setting molto particolare e di difficile trattamento come quello delle infezioni croniche a carico del sistema respiratorio [42]. I ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* produttori di metallo  $\beta$ -lattamasi, di enzimi GES di  $\beta$ -lattamasi ESBL e di OXA sono di fatto resistenti al C/T in quanto il tazobactam non riesce a proteggere la cefalosporina dall'idrolisi di tali enzimi [43]. Altro meccanismo di resistenza acquisita, in *Pseudomonas*, in corso di trattamento è quello legato a mutazioni AmpC-mediate [44] sia strutturali [45, 46] che associate a overexpression di tale enzima [47]. Il maggior meccanismo di resistenza, invece, per ceftolozano/tazobactam negli Enterobatteri è rappresentato dalla produzione di carbapenemasi sia a serina (KPC e GES)

sia metallo- $\beta$ -lattamasi. Dal punto di vista microbiologico C/T è attivo prevalentemente sui Gram negativi inclusi *Pseudomonas aeruginosa* MDR/XDR e *Enterobacteriaceae* ESBL produttori. Una survey Italiana del 2017 su 935 isolati di *Pseudomonas aeruginosa* da infezioni del torrente ematico e dalle basse vie respiratorie con MIC tutte determinate in brodo diluizione ed interpretate secondo i breakpoints EUCAST ha confermato che C/T è la molecola più attiva ad azione anti-*Pseudomonas*. Il 91% dei ceppi era infatti sensibile a C/T seguito da amikacina (88%) e colistina (84,7%). Il 5% di tutti i ceppi campionati (48/935) era resistente al C/T per presenza di geni produttori di carbapenemasi includenti blaVIM (n=32), blaIMP (n=12) e blaGES-5 (n=4) [48]. Castanheira e coll. recentemente hanno pubblicato l'attività di C/T verso isolati di *Pseudomonas aeruginosa* e di *Enterobacteriaceae* collezionati dal tratto respiratorio in pazienti ospedalizzati negli Stati Uniti dal 2013 al 2015. Tutti gli isolati, 1576 *Pseudomonas aeruginosa* e 2.362 *Enterobacteriaceae*, erano testati in brodo diluizione. C/T inibiva il 96,3% dei ceppi vs l'84,8% del cefepime, l'83,5% del ceftazidime, l'80% del meropenem e il 78,6% della piperacillina/tazobactam. Il C/T, inoltre, inibiva l'86,6% dei ceppi MDR di *Pseudomonas aeruginosa* e il 71% di quelli XDR. Nei confronti dell'*Enterobacteriaceae* la molecola presentava, comunque elevate performance di efficacia essendo attiva nel 90,6% seconda solo ai carbapenemici; tra i ceppi ESBL produttori l'efficacia raggiungeva l'82,8% ed addirittura l'84,6% contro i 13 isolati AmpC [49]. Da dati preliminari, comunque, sembrerebbe che l'attività di C/T sulle *Enterobacteriaceae* ESBL produttrici sia specie-dipendente: molto attivo su *E coli*, meno attivo su *Klebsiella pneumoniae* (da valutare in base alla MIC puntuale) e scarsamente attivo verso *Proteus* spp.

C/T è attivo anche nei confronti di Streptococchi B-emolitici (*Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus agalactiae*) e presen-

ta una debole attività anche anti pneumococcica a differenza della totale non attività verso gli stafilococchi [50, 51]. Non è attivo verso la maggior parte degli anaerobi e verso il *Clostridium difficile* [52].

C/T è unicamente somministrabile per via endovenosa: il dosaggio raccomandato per pazienti con clearance della creatinina >50 mL/min è di 1,5 g (1 g ceftolozano/0,5 g tazobactam) ogni 8 ore per un periodo di 4-14 giorni nel caso di infezioni intra-addominali complicate (da usare in associazione con metronidazolo se si sospetta la presenza di patogeni anaerobi) e 7 giorni nel caso di infezione complicata del tratto urinario o pielonefrite acuta. Per clearance stimata della creatinina (CrCL) con la formula di Cockcroft-Gault da 30 a 50 mL/min il dosaggio consigliato è di 750 mg ogni 8 ore mentre al di sotto di 30 mL/min fino a 15 mL/min è di 375 mg ogni 8 ore; in caso di patologia renale end-stage in emodialisi, invece, dopo una dose carico di 750 mg si prosegue con 150 mg ogni 8 ore per tutto il tempo del trattamento con l'accortezza di somministrare il farmaco subito finito il ciclo dialitico. In caso di insufficienza epatica non è prevista nessuna modifica posologica del C/T. Come per tutti i  $\beta$ -lattamici anche per C/T il miglior predittore di efficacia è  $T > MIC$ . Craig e coll in un modello murino neutropenico di infezione hanno trovato che se l'infezione era determinata da *Enterobacteriaceae* non produttrici di ESBL per la stasi si doveva raggiungere un  $T > MIC$  di 26,3%, percentuale che saliva a 31,1% se i ceppi erano, invece, produttori di ESBL [53]. In questo studio, uno dei primi studi che analizzavano la PK del C/T, in *Pseudomonas aeruginosa* la stasi si raggiungeva quando  $T > MIC$  era uguale a 24%. Successivamente MacGowan e coll. su di un modello farmacocinetico di infezione in vitro hanno di fatto confermato i risultati precedentemente pubblicati in 5 ceppi di *E coli*, di cui 2 produttori di CTX-M, e 5 ceppi di *Pseudomonas aeruginosa*:

l'effetto statico in *E coli* a 24 ore si raggiungeva con un  $T > MIC$  del  $27,8\% \pm 5,6\%$ , un caduta di 1-log della carica con un  $T > MIC$  del  $33\% \pm 5,6\%$  e del  $39,6\% \pm 8,5\%$  se si voleva arrivare ad una caduta di 2-log, in *Pseudomonas aeruginosa*, invece, i rispettivi valori erano  $24,9\% \pm 3\%$ ,  $26,6\% \pm 3,9\%$  e  $31,2\% \pm 3,6\%$  [54]. Di solito i valori di  $T > MIC$  per C/T per raggiungere efficacia clinica sono più bassi rispetto a quelli delle altre cefalosporine forse per la maggior attività battericida del ceftolozano [54]. Sempre MacGowan e coll. affermano che il tempo in cui C/T deve stare a concentrazioni superiori alla MIC tra le dosi è molto simile come valore a quello dei carbapenemi a supporto ulteriore di quanto detto sopra. C/T è stato anche testato in un interessante modello farmacocinetico plasma/ELF per valutare il suo potenziale utilizzo nel trattamento delle polmoniti nosocomiali da patogeni Gram negativi come le *Enterobacteriaceae* ESBL produttrici e lo *Pseudomonas aeruginosa*; approssimativamente con un rapporto plasma/ELF del 50% è necessario somministrare un dosaggio doppio di C/T al fine di raggiungere una PTA  $>90\%$  (Probability of Target Attainment) rispetto a quello indicato per le infezioni complicate dell'addome e del tratto urinario. Sono, infatti, necessari 3 g ogni 8 h di C/T per avere una PTA  $>90\%$  di arrivare ad un effetto killing di 1-log per patogeni con una MIC  $\leq 8$  mg/L nell'ELF [55]. Monogue e coll. focalizzando l'attenzione su di una popolazione molto ristretta rappresentata da 20 pazienti adulti affetti da fibrosi cistica ammessi in ospedale per esacerbazione acuta della patologia polmonare trovarono anche loro che C/T a 3 g ogni 8h era ben tollerato e che a tali dosaggi raggiungeva una PTA  $>90\%$  a MIC di 8 mg/L in *Pseudomonas aeruginosa*; interessante notare che nello stesso studio veniva valutato anche il dosaggio classico di 1,5 g ogni 8 ore e che sempre a tale dosaggio per una MIC in *Pseudomonas aeruginosa* fino a 4 mg/L il PTA raggiunto era comunque del 90% [56]. In un'era di

medicina sempre più personalizzata non stupisce affatto quanto affermato da Natesan e coll. in un recentissimo lavoro sulla necessità di ottimizzare al massimo il rapporto PK/PD di C/T in infezione gravi da *Pseudomonas aeruginosa* MDR con MIC variabili da 4 a 32 mg/L. Gli autori usando una simulazione Monte Carlo su di un numero davvero elevato di variazioni di combinazioni di dosaggi, tempi di infusione e funzionalità renale trovano che il dosaggio correntemente indicato di C/T di 1,5 g ogni 8 ore era ottimale anche per MIC fino a 16 mg/L a patto però che il farmaco fosse infuso in 4-5 h e che per MIC di 32 mg/L si dovesse salire di dosaggio fino a 3 g ogni 8 ore sempre infusi in 4-5 ore. Il C/T è stato approvato nel 2014 dall'FDA e nel 2015 dall'EMA per il trattamento delle infezioni complicate intra-addominali (cIAIs complicated intra abdominal infections) e per quelli sempre complicate a carico del tratto urinario (cUTIs complicated urinary tract infections) sulla base di 2 trials randomizzati (ASPECT-cIAI e ASPECT-cUTI). In precedenza Lucasti in un trial prospettico randomizzato di fase II condotto su 112 pazienti ospedalizzati con cIAI aveva dimostrato che il C/T in associazione con il metronidazolo risultava avere un elevato tasso di successo clinico e microbiologico: 83,6% della risposta clinica alla TOC visit in mMITT (*microbiologically modified intent-to-treat*) e 88,7% in ME (*microbiologically evaluable*). Interessante notare che nel trial di Lucasti gli eventi avversi (soprattutto febbre, nausea e incremento degli enzimi epatici) associati al trattamento sono risultati inferiori nel gruppo trattato con ceftolozano/tazobactam (8,5%) rispetto a quello trattato con il comparatore meropenem (33,3%) [57]. Tali dati riguardanti l'efficacia e sicurezza sono poi stati confermati nel trial clinico randomizzato, di non inferiorità, di fase III ASPECT-cIAI (*Assessment of the Safety Profile and Efficacy of Ceftolozano/Tazobactam in Complicated Intra-abdominal Infections*). In realtà in tale trial vengono convo-

gliati 2 trial multicentrici controllati in doppio cieco con arruolamento complessivo di ben 993 pazienti: 487 casi sono stati trattati con C/T in associazione con metronidazolo e 506 casi con meropenem. Il meropenem era dato a 1 g ogni 8 h mentre il braccio C/T più metronidazolo a 1.5 g ogni 8 ore di C/T e 500 mg ogni 8 ore di metronidazolo. La non inferiorità era raggiunta in termini di cura clinica alla TOC visit nei pazienti in MITT *microbiological intent-to-treat* (endpoint primario) nell'83% dei casi verso l'87,1% dei casi del gruppo meropenem e nel 94,2% dei casi nei pazienti in ME *microbiologically evaluable* vs il 94,7% del gruppo comparatore; nel gruppo con infezioni intra-addominali da *Enterobacteriaceae* ESBL produttori, addirittura, il C/T più il metronidazolo raggiungevano una cura clinica dell'95,8% verso l'88,5% del meropenem e del 100% verso il 72,7% nei pazienti affetti da cIAI con CTX-M-14/15, ESBL molto frequente all'interno della popolazione in studio [58]. Miller e coll. in un'analisi *post-hoc* dell'ASPECT-cIAI trial condotta su pazienti in ME con o senza infezione da *Pseudomonas aeruginosa* hanno dimostrato un tasso simile di cura tra C/T più metronidazolo 100% e meropenem 93% nei pazienti infetti ed uno praticamente uguale sul 93% nei pazienti non infetti [59]. Lo studio ASPECT-cUTI (*Assessment of the Safety Profile and Efficacy of Ceftolozane/tazobactam in Complicated Urinary Tract Infections*) ha invece investigato l'efficacia e la sicurezza di ceftolozano/tazobactam rispetto a levofloxacina nei confronti delle infezioni delle vie urinarie complicate, comprese le pielonefriti. Anch'esso è un trial controllato e randomizzato di non inferiorità, con un margine del 10% ed è costituito da 2 trial multicentrici controllati e randomizzati di fase III in cui sono stati arruolati 1.083 pazienti: 543 pazienti trattati con 1,5 gr di ceftolozano/tazobactam ogni 8 ore e 540 pazienti trattati con levofloxacina 750 mg ogni 24 ore, entrambi i gruppi trattati per 7 giorni. Ceftolozano/tazo-

bactam ha dimostrato la non inferiorità rispetto al trattamento con levofloxacina per quanto riguarda il tasso di guarigione definito come il raggiungimento della guarigione clinica unitamente all'eradicazione microbiologica di tutti gli uro-patogeni presenti al baseline. Inoltre, ceftolozano/tazobactam ha mostrato un profilo di superiorità per quanto riguarda l'eradicazione microbiologica delle *Enterobacteriaceae* spp. e un tasso più alto di eradicazione nei pazienti con infezioni sostenute da *Pseudomonas aeruginosa* (85.7% vs 58.3%). Nell'esito composito, eradicazione microbiologica e cura clinica a 5-9 giorni dall'inizio del trattamento, il C/T si è dimostrato sia non inferiore che superiore alla levofloxacina nella popolazione sia mMITT che in quella per protocol [60]. Un'analisi post-hoc dell'ASPECT-cUTI trial condotta su pazienti con almeno al baseline un uro-patogeno resistente alla levofloxacina (26,5% della popolazione totale) dimostrò, in mMITT, una significativa più alta frequenza di successo clinico di C/T 60% verso il solo 39,3% della levofloxacina, il tutto confermato anche nella popolazione ME 64% vs 43,4% [61]. Popejoy e coll su di una analisi condotta, in post-hoc, sui 1.346 pazienti in ME dei 2 trials (ASPECT-cIAI e ASPECT-cUTI) e sui 150 dei 1.346 (11,1%) che avevano al baseline una *Enterobacteriaceae* ESBL produttrice trovarono all'interno di quest'ultimo gruppo una cura clinica pari all'97,4% per C/T (*E. Coli* ESBL 98% - *K. pneumoniae* ESBL 94,4%), 82,6% per levofloxacina e 88,5% per meropenem [62]. Tutti questi dati confermano ancora una volta l'alta performance del farmaco e più precisamente delle nuove associazioni  $\beta$ -lattamico/inibitore delle  $\beta$ -lattamasi nel trattamento delle cIAIs e cUTIs da ceppi di *Enterobacteriaceae* ESBL produttrici offrendo così al clinico una grande opportunità terapeutica in regime *carbapemen-sparing* nel trattamento di tali quadri clinici. In centri appunto dove i ceppi di *Enterobacteriaceae* ESBL produttrici sono endemici appare, oggi, appropriato

proporre una strategia che risparmi o meglio limiti l'utilizzo del carbapenemico con l'intento di limitare da una parte la pressione selettiva imposta dalla molecola e dall'altra il suo recupero [63]. Tuttavia non bisogna dimenticare in tale setting l'utilizzo anche di una penicillina protetta molto efficace come la piperacillina/tazobactam a patto che il suo utilizzo sia legato ad una strategia guidata dalla MIC che deve essere puntuale e testata, come da indicazioni EUCAST, in broddiluizione per ovviare ai frequenti errori di determinazione dei sistemi automatici.

## **Ceftazidime/avibactam**

**Ceftazidime/avibactam è l'associazione di una ben nota cefalosporina di 3<sup>a</sup> generazione con un nuovo inibitore delle  $\beta$ -lattamasi non  $\beta$ -lattamico appartenente alla classe dei diazabiciclo ottani (DBOs).** I DBOs a differenza del tazobactam non sono inibitori suicidi delle  $\beta$ -lattamasi cioè non si legano ad esse in modo irreversibile ma si legano in modo reversibile covalente con la possibilità di rigenerarsi e di attaccare altri siti serinici attivi di altri enzimi [64]. È proprio la riciclaggio dell'inibitore e di conseguenza la sua capacità di mantenere l'attività che caratterizza tali molecole. **Avibactam è molto potente verso le  $\beta$ -lattamasi di classe A (TEM, SHV, CTX-M), le KPC, le AmpC cromosomiche [7], le varianti plasmidiche CMY ed alcune  $\beta$ -lattamasi di classe D come le OXA-48.** Solo pochissime  $\beta$ -lattamasi di classe A non vengono inibite dai DBOs come le TEM-30 e le SHV-10. **Avibactam non è attivo verso le metallo- $\beta$ -lattamasi (MBLs) [65].** La capacità inibente dell'avibactam è molto efficiente in quanto bastano solo 1-5 molecole di avibactam per inibire una sola molecola di  $\beta$ -lattamasi contro le 55-214 di inibitori classici come il tazobactam e l'acido clavulani-

co [66]. Avibactam, però, non migliora l'attività di ceftazidime contro *Acinetobacter* spp, *Burkholderia* spp e verso la maggior parte degli anaerobi [67]. Tra i meccanismi di resistenza troviamo PBPs mutanti o acquisite, ridotta permeabilità della membrana esterna a uno dei due composti, efflusso attivo di uno dei due composti, enzimi  $\beta$ -lattamasi che sono refrattari all'inibizione da avibactam e in grado di idrolizzare ceftazidima. La ridotta attività acquisita di CAZ/AVI in letteratura è attribuita a mutazioni in KPC, come quelle a carico di D179Y (perdita di attività su carbapenemi, pip/taz e aztreonam), T243M (perdita di attività su carbapenemi e pip/taz), 165EL166 (perdita di attività su carbapenemi, pip/taz e aztreonam), e V240G (ridotta attività su meropenem), a mutazioni in OmpK36 (T333N ed inattivazione inserzionale IS5), oppure ad aumentata espressione di KPC (aumento del numero di copie plasmidiche) [68-71]. Farmacocineticamente (PK) il CAZ/AVI è simile al ceftolozane/tazobactam. Nota da tempo è la cinetica del ceftazidime, dopo infusione in 30 min di 1 g, utilizzando un modello bi-compartimentale per descrivere il suo profilo cinetico con una rapida fase di distribuzione, si raggiunge una  $C_{max}$  di circa 100 mg/L ed un volume di distribuzione di 0,3 L/kg [72]. L'aggiunta di avibactam non modifica, in volontari sani, la PK di ceftazidime [73]. **L'eliminazione di CAZ/AVI è prevalentemente renale e necessità di adeguamento posologico in caso di ridotta funzionalità renale: con CrCL tra 31-50 mL/min 1 g/0,25 g ogni 8 h in 2 h, con CrCL tra 16-30 mL/min 0,75 g/0,1875 g ogni 12 ore in 2 ore, con CrCL tra 6-15 mL/min 0,75 g/0,1875 g ogni 24 ore in 2 ore fino ad arrivare a 0,75 g/0,1875 g ogni 48 ore in 2 ore in caso di ESRD inclusa emodialisi.** Ceftazidime viene eliminato praticamente immodificato nelle urine nel soggetto sano tramite filtrazione glomerulare; nelle 24 ore si recupera quasi il 90% della dose. L'eliminazione di avibactam non è solo legata alla filtrazione glomerulare ma

è incrementata anche da un meccanismo di eliminazione attiva tubulare (eliminazione totale molto vicina al 100%). Dopo somministrazione endovenosa di CAZ/AVI la sua emivita ( $t_{1/2}$ ) è di circa 2 ore. Nessun aggiustamento posologico è indicato in caso di compromissione epatica da lieve a moderata. La penetrazione nell'ELF per il ceftazidime è pari al 21% e per l'avibactam al 25-35% [74]; da questi dati preliminari sembra quindi necessaria una valutazione più accurata soprattutto posologica che tenga conto di questa peculiare penetrazione della molecola all'interno del polmone magari ricorrendo anche a modalità di somministrazione diversa che ottimizzi il PK/PD di tale cefalosporina protetta. CAZ/AVI sempre da dati preliminari sembra aver una maggiore capacità penetrativa polmonare e questo grazie al ceftazidime stesso [75]. In Europa il CAZ/AVI è indicato per il trattamento delle seguenti infezioni: infezioni intra-addominali complicate (cIAI), infezioni complicate del tratto urinario (cUTI) inclusa la pielonefrite, la polmonite nosocomiale acquisita (HAP) e quella associata al ventilatore (VAP), oltre le situazioni cliniche a limitate opzioni terapeutiche. L'efficacia di CAZ/AVI più metronidazolo è stata comparata a quella del meropenem in 1.066 pazienti adulti ospedalizzati affetti da infezioni complicate intra-addominali in 2 trials identici di fase III (**RECLAIM 1 e 2**) randomizzati e controllati in doppio cieco (2000 mg/500 mg ogni 8h di CAZ/AVI + 500 mg ogni 8 ore di metronidazolo vs 1000 mg ogni 8 ore di meropenem). CAZ/AVI più metronidazolo erano non inferiori al meropenem nel tasso di guarigione clinica a 28-35 giorni dalla randomizzazione: l'outcome dei pazienti analizzati in mMITT (*microbiologically modified intention-to-treat*) era 81,6% vs 85,1% del comparatore, in MITT (*modified intention-to-treat*) 82,5% vs 84,9% e in CE (*clinically evaluable*) 91,7% vs 92,5% [76]. Da notare che la performance della molecola era analoga sia verso patogeni sensibili a ceftazidime che

non. Il trial di fase III **RECAPTURE** compara, invece, l'efficacia di CAZ/AVI (2000 mg/500 mg ogni 8h) al doripenem (500 mg ogni 8 ore) in 1033 pazienti adulti ospedalizzati affetti da infezioni complicate del tratto urinario incluso le pielonefriti acute (randomizzazione 1:1). La non inferiorità è stata anche in questo caso raggiunta da CAZ/AVI in tutti gli endpoint primari richiesti sia dall'FDA che dall'EMA - *endpoint FDA*: risoluzione sintomatica a 5 giorni 70,2% vs 66,2 del comparatore, combinata risoluzione sintomatica/eradicazione microbiologica al TOC (*Test of cure*: 21-25 giorni dalla randomizzazione) 71,2% vs 64,5%, risposta microbiologica favorevole al TOC 77,4% vs 71%, risoluzione sintomatica al TOC 84,5% vs 86,3% - *endpoint EMA*: risposta microbiologica favorevole al TOC in mMITT 77,4% vs 85,1% del gruppo doripenem [77]. Lo studio di fase III **REPRISE** ha valutato l'efficacia di CAZ/AVI al dosaggio standard nelle cIAI e nelle cUTI sostenute da batteri Gram negativi resistenti al ceftazidime verso la terapia disponibile migliore; nelle cIAI al CAZ/AVI veniva aggiunto il metronidazolo 500 mg ogni 8 ore. L'efficacia di trattamento è risultata simile tra i due gruppi valutando l'endpoint primario costituito dalla risposta clinica al TOC (7-10 giorni dall'ultima somministrazione endovenosa del farmaco in mMITT) 91% vs 91% [78]. Questi dati supportano in maniera forte il ruolo potenziale di utilizzo di CAZ/AVI in alternativa ai carbapenemi nel trattamento di infezioni sostenute da *Enterobacteriaceae* resistenti al ceftazidime. L'indicazione all'utilizzo di CAZ/AVI nelle HAP/VAP è arrivata recentemente dopo la pubblicazione dei dati dello studio di fase III randomizzato, multicentrico, in doppio cieco **REPROVE** il cui obiettivo era quello di valutare l'efficacia di CAZ/AVI (2.000 mg/50 mg ogni 8 ore in 2 ore) rispetto a meropenem (1000 mg ogni 8 ore in 30 minuti) per 7-14 giorni in questo setting specifico di pazienti. L'endpoint primario (cura clinica al TOC - 21-25 giorni dalla randomizzazione)

è stato valutato sia nella popolazione cMITT (*clinically modified intention-to-treat*), cioè in tutti i pazienti che hanno ricevuto il farmaco in studio, che rispondono ai criteri di inclusione e con la conferma microbiologica di avere un Gram negativo a livello delle vie respiratorie, sia nella popolazione CE (*clinically evaluable*), cioè in tutti i pazienti analizzati in cMITT con valutazione clinica effettiva, che non si sono discostati dal protocollo e, soprattutto, che non hanno avuto terapie antibiotiche precedenti. In cMITT i pazienti con CAZ/AVI presentavano un tasso di cura del 68,8% vs il 73% del comparatore, in CE 77,4% vs 78,1% [79]. In definitiva CAZ/AVI non era inferiore al meropenem nel trattamento di polmoniti nosocomiali supportando così un suo potenziale utilizzo in regime di *carbapenem-sparing*. Shields e coll. in uno studio retrospettivo su pazienti con batteriemia da *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi (KPC) hanno trovato che CAZ/AVI era superiore in termini di efficacia a qualsiasi altro regime terapeutico utilizzato: la percentuale di successo clinico a 30 giorni per CAZ/AVI era dell'85% rispetto al 48% dell'associazione carbapenemico/aminoglicoside, al 40% di quella carbapenemico/colistina e al 37% di tutte le altre. La sopravvivenza a 30 giorni era del 92% per il gruppo trattato con CAZ/AVI rispetto a circa il 70% delle altre associazioni [80]. Uno studio multicentrico statunitense condotto su 60 pazienti adulti ricoverati per infezione da CRE (principalmente batteriemie) e che avevano ricevuto CAZ/AVI per almeno 24 ore ha confermato l'ottima performance di tale molecola riportando una mortalità ospedaliera totale del 32%, soprattutto, a carico dei pazienti con polmonite ricoverati in Terapia Intensiva 46% vs 12%; inoltre, fra tutti i pazienti con isolati testati e suscettibili al CAZ/AVI, il 51% presentava eradicazione microbiologica e il 63% successo clinico [81]. Temkin e coll analizzando le cartelle di 36 pazienti con infezione da CRE e 2 da CRPa (*Pseudomonas aeruginosa*) tratta-

ti, in terapia di salvataggio, con CAZ/AVI trovarono anche loro una buona risposta clinica, infatti, nel 73,7% dei casi vi era successo clinico ed eradicazione microbiologica. Dato interessante è che l'eradicazione microbiologica era associata ad una maggiore sopravvivenza: solo il 20% pazienti con eradicazione microbiologica morirono rispetto al 71.4% di chi non l'aveva avuta (P=0,01) [82]. In conclusione i  $\frac{3}{4}$  dei pazienti trattati con CAZ/AVI da solo o in combinazione con altre molecole riuscì a guarire da infezioni da CRE. Significativo è il dato che nel 95% di tali infezioni ogni terapia precedente si era rivelata del tutto inefficace. Il programma di sorveglianza INFORM (*International Network for Optimal Resistance Monitoring*) condotto su 34.062 isolati di *Enterobacteriaceae* collezionati dal 2012 al 2014 in numerosi laboratori sparsi per il mondo trovò che solo 961 (2,8%) di essi era non sensibile al meropenem e che il 97% di tali ceppi era invece suscettibile al CAZ/AVI. **Tutti i ceppi KPC o portatori di  $\beta$ -lattamasi OXA-48-like, sia singolarmente o in associazione a ESBL e/o AmpC erano praticamente sensibili al CAZ/AVI, 98,7% e 98,5% rispettivamente. I ceppi non suscettibili al meropenem nel 94,7% dei casi erano sensibili al CAZ/AVI, solo una minima parte di loro era resistente a quest'ultimo per presenza di metallo enzimi** [83]. Marshall e coll. hanno testato il CAZ/AVI unitamente all'Aztreonam (ATM) su 21 isolati di *Enterobacteriaceae* produttori di metallo- $\beta$ -lattamasi *in vitro* e *in vivo* utilizzando un modello murino di infezione. Tutti gli isolati erano resistenti al CAZ/AVI e 19/21 lo erano anche all'aztreonam. L'attività *in vitro* di CAZ/AVI in combinazione con ATM era presente in 17 isolati su 21; tutti gli isolati presentavano, in agar diluizione, una riduzione delle MIC del CAZ/AVI una volta aggiunto ATM e a 2 ore, in tutti gli isolati, si assisteva ad una riduzione della carica batterica  $\geq 4\text{-log}_{10}\text{-CFU}$  con l'aggiunta di ATM (8  $\mu\text{g/mL}$ ) rispetto al solo CAZ/AVI. Questo apre la strada a futu-

ri impieghi di tale associazione nel trattamento di infezioni così complesse come quelle, appunto, determinate da *Enterobacteriaceae* MBL produttrici [84]. Questo **effetto sinergico tra CAZ/AVI e ATM** è stato confermato anche in 2 reports contro patogeni Gram negativi produttori di MBL anche se i ceppi valutati sono veramente pochi [85, 86]. Jayol e coll. recentemente hanno testato l'efficacia di CAZ/AVI e ATM da solo o in combinazione su 15 ceppi produttori di MBL. Su 15 ceppi solo 1 era suscettibile a ATM, la resistenza ad aztreonam di solito è dovuta alla presenza di ESBL che idrolizzano il farmaco rendendolo inefficace. Tutti gli isolati presentavano, inoltre, un alto livello di resistenza a CAZ/AVI con MIC  $\geq 256$  mg/L. In combinazione CAZ/AVI più ATM diventavano in tutti i ceppi sinergici con MIC  $< 2$  mg/L. Gli autori concludono che **CAZ/AVI più ATM rappresenta un'efficace opzione terapeutica nel trattamento di infezioni da *Klebsiella pneumoniae* KPC, OXA-48-like e/o Colistino resistente** [87]. Il recupero di efficacia sembra dovuto al fatto che avibactam neutralizza l'attività delle ESBL su ATM permettendo a quest'ultimo di recuperare il suo effetto sulle metallo- $\beta$ -lattamasi [88]. Grande dibattito attualmente c'è all'interno della comunità scientifica sulla scelta di utilizzare CAZ/AVI in monoterapia oppure in associazione ad altre molecole nel trattamento di infezioni da KPC. La maggior parte degli esperti consiglia attualmente di associare il CAZ/AVI ad un altro antibiotico per ridurre il rischio di acquisire resistenze al farmaco. **Nella nostra esperienza preferiamo associare il CAZ/AVI in prima scelta a FOSFOMICINA ovviamente testata in agar diluizione**, procedura questa al momento però eseguibile solo in pochissimi laboratori di microbiologia nonostante sia il metodo di riferimento riconosciuto da EUCAST, **oppure a GENTAMICINA**. In seconda scelta l'associazione da noi proposta include una delle seguenti molecole: colistina, meropenem, tigeciclina e **trime-**

**toprim/sulfametossazolo in caso di ceppi ST101 che in genere risultano sensibili al SXT.**

Van Duin e coll. hanno recentemente pubblicato i dati derivanti da uno studio multicentrico osservazionale prospettico che ha confrontato CAZ/AVI verso colistina su pazienti infetti da CRE (>95% *Klebsiella pneumoniae* KPC) selezionati all'interno del CRACKLE (Consortium on Resistance Against Carbapenems in *Klebsiella* and other *Enterobacteriaceae*): 38 pazienti avevano ricevuto in prima battuta CAZ/AVI (39% BSI e 24% HAP) e 99 colistina (48% BSI e 21% HAP), il gruppo CAZ/AVI nel 63% dei casi la terapia era in combinazione con altre molecole anti-CRE contro il 94% del gruppo colistina [89]. La mortalità aggiustata a 30 giorni del gruppo CAZ/AVI era del 9% vs il 32% di quella del competitor. A 30 giorni i pazienti trattati con CAZ/AVI avevano una probabilità di outcome migliore pari al 64%. Ovviamente aspettiamo studi randomizzati in merito ma è fuori dubbio che il CAZ/AVI rappresenta attualmente un'ottima alternativa alla colistina. Le molecole più frequentemente associate a CAZ/AVI erano le seguenti: tigeciclina in 12/38 pazienti, amikacina in 6/38, gentamicina in 12/38, carbapenemi in 11/38, fosfomicina in solo 1 paziente e TMP/SMX in 4/38. Di fatto tale studio riporta la superiorità di CAZ/AVI su colistina nel trattamento iniziale di infezioni causate da *Klebsiella pneumoniae* produttrice di carbapenemasi. Interessante notare che in alcuni casi di acquisizione di resistenza in corso di terapia con CAZ/AVI, soprattutto legata a mutazioni a carico del gene blaKPC-3, il meropenem aggiunto in terapia combo potrebbe riacquisire la sua efficacia come se fosse rigenerato da tale mutazione [24, 70]. Rodríguez-Baño e coll. hanno appena pubblicato una bella review sul trattamento delle infezioni causate da *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL, AmpC e Carbapenemasi e a proposito di CAZ/AVI concludono affermando che malgrado ci sia la necessità di ulteriori dati già da

ora il farmaco rappresenta il “keystone” terapeutico in caso di infezioni sostenute da ceppi di *Enterobacteriaceae* produttrici di KPC e OXA-48 [88]. Nonostante questo, però, Shields e coll. riportano l’attenzione sulla necessità di selezionare bene i pazienti perché le performance di CAZ/AVI potrebbero non essere uguali al variare del sito di infezione [90]. Gli autori riportano un tasso di guarigione, su 77 infezioni da CRE, più basso in caso di polmoniti 36% vs il 75% di quello riscontrato nelle BSI e l’88% nelle infezioni del tratto urinario. In analisi multivariata la polmonite e le metodiche di sostituzione renale (RRT) erano associate a maggior fallimento terapeutico. La mancata eradicazione microbiologica si aveva nel 32% dei casi e la stessa polmonite veniva ritenuta predittore indipendente di tale evento. Sempre in tale casistica l’acquisizione di resistenza in corso di terapia con CAZ/AVI era pari al 10% e, come indicato precedentemente, riguardava praticamente nella totalità dei casi varianti enzimatiche KPC-3. La maggior parte di questi pazienti riceveva CAZ/AVI in monoterapia 69% rispetto al solo 31% che lo riceveva in associazione ad altre molecole: dato interessante che andrà valutato successivamente è che la percentuale di successo clinico non variava tra i due gruppi, affermazione questa in contrasto con quanto riportato in letteratura [91-93].

## **Meropenem/Vaborbactam**

Meropenem/Vaborbactam è una combinazione tra un noto carbapenemico e un nuovo inibitore delle  $\beta$ -lattamasi non  $\beta$ -lattamico derivato dall’acido boronico chiamato appunto **vaborbactam** (RPX7009). Il vaborbactam inibisce le  $\beta$ -lattamasi a serina di classe A e quelle di classe C (AmpC, CMY, P99, MIR, FOX), incluso KPC, IMI, SME, NMC-A, BKC-1 e FR-1 [94, 95]. Caratte-

ristica di tale inibitore è che non possiede alcuna attività antibatterica se somministrato da solo [96], inoltre, non inibisce le carbapenemasi di classe D e B. Il vaborbactam ha la capacità di recuperare il meropenem e l'associazione con tale molecola è risultata essere la più potente in termini di attività verso ceppi produttori di KPC tra tutte quelle testate [97]. Il vaborbactam attraversa la membrana esterna del batterio principalmente tramite 2 porte poriniche *OmpK35* e *OmpK36* con quest'ultima preferita tra le due. Le pompe di efflusso *AcrAB-TolC* hanno un basso impatto sull'attività di vaborbactam essendo quest'ultimo abbastanza indifferente alla loro azione [97]. La potenza inibitoria di vaborbactam rimane inalterata sia verso ceppi che producono KPC-2 o KPC-3. Tra i principali meccanismi di resistenza all'azione del vaborbactam troviamo mutazioni funzionali delle 2 porine citate sopra, tuttavia, vaborbactam, a differenza del meropenem che utilizza per attraversare la membrana esterna entrambe le porte poriniche, predilige come via preferenziale di ingresso, come già detto sopra, l'*OmpK36*. È stato descritto che ceppi di *Klebsiella pneumoniae* con varianti di *OmpK36* da duplicazione di due aminoacidi, Gly134 e Asp135 (**GD repeat**), diventano, di fatto, resistenti al vaborbactam che diventa non più capace di attraversare tale porta porinica perché una volta mutata diventa un canale più ristretto [98-100]. Sun e coll. recentemente hanno pubblicato uno studio che si poneva come obiettivo quello di identificare la concentrazione ottimale di meropenem/vaborbactam per prevenire eventuali mutazioni *single-step* che portano a riduzione di attività di tale combinazione. 17 ceppi di *Klebsiella pneumoniae* KPC con diversi gradi di sensibilità al meropenem (MICs da 8 a 512 µg/mL) e al meropenem/vaborbactam (MICs da ≤0,06 a 32 µg/mL) e con pre-esistenti meccanismi di resistenza erano selezionati da una collezione mondiale. Il meropenem e il vaborbactam ad una

concentrazione di 8 µg/ml ciascuno era in grado nel 77,8% dei ceppi di sopprimere mutanti capaci di resistere alla combinazione in esame, salendo a 16 µg/ml l'inibizione di tali ceppi arrivava al 100%. A concentrazioni inferiori si osservava la comparsa di ceppi mutanti capaci di resistere al meropenem/vaborbactam per inattivazione *OmpK36* o per incremento numerico delle copie geniche *bla<sub>KPC</sub>*. La resistenza, quindi, può essere prevenuta ottimizzando il dosaggio di meropenem/vaborbactam [101]. Castanheira e coll. testando meropenem/vaborbactam su di una collezione di 10.426 *Enterobacteriaceae* provenienti da tutto il mondo hanno trovato che tale associazione (MIC<sub>50/90</sub> 0,03/1 e 0,03/0,12 rispettivamente) inibiva il 99,1 e il 99,3% di tutti gli isolati a ≤1 e ≤2 µg/ml. In tale serie l'attività di meropenem/vaborbactam era simile a quella del carbapenemico da solo in *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Stenotrophomonas maltophilia* [102]. Hackel e coll., ancora più recentemente, su 991 isolati di *Enterobacteriaceae* KPC positivi del 2015 trovarono che il 99% degli isolati aveva una MIC per il meropenem/vaborbactam ≤4 µg/ml. Le MIC<sub>50</sub> e le MIC<sub>90</sub> di meropenem/vaborbactam su tutta la collezione di *Enterobacteriaceae* erano 0,06 e 1 µg/ml rispettivamente, in pratica 512 volte e 64 volte più basse di quelle del meropenem da solo. Interessante notare che le MIC<sub>50</sub> e le MIC<sub>90</sub> in *Klebsiella pneumoniae*, 0,12 µg/ml e 1 µg/ml rispettivamente, erano più di 4 volte e da 4 a 32 volte superiori a quelle riscontrate in *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp, *Klebsiella oxytoca* e *Citrobacter* spp. Solo *Serratia* spp presentava valori di MIC sovrapponibili a quelli di *Klebsiella pneumoniae*. La percentuale dei ceppi sensibili al meropenem/vaborbactam 99% era superiore a quella di ceftazidime/avibactam 98,2% e a quella di tigeciclina 95,8%. Sulla base delle MIC<sub>90</sub> meropenem/vaborbactam (MIC<sub>90</sub> 1 µg/ml) era 4 volte più potente di ceftazidime/avibactam e più di 64 volte più potente

di meropenem da solo. Degno di nota è la differenza riportata in termini di suscettibilità al meropenem/vaborbactam tra le varianti di KPC considerate all'interno di tale collezione; il 7% degli isolati KPC-2 presentava MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  rispetto al 5,6% degli isolati KPC-3, il 2,6% degli isolati KPC-2 presentava MIC  $\geq 4$   $\mu\text{g/ml}$  rispetto al 2,4% degli isolati KPC-3. Gli autori affermavano anche che la differenza riportata in letteratura tra le resistenze a meropenem/vaborbactam e ceftazidime/avibactam era dovuta al fatto che meropenem/vaborbactam inibisce KPC-2 non coinvolgendo S130, residuo invece importante per il meccanismo di inibizione di avibactam [103]. Pfaller e coll. su di una collezione di *Enterobacteriaceae* di quasi 12.000 ceppi includente 330 fenotipi resistenti al carbapenemico hanno confermato l'ottima performance di meropenem/vaborbactam. Su 209 (63,3% CRE) isolati portatori di  $\text{bla}_{\text{KPC}}$  includenti geni KPC-2 (90 isolati), KPC-3 (117 isolati) e KPC-17 (2) l'attività inibitoria di meropenem/vaborbactam raggiungeva il 99,3% al breakpoint di sensibilità FDA  $\leq 4/8$   $\mu\text{g/ml}$  [104]. Meropenem/vaborbactam è stato recentemente approvato dall'FDA per il trattamento di infezioni complicate del tratto urinario includenti la pielonefrite acuta sostenute da *Enterobacteriaceae* sensibili al farmaco. A supporto di tale indicazione è stato pubblicato, di recente, un trial multicentrico di fase III randomizzato e controllato (**TANGO I**) [105]: con una randomizzazione 1:1 sono stati arruolati 550 pazienti affetti da cUTI e suddivisi in due bracci, uno ricevente meropenem/vaborbactam (2 g/2 g ogni 8 h n=274) ed uno piperacillina/tazobactam (4 g/0,5 g in 30 minuti ogni 8 ore n=276). L'endpoint composito primario FDA (cura o miglioramento clinico e eradicazione microbiologica) a fine trattamento endovenoso nella popolazione analizzata in mITT si raggiungeva nel 98,4% dei casi all'interno del gruppo meropenem/vaborbactam contro il 94% del comparatore ( $P < 0,001$  di non inferiorità raggiunta). Gli

endpoint primari EMA (eradicazione microbiologica alla TOC visit in mMITT e nella popolazione microbiologicamente valutabile) si raggiungevano nel 66,7% del gruppo meropenem/vaborbactam contro il 57,7% di piperacillina/tazobactam ( $P < 0,001$  di non inferiorità) e nel 66,3% contro il 60,4% rispettivamente ( $P < 0,001$  di non inferiorità). Tra i limiti principali di tale studio da evidenziare il fatto che piperacillina/tazobactam non è mai stata somministrata in infusione continua e che l'uso di meropenem/vaborbactam non era valutato per patogeni resistenti ai carbapenemi essendo non etico il confronto con la penicillina protetta. Inoltre il vero comparatore sarebbe stato meropenem e non piperacillina/tazobactam che ha uno spettro di azione differente anche se simile ai carbapenemici. **TANGO II**, invece, primo trial prospettico comparativo confronta meropenem/vaborbactam in monoterapia in infezioni da CRE, certe o sospette, con la miglior terapia ad oggi disponibile (*BAT Best Available Therapy*) [106]. Tra le infezioni considerate troviamo *cUTI* incluso pielonefrite acuta, *HABP/VABP*, batteriemie e *cIAI*. Gli endpoint differiscono in base al tipo di infezione: percentuale di successo clinico (cura clinica + eradicazione microbiologica) nelle *cUTI/AP (Acute pyelonephritis)*, mortalità a 28 giorni nelle *HABP/VABP* e batteriemia, cura clinica nelle *cIAI*. La *BAT* era rappresentata dai seguenti farmaci somministrati in monoterapia o in terapia di associazione: carbapenemico, aminoglicoside, polimixina B, colistina, tigeciclina o ceftazidime/avibactam con quest'ultimo solo e sempre in monoterapia. Al momento sono disponibili solo dati preliminari e solo rappresentati in modo descrittivo non statistico. Nelle batteriemie e nelle *HABP/VABP* la mortalità a 28 giorni nel gruppo meropenem/vaborbactam era pari al 25% contro il 44,4% di quella del gruppo *BAT*; nelle *cUTI* la percentuale di successo a fine terapia (EOT) era pari al 72,7% nel gruppo meropenem/vaborbactam contro il 50% del gruppo compa-

ratore e al TOC (EOT + 7 giorni) 42,9% contro 50%. Questi primi dati rafforzerebbero il ruolo di meropenem/vaborbactam nel trattamento di infezioni da CRE. Inoltre questo studio è un modo più concreto di studiare i nuovi antibiotici, più che per sindromi, il farmaco viene studiato per patogeno, infatti, così poi eviterebbe i numerosi usi off-label che sono propri dei nuovi antibiotici introdotti recentemente nella pratica clinica.

## **Imipenem/Relebactam**

Il Relebactam (MK-7655) è un inibitore delle  $\beta$ -lattamasi di classe A e C correntemente in fase di sviluppo in combinazione con l'imipenem/cilastatina. **Imipenem/relebactam** ha completato con successo già 2 trials clinici di fase II per il trattamento delle cIAI e delle cUTI (nr registrazione trial **NCT01506271** e **NCT01505634**). Nel primo 351 pazienti adulti con cIAI venivano randomizzati per ricevere Imipenem (IMI) 500 mg + Relebactam (REL) 250 mg ogni 6 h, Imipenem (IMI) 500 mg + Relebactam (REL) 125 mg ogni 6 h e placebo, il tutto per una durata di 4-14 giorni. L'endpoint primario era la percentuale di pazienti microbiologicamente valutabili (ME) con risposta clinica favorevole alla fine del ciclo terapeutico (DCIV *discontinuation of IV therapy*) [107]. La risposta clinica favorevole al DCIV era del tutto sovrapponibile per il gruppo IMI/REL (250 mg) e IMI/REL (125 mg) 96,3% vs 98,8% e veniva raggiunta anche la non inferiorità rispetto ad Imipenem da solo (95,2%). Simulazioni PK/PD, inoltre, dimostravano che IMI 500 mg + REL 250 mg somministrati ogni 6h provvedevano ad una copertura >90% dei ceppi resistenti al carbapenemico confermando il fatto che REL ha la capacità di ripristinare la sensibilità di imipenem. Nel secondo 300 pazienti adulti (100 per gruppo) con cUTI, inclusa la pielonefrite acuta,

venivano randomizzati per ricevere IMI/REL 250 mg, IMI/REL 125 mg o solo IMI. La durata del trattamento era di 4-14 giorni con la possibilità di *step-down* a ciprofloxacina orale. L'endpoint primario era l'eradicazione microbiologica alla DCIV nella popolazione microbiologicamente valutabile. La risposta microbiologica favorevole nei tre gruppi risultava essere 95,5% 98,6% e 98,7% rispettivamente. Tutti i 23 pazienti ME con patogeni resistenti all'imipenem presentavano un esito favorevole al DCIV. IMI/REL con l'inibitore sia a 250 mg che a 125 mg risultò essere non inferiore al solo imipenem nel trattamento delle cUTI [108]. Livermore e coll. hanno riportato in *Pseudomonas aeruginosa* che relebactam ad una concentrazione di 4 µg/ml era in grado di abbassare la MIC in isolati imipenem-sensibili da 1-2 µg/ml a 0,25-0,5 µg/ml, in isolati con deficit dei canali porinici non produttori di metallo β-lattamasi da 16-64 µg/ml a 1-4 µg/ml, in isolati In resistenti all'imipenem con derepressione di AmpC da 2-32 µg/ml a 0,5-4 µg/ml [109]. Anche Lapuebla e coll. testando oltre 400 isolati di *Pseudomonas aeruginosa* evidenziarono un netto decremento di MIC aggiungendo relebactam ad imipenem [110]. Lo stesso decremento di MICs per imipenem è riportato, sempre aggiungendo una concentrazione di 4 µg/ml di relebactam, anche su isolati di *Enterobacteriaceae* produttrici di KPC; in tali isolati sempre Livermore e coll trovarono un calo di MIC da 16-64 µg/ml a 0,12-1 µg/ml. Recentemente Lob e coll. hanno valutato l'attività *in vitro* di imipenem/relebactam su di un'ampia collezione di patogeni Gram negativi ESKAPE (*Klebsiella pneumoniae* nr=689, *Acinetobacter baumannii* nr=72, *Pseudomonas aeruginosa* nr=845, *Enterobacter* spp nr=399) all'interno del programma di sorveglianza SMART (*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*). Il Relebactam era testato alla concentrazione di 4 µg/ml in combinazione ad una doppia diluizione di imipenem. La suscettibilità di IMI/REL e di imipenem da solo in *Pseudomonas* era pari al 94,2%

e 70,3%, in *Klebsiella pneumoniae* 99% e 96,1%, in *Enterobacter* spp 100% e 98% [109]. Rispettivamente REL restituitiva la sensibilità ad imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* rispettivamente dell'80,5%, del 74,1% e del 100%. Lo studio di Lob conferma anche il dato noto dell'inefficacia di tale associazione su *Acinetobacter baumannii* in termini di recupero si sensibilità di imipenem [111]. In un interessantissimo lavoro pubblicato a fine 2017 viene valutata l'efficacia di imipenem, IMI/REL, ceftazidime e CAZ/AVI su 100 isolati di CRE, di cui la maggior parte erano *Klebsiella pneumoniae* produttrici di KPC; inoltre, 46 isolati su 100 erano anche produttori di ESBL. L'aggiunta di REL incrementava la sensibilità all'imipenem dall'8 all'88%, l'aggiunta di avibactam a ceftazidime da 0 a 85%. Solo CAZ/AVI e no IMI/REL era attivo su produttori OXA-48-like. IMI/REL, però, era attivo sugli isolati resistenti al CAZ/AVI che possedevano la variante KPC-3. Nessuna delle due associazioni risultò essere attiva contro le metallo-carbapenemasi [112]. Nel lavoro veniva confermato ancora una volta che sia per IMI/REL che CAZ/AVI il tallone di Achille era rappresentato dalla impermeabilità acquisita della membrana esterna del patogeno da mutazioni dei canali porinici a carico soprattutto di *OmpK36*. In conclusione imipenem/relebactam e ceftazidime/avibactam avevano una sovrapposizione di spettro di attività ma con nicchie nelle quali ciascuno era superiore all'altro. Goldstein e coll. hanno comparato l'attività in vitro di relebactam e imipenem con quella di sei comparatori (amp/sulbactam, piperacillina/tazobactam, metronidazolo, tigeciclina, moxifloxacina e clindamicina) su 432 ceppi di anaerobi di cui 13 *Bacteroides fragilis* con ridotta sensibilità all'imipenem. In quasi tutti i ceppi la MIC del relebactam da solo era  $\geq 32$   $\mu\text{g/ml}$ ; in pratica relebactam non aggiungeva nulla all'attività di imipenem sugli anaerobi [113]. Tuttavia proprio per l'alta performance dell'imipenem verso gli anaerobi IMI/REL presenta

una eccellente attività nei confronti degli anaerobi. In uno studio di fase I IMI/REL è stata studiata la farmacocinetica intrapolmonare di tale combinazione su 16 volontari sani al dosaggio di 500 mg/250 mg ogni 6 h per 5 volte a 0,5, 1, 1,5 e a 3 ore dall'ultima dose. Ad ogni punto temporale venivano assegnati 4 volontari sani e su questi veniva eseguita una fibrobroncoscopia con relativo bronco lavaggio. L'esposizione nell'ELF (Epithelial lining fluid) dopo aggiustamento per capacità di legame alle proteine risultò essere pari al 54% di quella plasmatica per relebactam e al 55% per imipenem [114]. Tali risultati supportano future indicazioni di IMI/REL nel trattamento delle polmoniti batteriche da patogeni suscettibili.

## **Aztreonam/Avibactam**

Aztreonam è l'unico  $\beta$ -lattamico insensibile all'idrolisi delle metallo- $\beta$ -lattamasi ma sfortunatamente la maggior parte dei ceppi produttori di  $\beta$ -lattamasi di classe B co-producono anche  $\beta$ -lattamasi come AmpC, CTX-M e CMY che degradano l'aztreonam stesso. Avibactam, inattivo sulle metallo- $\beta$ -lattamasi, inibisce, invece, la maggior parte di questi enzimi idrolizzanti; ciò fa sì che l'associazione tra queste due molecole (**aztreonam/avibactam**) potrebbe offrire un'eccellente opportunità terapeutica contro ceppi produttori di metallo- $\beta$ -lattamasi coprendo, così, in modo del tutto efficace tale vuoto terapeutico [115, 116]. Crandon e coll. valutando, su di un modello murino di infezione, l'efficacia di dosi simulanti quelle umane di aztreonam da solo o in associazione con avibactam (aztreonam 2 gr ogni 6 ore in 1 ora + 375 o 600 mg di avibactam ogni 6 ore in 1 ora) su 14 isolati di *Enterobacteriaceae* e 13 di *Pseudomonas aeruginosa*, di cui 25 produttori di metallo- $\beta$ -lattamasi, dimostrarono che la com-

binazione aztreonam/avibactam era efficace in tutti i 14 isolati di *Enterobacteriaceae* con un netto abbattimento delle MIC iniziali (aztreonam/avibactam MIC  $\leq 16 \mu\text{g/ml}$ ) e il raggiungimento completo del target terapeutico ( $fT > MIC \geq 65\%$ ). Interessante notare che non si osservava alcuna differenza tra le due diverse concentrazioni di avibactam. In *Pseudomonas*, sia in isolati immunocompetenti che no, invece, l'attività predittibile farmacodinamicamente si osservava solo con MICs  $\leq 16 \mu\text{g/ml}$  mentre diveniva variabile da ceppo a ceppo con MICs  $\geq 32 \mu\text{g/ml}$  [116]. L'attività in vitro di aztreonam/avibactam è stata testata su di un'ampia collezione di isolati (28.501) proveniente da tutto il mondo. I valori di MIC<sub>90</sub> dell'aztreonam e della sua associazione con l'avibactam in tutti gli isolati delle *Enterobacteriaceae* (23.516) presentavano un range che andava da 64 a 0,12  $\mu\text{g/ml}$ ; il 76,2% degli isolati era inibito da  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  di aztreonam (breakpoint CLSI) rispetto al 99% che era inibito da  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  di aztreonam/avibactam ad una concentrazione fissa di quest'ultimo di 4  $\mu\text{g/ml}$ . In *Pseudomonas* la MIC<sub>90</sub> era ugualmente 32 sia per aztreonam da solo che in associazione [117]. Nessuna attività era vista nei confronti di isolati di *Acinetobacter baumannii*. Più del 99% delle *Enterobacteriaceae* produttrici di metallo- $\beta$ -lattamasi (IMP, VIM, NDM) e di diverse altre  $\beta$ -lattamasi a serina erano inibiti da una concentrazione  $\leq 4 \mu\text{g/ml}$  di aztreonam/avibactam confermando ancora una volta le potenzialità di tale associazione terapeutica. Vasoo e coll. sempre lo stesso anno hanno valutato l'attività di **aztreonam/avibactam** su 177 isolati di bacilli Gram negativi produttori di carbapenemasi (108 KPC, 32 NDM, 11 IMP, 8 OXA-48, 4 OXA-181, 2 OXA-232, 5 IMI, 4 VIM e 3 SME). Aztreonam era attivo verso tutti gli isolati con la sola eccezione di 2 ceppi NDM. Ceftazidime/avibactam valutato sulla stessa serie era attivo verso tutti i ceppi KPC, IMI, SME e la maggior parte di quelli OXA-48 ma risultava ancora una volta completamente

scoperto verso le metallo- $\beta$ -lattamasi. Tra i competitor i più attivi risultarono essere la colistina, la tigeciclina e la fosfomicina - percentuale rispettiva di suscettibilità 88%, 79%, 78% [118]. Sempre su di un'ampia collezione, proveniente da tutto il mondo, di ceppi di *Enterobacteriaceae* e di *Pseudomonas aeruginosa* resistenti ai carbapenemi gli unici agenti che mantenevano un'efficacia elevata in vitro nei confronti di isolati co-produttori di KPC e di altre  $\beta$ -lattamasi erano ceftazidime/avibactam (MIC<sub>90</sub> 4  $\mu$ g/ml), aztreonam/avibactam (MIC<sub>90</sub> 0,5  $\mu$ g/ml) e tigeciclina (MIC<sub>90</sub> 2  $\mu$ g/ml); colistina, invece, era la più attiva in vitro verso *Pseudomonas aeruginosa* carba R [119].

## TERAPIA DELLE ESBL: TRA EVIDENZE ED EPIDEMIOLOGIA LOCALE

Le infezioni da *ESBL* stanno aumentando in modo inesorabile anche in Italia, negli ultimi 10 anni l'incidenza di batteriemia da *Enterobacterales ESBL* è passata da 0,5 casi per 1.000 ricoveri nel 2007 a Roma [120] a 7,4 casi per 1.000 ricoveri a Firenze dal 2013 al 2015, con un incremento di circa 15 volte [121]. Le infezioni da *Enterobacterales ESBL* sono tipicamente infezioni nosocomiali, ma, in paesi come l'Italia possono essere frequenti anche in comunità e possono colpire tutte le classi di età anche se i soggetti più colpiti rimangono quelli più fragili e specialmente gli anziani. Le infezioni da *Enterobacterales* produttrici di *ESBL* sono, infatti, frequenti tra gli anziani; analizzando le varie casistiche, riportate in letteratura, si evince che l'età media dei pazienti con infezioni da *ESBL* è appunto elevata, e a tal riguardo, è indubbiamente degno di nota il fatto che in alcune casistiche italiane le età medie riportate sono tra le più alte (Tabella 1).

**Tabella 1**

Autore	Età media anni $\pm$ DS	Riferimento bibliografico
Meini	82 $\pm$ 10	[121]
De Rosa	63,5 $\pm$ 17,4	[122]
Tumbarello	54 $\pm$ 19	[120]
Chopra	66 $\pm$ 15	[123]
Tamma	48 $\pm$ 20	[124]

Fino ad oggi un solo studio randomizzato comparativo è stato effettuato nelle infezioni da *ESBL*, in particolare nelle infezioni da *E. coli* e *Klebsiella* spp resistenti alle cefalosporine [125]. Tale studio comparativo tra piperacillina/tazobactam e meropenem è stato interrotto prematuramente per manifesta superiorità del meropenem. Tuttavia appena pubblicato tale studio ha fatto emergere diversi dubbi. Il primo è che la somministrazione di piperacillina/tazobactam può non essere stata adeguata. Il secondo è che lo studio è stato disegnato in un modo che a nostro parere ha reso lo studio difficilmente comparabile, infatti, i pazienti che venivano randomizzati, iniziavano terapia antibiotica a giudizio del medico curante e al terzo giorno solamente venivano attribuiti al braccio piperacillina/tazobactam o meropenem. Questo ha comportato una eterogeneità di trattamento nei primi tre giorni (che sono quelli dove avviene la maggior parte degli esiti infausti nelle infezioni gravi) che non è stato possibile normalizzare ed analizzare statisticamente. Il terzo, forse il più importante a nostro avviso, è che le MIC della piperacillina/tazobactam sono state eseguite con l'Ettest, metodo non certo di riferimento per tale molecola; in questo modo si introduce un ulteriore importante bias. È molto probabile che il meropenem sia superiore alla piperacillina/tazobactam nei confronti delle *Enterobacteriales* *ESBL* produttrici ma molto probabilmente tale differenza, a MIC<4 per piperacillina/tazobactam in broddodiluzione, è meno significativa di quella riportata nello studio **MERINO**.

I carbapenemici sono sicuramente più efficaci delle cefalosporine (le *ESBL* scindono le cefalosporine tranne cefoxitin e molecole correlate), dei chinoloni e degli aminoglicosidi in caso di infezioni batteriemiche da *ESBL*; come si rileva da una meta-analisi basata su 21 studi osservazionali pubblicata nel 2012 [126]. Questa supremazia si perde nei casi pediatrici ma i dati sono veramente scarsi [127].

I carbapenemici dovrebbero essere tutti uguali per l'attività anti-ESBL, anche se in uno studio, facendo una sub-analisi per i pazienti con sepsi grave o shock settico, vi era un trend verso un aumento di mortalità per ertapenem [128]. Ertapenem alla dose di 1 g die potrebbe essere meno efficace nelle VAP da ESBL specialmente se la MIC del germe è intorno a 1 mg/L (categoria di sensibilità intermedia), in questi casi ertapenem potrebbe essere battericida solo con dosi maggiori di quelle in label di 1 g die [129]. Inoltre ertapenem selezionerebbe con meno frequenza la colonizzazione da *P. aeruginosa* MDR ed *Acinetobacter* MDR ma sarebbe invece efficace nel selezionare la colonizzazione da *Klebsiella pneumoniae* KPC.

Tumbarello e coll. analizzando retrospettivamente una coorte di 186 pazienti adulti affetti da BSI da *Enterobacterales* produttrici di ESBL (104 *E coli*, 58 *Klebsielle pneumoniae* e 24 *Proteus mirabilis*) hanno dimostrato che una terapia iniziale inadeguata era gravata da maggiore mortalità (odds ratio [OR] 6,28; 95% confidence interval [CI] 3,18 to 12,42;  $P < 0,001$ ) e che un effetto protettivo, in termini di riduzione del tasso di fallimenti terapeutici, si otteneva solo con i carbapenemici e non con BLIC; gli autori raccomandavano, pertanto, di iniziare una terapia empirica con meropenem in caso di rischio per ESBL [120]. Successivamente, invece, dapprima Rodriguez-Bano e coll. in una analisi post hoc su di una coorte di 6 studi prospettici condotti su pazienti affetti da infezioni invasive da *Escherichia coli* produttori di ESBL e poi Harris e coll. su 92 pazienti con BSIs da *E coli* o *K pneumoniae* non suscettibili al cefotaxime dimostrarono che i BLIC erano efficaci tanto quanto i carbapenemi rappresentando una valida alternativa ad essi in terapia empirica in prima battuta e poi in mirata nelle infezioni da ESBL [130, 131]. Gli americani con Tamma e coll. invece, nuovamente propongono i carbapenemici in terapia empirica dal momento che evidenziarono, stu-

diando oltre 300 batteriemie da ESBL (48% trattate in empirica con PTZ e 52% con carbapenemico), un outcome peggiore nei pazienti trattati con BLIC, anche se poi si passava ad una terapia con carbapenemici in un secondo tempo. La mortalità nel gruppo PTZ era 1,92 volte più elevata rispetto al gruppo comparatore [124]. Interessante notare il fatto che utilizzando una molecola "MIC-driven" come PTZ il suo impatto sull'outcome di pazienti affetti da BSI da ESBL potrebbe essere condizionato proprio dai valori di MIC. Retamar a tal proposito studiando 39 BSIs da *E coli* produttori di ESBL riporta il dato significativo che in infezioni urinarie il farmaco rispetto al solito comparatore è sempre efficace mentre in altri setting, come per esempio quello addominale, la mortalità a 30 giorni è bassa solo se l'isolato presenta MIC  $\leq 2$  mg/L (= % vs 41,1%;  $P=0,02$ ) [132]. Più recentemente Delgado-Valverde e coll. confermano quanto detto sopra a favore dell'utilizzo di PTZ su ceppi di *Enterobacterales ESBL* + causanti BSIs se le MIC, ovviamente in broddiluizione come indicato da EUCAST, sono basse (mortalità 16,6% se MIC  $\geq 32$  mg/L vs 8,5 se MIC 4 mg/L) [133].

Nello studio di Meini invece, fare una terapia *targeted* efficace riduce il rischio di outcome negativo indipendentemente dalla molecola utilizzata in terapia empirica (carbapenemico versus non-carbapenemico) con tassi di mortalità del tutto sovrapponibili (90% di sopravvivenza con piperacillina/tazobactam e 84% con i carbapenemici) [121]. In particolare un outcome positivo veniva registrato nei pazienti trattati con piperacillina/tazobactam con origine dell'infezione dalle vie urinarie, a differenza di quelli con BSI di origine dalle basse vie respiratorie nei quali l'outcome non era così favorevole se trattati con piperacillina/tazobactam al posto del carbapenemico. Questo potrebbe essere dovuto anche all'effetto inoculo gravato su piperacillina/tazobactam e alle caratteristiche di farmacocinetica del farmaco. Ed è per questo che

alcuni autori raccomandano piperacillina/tazobactam solo in caso di infezioni delle vie urinarie e i carbapenemi se da altre origini; altri, invece, utilizzano BLIC indipendentemente dall'origine dell'infezione e li ritengono ugualmente adeguati ai carbapenemi.

Attualmente, comunque, a causa dell'emergenza e della rapida diffusione di ceppi di *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi evitarne il loro "overuse" è diventato un "must". A tal riguardo nuove recenti opzioni di "carbapenem sparing", potrebbero in futuro offrire al clinico alternative valide di trattamento [134].

**Ceftolozano/tazobactam** è una nuova combinazione tra una nuova cefalosporina anti-pseudomonas ed un inibitore delle  $\beta$ -lattamasi. Negli studi registrativi ha mostrato la stessa efficacia del carbapenemico nelle infezioni intra-addominali, in particolare anche contro i ceppi produttori di ESBL, e nelle infezioni urinarie era, addirittura, superiore a levofloxacina anche se solo il 25% circa dei ceppi era resistente al chinolonico; il tasso di cura clinica per ceftolozane/tazobactam in ME (microbiological evaluation) in *Enterobacterales* ESBL + raggiungeva il 97,4% (ESBL-*E coli* 98% - ESBL *K pneumoniae* 94,4%) vs l'82,6% per levofloxacina e 88.5% per meropenem. Gli autori concludevano comunque che tale strategia in "carbapenem sparing" era da riservarsi esclusivamente in situazioni cliniche ben determinate [62].

**Ceftazidime/avibactam** è una nuova combinazione che si basa su di un nuovo inibitore non suicida delle  $\beta$ -lattamasi attivo contro ESBL, AmpC, KPC e OXA-48. Gli studi registrativi sono stati condotti nelle UTI contro doripenem e nelle infezioni intra-addominali associato a metronidazolo contro meropenem. Nelle infezioni urinarie l'efficacia di CAZ/AVI contro i patogeni resistenti al ceftazidime era dell'89% del tutto simile a quella del doripenem, nelle IAI l'efficacia rispetto ai ceppi produttori

di ESBL era simile al meropenem (81 vs 85%) [77, 135]. In particolare il CAZ/AVI 2000 mg/500 mg ogni 8 h è stato comparato in RECAPTURE study I e II a Doripenem 500 mg ogni 8 h nelle infezioni complicate delle vie urinarie compreso la pielonefrite acuta, con possibilità di passare dopo  $\geq 5$  giorni a terapia antibiotica orale riportando una eradicazione microbiologica al TOC (test of cure) del 77,4% vs il 71% del gruppo doripenem [77]. In particolare da una caratterizzazione molecolare delle  $\beta$ -lattamasi prodotte dai patogeni Gram negativi isolati nello studio è emerso che l'87,5% delle *Enterobacterales* ESBL produttrici era portatore del gene bla<sub>CTX-M</sub> - *E. coli* 96,8% e *Klebsiella pneumoniae* 96% [136] - e che l'80% dei *Proteus mirabilis* (80%) del gene plasmidico AmpC.

Analizzando la tabella 2 sottostante riportante la sensibilità delle *Enterobacterales* isolate negli studi registrativi di CAZ/AVI, si evince che l'efficacia è massima contro *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* con MIC<sub>90</sub> inferiori a 1 mg/l valore ben al di sotto del breakpoint clinico (8 mg/L) di CAZ/AVI e nel range di sensibilità anche del solo ceftazidime, almeno per EUCAST (breakpoint di ceftazidime di 1 mg/L) [137]; sempre in tale analisi *Enterobacter cloacae* a differenza degli altri isolati presentava, invece, valori di MIC più elevati. Flamm e coll., in precedenza, in contro-

**Tabella 2** - Sensibilità degli enterobatteri isolati dagli studi registrativi effettuati con ceftazidime avibactam.

Microrganismo	N isolati	MIC range mg/L	MIC90 (mg/L)	% sensibilità
<i>E. coli</i>	323	$\leq 0,008$ - >256	0,5	100
<i>K. pneumoniae</i>	123	$\leq 0,008$ - >8	1	98,4
<i>E. cloacae</i>	29	0,25- >256	32	89,7
<i>P. mirabilis</i>	17	$\leq 0,008$ -1	0,5	100

tendenza con quanto detto sopra a proposito della sensibilità di *Enterobacter cloacae* a CAZ/AVI su di una ampia casistica (1.118 ceppi) trovarono MIC<sub>90</sub> più basse [138].

Le *ESBL* non sono in grado di idrolizzare le cefamicine ed è per questo motivo che il cefoxitin viene utilizzato come molecola screening in laboratorio per distinguere tra *ESBL* ed *AmpC*. In Italia, in passato, erano disponibili cefoxitin e cefotetan, utilizzati nelle PID (Pelvic Inflammatory Disease) e nelle infezioni addominali anche per la loro attività nei confronti degli anaerobi. Negli anni passati il loro uso nelle infezioni da *ESBL* era stato scoraggiato per l'insorgenza, durante la mono-terapia, di meccanismi di resistenza ulteriori tipo perdita delle porine [139]. In futuro queste molecole potrebbero essere delle alternative ai carbapenemici in caso di presenza di meccanismo di resistenza *ESBL* isolato; a tal riguardo gli studi effettuati sono però basati solo su piccoli numeri e quelli più affidabili sono giapponesi dove gli autori hanno valutato le loro cefamicine contro i carbapenemici. I risultati di efficacia erano simili per MIC  $\leq 1$  mg/L, invece se la MIC era tra 4 ed 8 mg/L, i carbapenemici erano sicuramente superiori [140].

Questi antibiotici però sono oramai non reperibili in Italia e, inoltre, potrebbero essere utilizzati solamente nella terapia targeted delle *ESBL*, perché nella terapia empirica dovrebbero essere protetti da un secondo farmaco come ad esempio gli aminoglicosidi.

La **temocillina** è un  $\beta$ -lattamico attivo contro le *Enterobacterales* produttrici di *ESBL* ed *AmpC*, ma sfortunatamente è commercializzata solo in UK, Belgio ed Olanda. È efficace come imipenem, negli studi nell'animale da esperimento, nelle UTI da *E. coli* CTX-M ma nell'uomo mancano studi comparativi. La dose raccomandata è 2 g ogni 8 ore per isolati con MIC  $\leq 16$  mg/L.

## TERAPIA DELLE AMPC TRA ENZIMI ESPRESSI ED INDUCIBILI: COME DEVE ORIENTARSI IL CLINICO

Le *Enterobacterales* resistenti alle cefalosporine a spettro esteso rappresentano attualmente un problema di sanità pubblica mondiale arrivando a percentuali anche superiori al 50% in paesi come l'Italia. Nella maggior parte dei casi tale pattern di resistenza è dovuto alla produzione batterica di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (*ESBL*); in un 15-20% dei casi, però, è l'enzima *AmpC* responsabile di tale meccanismo di resistenza. Ma tuttavia il ruolo dell'*AmpC* è comunque spesso sottovalutato perché la sua rilevazione non è facile utilizzando le metodiche di microbiologia classica e quando rilevato non sempre è di facile comprensione dalla maggior parte dei clinici. Successivamente le *AmpC* sono migrate dalle specie del gruppo *ESCPM*, tramite plasmidi, anche in specie batteriche nelle quali non erano mai state descritte prima, come in *Klebsiella pneumoniae* e *E. coli*, batteri Gram negativi che più frequentemente esprimono *ESBL*. Classicamente le *AmpC* sono resistenti ai vecchi inibitori suicidi, almeno in vitro, e anche alle cefamicine, rendendo il batterio resistente anche alla cefoxitina. Le *AmpC* possono essere ipotizzate se vi è resistenza alle cefalosporine associata a resistenza agli inibitori suicidi e alla cefoxitina, e una sensibilità residua al cefepime che non è un buon substrato di questo enzima.

Le *AmpC* plasmidiche pienamente espresse e facilmente rilevabili nell'antibiogramma sono spesso ad appannaggio di infezioni comunitarie (esempio le infezioni urinarie da *Proteus* spp), invece, le infezioni da germi che albergano il gene cromosomico inducibile sono più frequentemente nosocomiali, per-

tanto, la conoscenza del fenomeno deve essere diffusa, specie agli internisti ed ai medici del territorio.

La rilevazione dell'**AmpC** nella pratica quotidiana, come già sottolineato in precedenza, è abbastanza difficile, pertanto, studi clinici adeguatamente condotti nella terapia delle infezioni da batteri produttori di **AmpC** sono rari e quelli disponibili sono per lo più retrospettivi. Rispetto alle infezioni da *Enterobacteriales* produttrici di ESBL, già di per sé complicate da trattare, quelle da batteri produttori di **AmpC** sono ancora più complesse perché i vecchi inibitori suicidi (clavulanato, sulbactam and tazobactam) non sono attivi contro questi enzimi [7, 141] e, pertanto, la terapia raccomandata per **AmpC** è stata per molti anni basata sui carbapenemici, specialmente per le infezioni gravi. Al giorno d'oggi la presenza di nuovi inibitori delle  $\beta$ -lattamasi come l'avibactam che non è un inibitore suicida e che è attivo contro l'enzima **AmpC** potrebbe aprire nuovi scenari nella terapia delle infezioni da batteri produttori di **AmpC**, specialmente nell'ottica, sempre più sentita, di effettuare dei protocolli di terapia in regime di "*carbapenem-sparing*". Il grosso problema è la comparazione degli studi, infatti, la selezione dei pazienti in base alla produzione di **AmpC** da parte dei batteri è molto eterogenea: a tal riguardo alcuni studi hanno arruolato solo enterobatteri, altri *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, *Citrobacter* spp, *Proteus* e *Morganella*, altri *Enterobacter* solo, altri *Enterobacter*, *Citrobacter*, e *Serratia*. In questo scenario è molto difficile trarre delle conclusioni valide universalmente. La monoterapia con cefalosporine, anche in caso di sensibilità all'antibiogramma, in presenza di **AmpC** inducibile (caratteristica di *Enterobacter* spp in 99% dei casi) seleziona in genere ceppi resistenti nel 20% dei casi, ma la percentuale sale se la terapia è utilizzata per le batteriemie invece che per infezioni più semplici come le infezioni della ferita chirurgica o delle vie urinarie; in caso di presenza

di **AmpC** inducibile (resistenza al cefoxitin o positività del test cefalosporine più o meno acido boronico) la monoterapia con cefalosporine andrebbe evitata [142]. Nel caso di esposizione o associazione con i chinoloni (se efficaci) la probabilità di insorgenza di resistenza è ridotta [143].

Tra le cefalosporine, però, si differenzia il cefepime, che è la cefalosporina che risente di meno dell'azione idrolizzante dell'**AmpC**, infatti, per le specie *Enterobacter*, *Serratia* e *Citrobacter* che producono **AmpC** inducibile, non vi era differenza di mortalità a 30 gg o di durata del ricovero tra il gruppo trattato con cefepime e quello con la terapia di riferimento rappresentata dal meropenem; pertanto, specie se vi è un'adeguata rimozione della fonte dell'infezione, il cefepime potrebbe essere un'alternativa valida al meropenem, sempre nell'ottica di una strategia "carbapenem-sparing" [144]. Normalmente i ceppi produttori di **AmpC** sono suscettibili al cefepime tranne quando coesistono altri meccanismi di resistenza alle cefalosporine [141]. Lee e coll. analizzando retrospettivamente 305 BSI mono-microbiche da *Enterobacter cloacae* trovarono che il cefepime rappresentava una valida alternativa al carbapenemico nei ceppi sensibili al cefepime stesso ma non in quelli sensibili dose-dipendente (SDD); la mortalità a 30 giorni era 26,4% del gruppo cefepime vs 22,2% del gruppo carbapenemico ( $P=0,7$ ) [145].

Una recente revisione sistematica della letteratura attraverso una meta-analisi dei dati non trova una forte evidenza nell'affermare che i carbapenemi rispetto a comparatori come chinoloni, BLICs, o cefepime siano superiori in termini di mortalità nel trattamento di infezioni da *Enterobacterales* produttrici di **AmpC**. Bisogna però di nuovo sottolineare come l'ampia eterogeneità degli studi e la loro debolezza possa portare a conclusioni non supportate dalla necessaria robustezza statistica; per gli autori in caso di instabilità emodinamica o di infezioni molto gravi la prima

scelta terapeutica rimane, comunque, un carbapenemico [146]. In letteratura non ci sono studi clinici comparativi su germi che albergano *AmpC* su di un plasmide.

Ricapitolando sembra prudente non prescrivere cefalosporine (eccetto cefepime) quando un *Enterobacter* spp è isolato indipendentemente dall'antibiogramma e specialmente se l'infezione non è lieve. Pertanto i carbapenemici sono i farmaci di scelta per i casi più gravi, il cefepime è una valida alternativa se l'infezione è dominata ed il farmaco è prescritto nelle dosi e nei modi adeguati. In pratica alte dosi di cefepime sembrano essere una scelta ragionevole in presenza di infezioni da *Enterobacteriaceae* sensibili al farmaco produttrici di *AmpC* cromosomico.

Per le specie con *AmpC* costitutivo, la piperacillina/tazobactam può essere una valida alternativa (ma va sottolineato che il tazobactam non è un efficace inibitore dell'*AmpC*) solo se il germe è sensibile in vitro, l'inoculo dell'infezione sia ipotizzabile basso e la porta d'ingresso dell'infezione è la via urinaria.

Le nuove associazioni di  $\beta$ -lattamici ed inibitori delle  $\beta$ -lattamasi hanno attività anti *AmpC*. In particolare ceftolozano-tazobactam ha attività perché ceftolozano è la nuova cefalosporina anti-*AmpC*, questa affermazione è vera specialmente per *P. aeruginosa*, per le *Enterobacterales* tale attività non è scontata a priori e pertanto il ceppo deve essere testato preventivamente.

**Avibactam invece è un nuovo inibitore delle  $\beta$ -lattamasi non suicida che è attivo anche contro le  $\beta$ -lattamasi di classe di C;** al momento, però, in letteratura non ci sono report di casi di infezioni trattate con questo farmaco. Comunque ceftazidime/avibactam può essere un'alternativa *carbapenem-sparing* nella terapia mirata di infezioni da da germi produttori di *AmpC*.

Ad oggi non sono stati pubblicati studi randomizzati e controllati nelle infezioni da *AmpC*, pertanto, tutte le informazioni che abbiamo derivano solo da studi osservazionali.

## TERAPIA DELLA KPC OGGI: DAL MALATO FRAGILE ALLE INFEZIONI SEMPLICI

La resistenza ai carbapenemici negli enterobatteri (*CPE*) può essere dovuta a produzione di *ESBL* e/o *AmpC* più pompe di efflusso o deficit di porine oppure a veri e propri enzimi capaci di idrolizzare i carbapenemici (carbapenemasi).

Tra le carbapenemasi si distinguono quelle della classe A che tipicamente sono le *KPC*, quelle della classe B o metallo enzimi che sono *NDM*, *VIM* o *IMP* tra altre molecole e quelle della classe D (*OXA-48* è quello più diffuso) [147]. Prima dell'avvento del *ceftazidime/avibactam*, venivano utilizzate combinazioni di farmaci di seconda linea, più o meno associati anche al meropenem ad alto dosaggio. I farmaci utilizzati ancora oggi sono la colistina, la tigeciclina, la fosfomicina e la gentamicina. Altri farmaci che a volte possono essere marginalmente attivi sono doxiciclina, cotrimossazolo, cloramfenicolo e temocillina. Al momento oltre all'*avibactam* abbiamo anche *relebactam* e *vaborbactam* che sono inibitori delle *KPC* ma non delle *OXA-48* [112, 148].

L'attività dei carbapenemici nei confronti delle *KPC* varia e talvolta la loro attività è mantenuta anche su ceppi in cui è stata confermata la produzione di *KPC*. Quindi possono esistere dei ceppi *CPE* che sono sensibili ai carbapenemici, sia con i breakpoint CLSI (MIC  $\leq 1$  mg/L per meropenem ed imipenem e MIC  $\leq 0,5$  mg/L per ertapenem) sia con quelli EUCAST (MIC  $\leq 2$  mg/L per meropenem ed imipenem e MIC  $\leq 0,5$  mg/L per ertapenem); inoltre, studi di farmacodinamica, in caso di meccanismo di resistenza *OXA-48* e *KPC*, hanno dimostrato che meropenem infuso

lentamente ad alte dosi può essere attivo su tali ceppi con MIC fino a 8 o 16 mg/L [149]. Si possono utilizzare i carbapenemici nelle infezioni da *CPE* con MIC favorevole, la monoterapia sicuramente è sconsigliata, forse solo nelle UTI non complicate, ma in ogni caso il carbapenemico dovrebbe essere utilizzato in combinazione. In effetti in paesi come l'Italia i ceppi di *KPC* con MIC favorevoli erano presenti solo molti anni orsono all'inizio dell'epidemia e sono al momento piuttosto rari [150]. Ad esempio nella nostra realtà toscana normalmente si riscontrano MIC per il meropenem in *KPC* > a 512.

Il vero problema è che utilizzando i carbapenemici ad alte dosi (2 gr ogni 8 ore in extended infusion) e in combinazione con altre molecole contro ceppi di *KPC* con MIC veramente elevate al meropenem >32 mg/L fino ad un massimo di 64 mg/L [151] l'impatto ecologico sul microbiota dei pazienti e sull'ambiente è davvero notevole. Gli studi di alcuni anni orsono di Daikos e Tumbarello hanno chiaramente osservato, nonostante la loro natura retrospettiva, un effetto benefico sulla mortalità, della combinazione a due o meglio a tre farmaci incluso il carbapenemico nelle sepsi da *KPC*, specie se la MIC era inferiore o uguale a 16 mg/L. La triade più utilizzata era colistina più tigeciclina più meropenem; questi risultati sono stati confermati anche successivamente da Giannella e coll., anche nei ceppi con MIC >16 mg/L. Altri autori, invece, non sono riusciti a dimostrare l'effetto benefico della combinazione o almeno solo nei pazienti più gravi né sono riusciti a dimostrare l'effetto benefico dell'aggiunta del carbapenemico stesso [152, 153]. Le ragioni di queste discrepanze di risultato potrebbero essere date dalla variabilità dei pazienti, dai regimi utilizzati ma anche dalla difficoltà ad avere sistemi omogenei di determinazione delle MIC.

Alcuni autori hanno utilizzato come terapia di ultima spiaggia, l'uso del doppio carbapenemico; con ertapenem che do-

vrebbe fungere da legante l'enzima mentre l'altro, di solito imipenem, ritenuto essere a maggiore attività litica potrebbe essere lasciato libero di lavorare; non tutti gli autori, però, sono concordi con questo meccanismo di azione e sostengono che è, piuttosto, l'uso di concentrazioni elevate globali di carbapenemico a funzionare per la più difficile possibilità del batterio a idrolizzare tramite le carbapenemasi il farmaco stesso. Inoltre è stato dimostrato che l'efficacia catalitica delle carbapenemasi KPC (KPC-2, KPC-3 e KPC-9) di fatto è sovrapponibile verso tutti i carbapenemi in maniera indistinta [154, 155]. Tale associazione è stata sporadicamente descritta come efficace, ha dati in vitro di supporto ma un solo studio retrospettivo seppur efficace e [156, 157], pertanto al momento si lascia solo per quei casi nei quali hanno fallito tutte le precedenti opzioni, anche perché l'impatto ecologico è molto alto.

Se le associazioni sperimentate per i carbapenemici o loro stessi siano la miglior combinazione da proporre anche per le nuove molecole tipo *ceftazidime/avibactam* non è al momento ancora chiaro, ma, è ovvio che avibactam essendo l'inibitore delle carbapenemasi a serina è un farmaco che potrebbe rendere di nuovo attivo il carbapenemico.

*La colistina ha rappresentato il backbone della terapia delle CPE* fino all'avvento dei nuovi inibitori. La colistina da sola ha mostrato una inferiorità rispetto alle associazioni della colistina con altri antibiotici (meropenem, aminoglicosidi e tigeciclina) sia negli studi collaborativi sia nelle metanalisi [153, 158]. Recentemente la colistina più il meropenem non si è mostrata superiore a colistina da sola nella terapia dei gram negativi MDR, ma il 77% dei microorganismi era rappresentato da *Acinetobacter* spp [159].

La combinazione con rifampicina, sebbene più volte sperimentata in vitro contro MDR gram negativi compresi i ceppi

di *Klebsiella* KPC anche resistente alla colistina non ha trovato corrispettivi negli studi clinici che più volte hanno mostrato una debolezza di tale associazione anche se contro *Acinetobacter* più che *Enterobacterales* ed a dosaggi non più utilizzati adesso (Tascini AAC, Durante-Mangoni CID).

La colistina dovrebbe essere utilizzata due volte die preceduta da dose carico, in genere 9 MU dose carico seguita da 4.5 MU ogni 12 ore infusa in 3 ore, negli stati Uniti la dose raccomandata è di 10 MU die anche se il numero delle dosi non è chiarito. Secondo molti autori la colistina è un farmaco concentrazione dipendente e, pertanto, dovrebbe essere data meno volte durante l'arco della giornata, in passato si utilizzava ogni 8 ore per evitare la ricrescita dei ceppi etero-resistenti e lo sviluppo di resistenza vera. La somministrazione tre volte die era solo dovuta a ragioni microbiologiche [160].

La resistenza alla colistina è sempre più frequente in KPC ed è dovuta per lo più a mutazioni cromosomiche. Tipicamente, infatti, tale resistenza è mediata da inattivazione e/o mutazioni cromosomiche di geni come *mgrB*, *pmrAB* o *phoPQ*; la delezione o inattivazione inserzionale di *mgrB* codifica per un regolatore negativo o meglio inibitorio di *phoPQ* che a sua volta induce modificazioni a carico del LPS e di conseguenza resistenza alla colistina venendo modificato il suo target [161]. Tale resistenza è in genere selezionata da un precedente utilizzo di colistina ed è associata ad un eccesso di mortalità [162, 163].

Recentemente Can e coll. analizzando 115 pazienti ricoverati in ICU con infezione da *pneumoniae* resistente a colistina (ColR-Kp) hanno trovato che la presenza di ceppi ST101 (mantenuta suscettibilità a cotrimoxazolo) rappresenta di per se un predittore indipendente di maggior mortalità in ColR-Kp [164].

La resistenza plasmidica, selezionata specialmente dall'uso della colistina in ambito veterinario, è frequente nelle *Entero-*

*bacterales*, ma fortunatamente raramente associata alla resistenza ai carbapenemici, tale tipo di resistenza è comunque preoccupante vista la politica di antibioticoterapia in campo veterinario [165].

La fosfomicina può essere un importante farmaco partner nelle infezioni da *KPC*. La determinazione della MIC è difficoltosa perché richiede l'agar diluizione che è di difficile esecuzione nei laboratori in routine; inoltre, la molecola sviluppa facilmente resistenza in monoterapia.

La fosfomicina è un antibiotico concentrazione-dipendente che per funzionare bene necessita anche di una tempo-dipendenza. Da questo ne deriva il fatto che nel paziente critico il dosaggio consigliato è di 16-24 gr/die suddiviso in 3 o meglio 4 somministrazioni; da parte nostra consigliamo 4 gr ogni 6 ore per un totale di 24 gr/die, ovviamente sempre in associazione. In maniera molto brillante Louise e coll., recentemente, hanno dimostrato che fosfomicina possiede due differenti "driver" farmacocinetici, il primo legato al rapido e potente effetto killing concentrazione dipendente (AUC/MIC), il secondo legato alla soppressione della resistenza che è tipicamente tempo-dipendente [166].

A tutti i regimi utilizzanti, anche a quelli proposti sopra, si assiste, infatti, ad un precocissimo effetto killing (calo di 2-3 log<sub>10</sub> CFU/ml) seguito poi dopo già solo 8 ore a selezione di ceppi resistenti con ricrescita batterica. L'associazione con altre molecole ostacolerebbe proprio il secondo effetto non voluto potenziando quindi l'importante effetto killing iniziale. Sempre con il fine di ottimizzare il PK/PD del farmaco Heavner e coll. raccomandano, nel paziente critico una LD iniziale seguita da un alto dosaggio di mantenimento almeno in una prima fase correggendo poi la dose solo per CrCL <50 mL/min (il farmaco è eliminato non modificato dal rene) [167].

Alcuni studi retrospettivi hanno provato a determinare l'efficacia di fosfomicina nelle infezioni difficili, in regimi di combinazione, ma al momento il suo ruolo è riservato a quello di farmaco partner, spesso terzo farmaco, nelle forme più gravi [168-170]. Si ricorda di considerare il fatto che ogni gr di fosfomicina contiene 0,32 gr di sodio, e, pertanto, il clinico dovrebbe sempre porre attenzione all'ipotetico rischio di squilibri elettrolitici indotti dalla terapia. Nella nostra esperienza, tuttavia, tale evenienza è del tutto sporadica.

Temocillina può essere attiva anche contro ceppi *KPC*, utilizzando i breakpoint della BSAC (sensibile  $\leq 8$  mg/L per le infezioni gravi, sensibile  $\leq 32$  mg/L per le infezioni urinarie). La temocillina, però, non ha studi umani che ne sostengono l'uso nella terapia della *KPC* anche se gli studi su animali sono comunque molto promettenti. Bisogna ricordare che la temocillina è attiva contro *KPC* ed *ESBL* ma non contro *OXA-48*, tanto che è stata proposta come molecola screening per differenziare i ceppi di *Enterobacteriales* resistenti ai carbapenemici tra *KPC* (temocillina sensibili) e *OXA-48* (temocillina resistenti) [171, 172].

Il ceftazidime avibactam è il primo  $\beta$ -lattamico con attività nei confronti di *KPC*. Gli studi registrativi sono stati eseguiti su pazienti con infezioni intra-addominali, urinarie e polmoniti, però non causate da *CPE*. Comunque il farmaco ha ottenuto l'approvazione per le infezioni da gram negativi MDR che non avevano adeguate opzioni terapeutiche, queste infezioni sono tipicamente quelle da *KPC* [173]. Effettivamente CAZ/AVI sta confermando in vivo ciò che è emerso *in vitro*. Durante l'uso compassionevole sono stati pubblicati alcune case-series su infezioni da *CPE*. La mortalità nei casi trattati variava dal 7% al 39% nelle batteriemie da *KPC* e dall'8% al 50% globalmente.

Caston e coll. in uno studio multicentrico retrospettivo su 31 pazienti onco-ematologici con BSI da *CPE* trovarono che

la mortalità a 30 giorni era del 25% nel gruppo trattato con CAZ/AVI versus 52% del gruppo comparatore trattato con altre molecole e la cura era del 75% per CAZ/AVI vs 34% del comparatore [174]. In un altro studio 13 pazienti con batteriemia da KPC erano confrontati con 96 pazienti con batteriemie e trattati con regimi [80] alternativi. La mortalità era del 7% con CAZ/AVI versus 31% con altri regimi terapeutici. L'attività di CAZ/AVI, in BSI e HAP da KPC-Kp, è stata comparato a colistina sia in terapia di associazione che in monoterapia ottenendo una mortalità del 9% nel gruppo CAZ/AVI rispetto al 32% del comparatore [175].

Recentemente sono stati pubblicati i dati sull'uso compassionevole di CAZ/AVI in Italia in quella che al momento appare essere la casistica più numerosa pubblicata in letteratura: 138 pazienti con infezione da *KPC-Kp* trattati in terapia di salvataggio con CAZ/AVI, dopo una prima linea di trattamento con altre molecole (best available therapy, prima dell'introduzione del CAZ/AVI), sono stati analizzati retrospettivamente. La mortalità a 30 giorni tra i 104 pazienti con BSI da *KPC-Kp* era significativamente più bassa nel gruppo CAZ/AVI rispetto al comparatore (36,5% vs 55,7%,  $p=0,005$ ). Gli autori concludono che CAZ/AVI appare essere una promettente offerta terapeutica per il trattamento delle infezioni gravi da *KPC-Kp*, soprattutto, in caso di BSI non risolte [176]. Nello studio di Tumbarello, CAZ/AVI era stato utilizzato nel 78% dei casi in combinazione e nel 20% dei casi con un carbapenemico. Bisogna notare che tutti e 138 i ceppi di *KPC* isolati in questo studio erano resistenti alle cefalosporine a spettro esteso, ai chinoloni e ad ertapenem. 129/138 (93%) avevano una MIC al meropenem  $\geq$  a 16 mg/l; inoltre, le percentuali di sensibilità alle molecole utilizzate per la *KPC* erano modeste: gentamicina (41%), fosfomicina (39%), tigeciclina (32%), colistina (27%), ed amikacina (16%).

Le serie sopra descritte, però, proprio per l'esiguità del numero dei pazienti analizzati, presentano un grosso limite e non possono, pertanto, al momento offrire al clinico delle conclusioni adeguate.

Come già spiegato nella sezione dedicata alle nuove associazioni BLIC la mono-terapia con ceftazidime/avibactam ha selezionato differenti ceppi resistenti, alcuni con deficit di porine o con mutazioni delle pompe di efflusso, altri, i più frequenti, con mutazioni a carico del complesso genetico blaKPC-3. Interessante dato è rappresentato dal fatto che il meropenem in *combo-therapy* sembrerebbe riacquistare la sua efficacia molto probabilmente per un meccanismo non ancora ben noto di sua rigenerazione da parte della mutazione D179Y sul plasmide blaKPC-3 [70]. Pertanto l'associazione tra ceftazidime/avibactam e meropenem potrebbe essere un'altra opzione terapeutica per ovviare all'insorgenza di resistenza, anche se sarebbe una strategia contraria alla terapia *carbapenem-sparing*.

Problema ancora del tutto irrisolto è capire, in caso di *combo-therapy*, strategia che al momento appare la più vincente, quale sia il partner migliore da associare a CAZ/AVI che a nostro avviso deve essere la molecola da scegliere in prima battuta, se sensibile, in caso di infezione provata da *KPC-Kp*; è, infatti, mandatorio trattare il paziente con la miglior terapia attualmente possibile in nostro possesso evitando l'utilizzo di combinazioni di farmaci con cinetiche non ottimali e/o tossicità sicuramente superiori a CAZ/AVI. A nostro avviso considerando l'efficacia di fosfomicina, dati non ancora pubblicati, almeno in Italia, vs i ceppi *KPC-Kp* (62% dati Italiani Euro Surv 2014), quando sensibile (saggiata in agar diluizione), tale molecola potrebbe essere il partner migliore in alternativa, per i centri dove tale saggio non è disponibile, alla gentamicina; come seconda scelta optiamo, su sensibilità attestate sull'an-

tibiogramma, per una tra le seguenti molecole colistina, tigeciclina, meropenem (vedi sopra) e trimetoprim/sulfametossazolo se ST101. In caso di meropenem necessaria MIC estesa; in caso di colistina, tigeciclina e gentamicina necessaria MIC precisa con il sistema di riferimento riconosciuto da EUCAST che è la broddiluizione.

Quello che risulta dagli studi in vitro è che, anche negli studi di un singolo clone di *KPC*, vi può essere differenza negli esperimenti di sinergismo. Pertanto scegliere le molecole partner potrebbe essere molto difficile e sarebbe meglio se ci si basasse su studi in vitro puntuali e da ripetere per ogni ceppo. D'altro canto il sinergismo migliore è difficile da inferire rispetto alle singole MIC del ceppo per il farmaco da associare (ad esempio MIC del meropenem ed associazione con il meropenem), infatti nello studio di Tumbarello il 93% dei ceppi aveva una *MIC* maggiore a 16 ma nel 21% dei casi è stato associato il meropenem senza evidenti fallimenti. L'altra criticità è rappresentata dalla difficile standardizzazione dei test di sinergismo in vitro. Nella nostra esperienza i sinergismi si possono eseguire con numerose tecniche (doppio disco, incrocio di E-test, Checkerboard fatti in "house" o preparati liofilizzati) ma al momento nessuna è stata validata e standardizzata. Dalla foto riportata sotto (*Figura 1*), per esempio, il clinico potrebbe dedurre sinergismo con carbapenemici o gentamicina, ma il test non è quantificabile e, pertanto, dovrebbe in questi casi esserci una completa collaborazione tra clinico e microbiologo [177].

Un altro concetto importante da discutere è il **breakpoint clinico di ceftazidime/avibactam**, tale breakpoint è stato stabilito a 8 mg/L, che era il breakpoint clinico di ceftazidime da solo fino al 2010. (EUCAST, Craig) [178]. Ora possiamo ipotizzare che l'avibactam una volta effettuata la sua azione bloccando le



**Figura 1** - Ceppo KPC: si nota aumento dell'alone di inibizione tra CZA (ceftazidime/avibactam e meropenem (MEM) ed ertapenem (ETP) e sinergismo con gentamicina; pulizia dell'alone di inibizione di gentamicina dalla parte di CZA.

$\beta$ -lattamasi lascerà il ceftazidime da solo ad agire. Pertanto, se la MIC è compresa tra 2 ed 8 mg/L potrebbe essere meno efficace rispetto a MIC  $\leq 1$  mg/L: dal punto di vista clinico se si trovasse MIC  $> 1$  mg/L, probabilmente l'associazione potrebbe essere giustificata per evitare fallimenti. Bisogna d'altro canto dire che dagli studi registrativi sono stati derivati dei dati microbiologici che fanno ben sperare, perché per le *Enterobacterales* la MIC<sub>90</sub> dei ceppi è inferiore ad 1 mg/L (vedi tabella delle ESBL) ed al momento la possibilità di incontrare ceppi con MIC più elevata è bassa ed inferiore al 10%.

Altro problema attuale derivato da recenti dati pubblicati potrebbe essere quello di definire meglio l'utilizzo di CAZ/AVI in differenti setting dove forse un dosaggio superiore potrebbe essere utile oppure associazioni con determinate molecole.

Shields [179] e coll a tal riguardo recentemente sottolineano l'importanza di definire nuovi regimi terapeutici e nuovi dosaggi di CAZ/AVI in infezioni come quelle delle basse vie aeree dove il farmaco sembrerebbe avere un rischio maggiore di fallimento terapeutico. L'amikacina somministrata per via aerosolica potrebbe essere, per esempio, un partner efficace da affiancare a CAZ/AVI nel trattamento delle polmoniti da Gram negativi resistenti ai carbapenemici come pubblicato recentemente da Abuhussain e coll. [180].

## Terapia delle MBL ed OXA-48

Le **MBL** (metallo- $\beta$ -lactamase) sono frequenti in paesi asiatici come India Pakistan e Cina, dove l'enzima più diffuso è **NDM** (New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase) e fortunatamente sono abbastanza rare in Italia, dove l'enzima più diffuso è la **VIM** [181] (Verona Integron-Borne Metallo- $\beta$ -lactamase).

**Aztreonam** non viene idrolizzato dai metallo-enzimi e negli studi in vitro mostra attività battericida, anche se lenta, contro le *Enterobacteriales* produttrici di metallo-enzimi. Il problema sorge dal fatto che numerosi isolati produttori di **MBL** hanno anche altri meccanismi di resistenza come **ESBL** ed **AmpC** che possono idrolizzare l'aztreonam stesso [147, 182]. In questo scenario l'aztreonam, come riportato nel capitolo specifico delle nuove molecole, potrebbe essere protetto dall'avibactam che inibirebbe gli enzimi di classe **A**, **C** ed alcuni di classe **D**, permettendo all'aztreonam di superare il meccanismo di resistenza dei metallo-enzimi.

Studi sul modello animale hanno curiosamente fatto notare che ceftazidime/avibactam ma non ceftazidime da solo era efficace nei confronti di infezioni sperimentali da *K. pneumoniae* ed *E. coli* **ESBL** ed **NDM** produttori, suggerendo che il

ceftazidime è degradato più dalle **ESBL** che dai metallo-enzimi [183]. Gli studi sono stati anche confermati su un modello murino di polmonite causata *K. pneumoniae* produttrice di **NDM**, **Oxa-48** e **CTX-M** [184]. Al momento non ci sono dati clinici sull'uomo che permettono di consigliare ceftazidime/avibactam nell'uomo, anzi gli studi in vitro ne sconsigliano l'utilizzo in mono-terapia.

Marshall e coll. [84] hanno studiato 21 ceppi di *Enterobacterales* con meccanismi di resistenza ben definiti dal punto di vista molecolare ed hanno incluso nello studio ceppi produttori di **IMP**, **NDM**, **OXA-48**, **CTX-M** ed **AmpC**. Gli autori hanno dimostrato un sinergismo pieno in 17/21 ceppi studiati ed uno parziale nei restanti ceppi. Gli studi di batteriocidia in vitro, contro i ceppi **MBL**, hanno dimostrato che l'aggiunta del ceftazidime/avibactam all'aztreonam ha comportato un aumento della batteriocidia superiore a 4 logaritmi. Nello studio animale dell'infezione della zampa, a 24 ore di terapia, si è notata una riduzione della carica microbica nei tessuti di più di 4 logaritmi dell'associazione CAZ/AVI (32 mg/kg ogni 8 ore) più aztreonam (32 mg/kg ogni 8 ore) rispetto a CAZ/AVI (32 mg/kg ogni 8 ore) da solo.

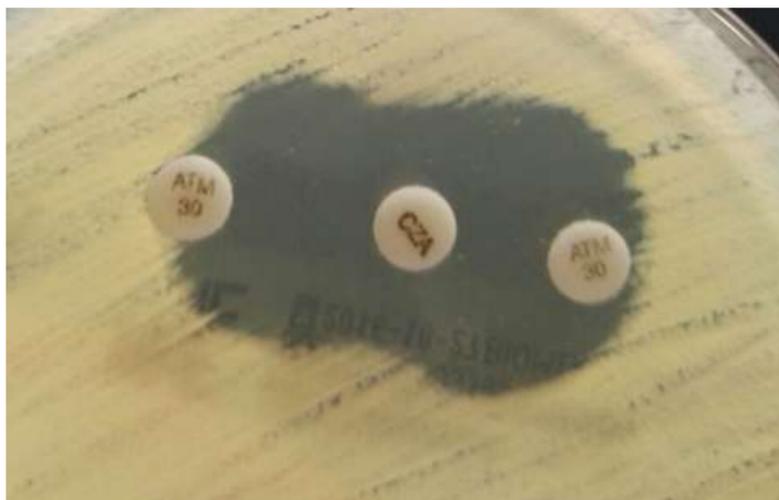
Basandoci sui meccanismi molecolari dei tre composti si potrebbe ipotizzare il loro uso combinato per trattare le infezioni da **MBL**. Avibactam inibisce Classi A, C e D delle  $\beta$ -lattamasi, pertanto, è fortemente attivo contro **AmpC** ed **ESBL** e può proteggere sia ceftazidime sia aztreonam [185]. Avibactam lascia liberi di agire solo i metallo-enzimi, che però sono deboli contro aztreonam, pertanto, l'associazione potrebbe di nuovo essere efficace. Un altro meccanismo utile potrebbe essere la capacità legante delle **PBP** delle singole molecole. Infatti, ceftazidime è un inibitore delle **PBP 3** e di alcune **PBP 1** di *E. coli* e *P. aeruginosa*. Aztreonam anche ha attività sulla **PBP3**.

Anche avibactam da solo potrebbe agire sulle PBP [186]. Così le tre molecole potrebbero agire sui meccanismi di duplicazione e divisione dei gram negativi ed avere un ulteriore effetto sinergico [187].

In figura 2 e 3 si può vedere, su di un ceppo di *E coli* MBL produttore, il sinergismo che solo avibactam sostiene con aztreonam dopo ceftazidime ed aztreonam da soli sono risultati inefficaci.

Le **OXA-48** sono frequenti in Europa ma non Italia, i primi isolati sono stati segnalati in Turchia e questi microorganismi sono frequenti in altri paesi europei compresa la Francia, ma sono rari in Italia [188].

Le **OXA-48** sono enzimi con debole attività carbapenemasi e debole attività contro le cefalosporine, spesso sono albergate in isolati che hanno anche enzimi del tipo **ESBL** ed **AmpC**



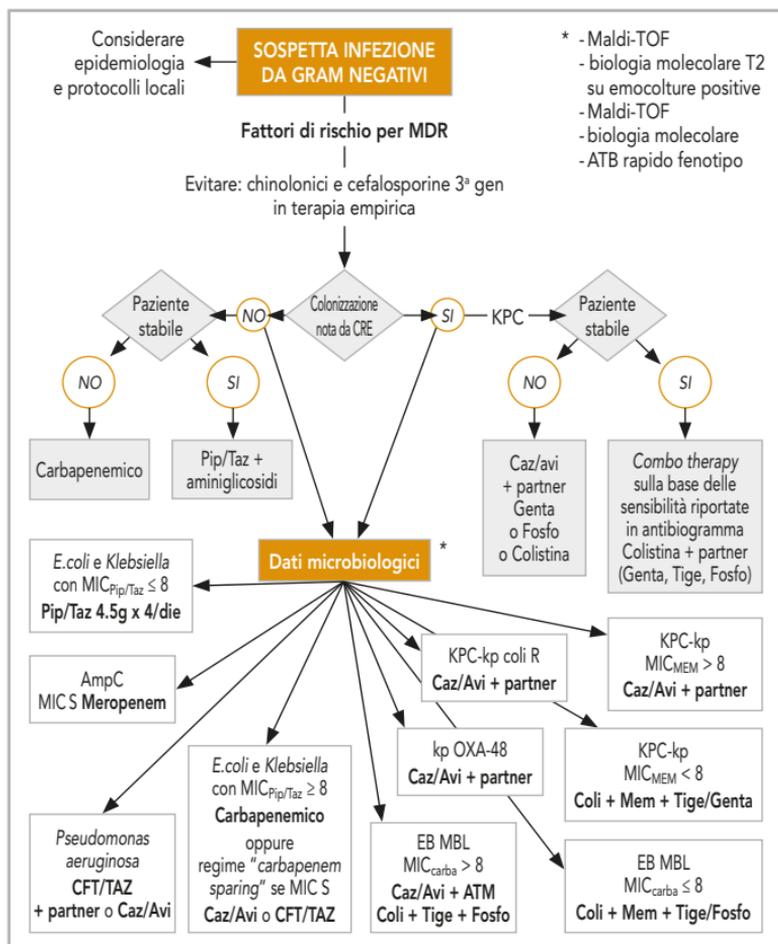
**Figura 2** - Sinergismo contro *K. pneumoniae* produttore di metallo-enzima tra CAZ/AVI ed aztreonam.



**Figura 3** - Aztreonam e ceftazidime da soli non funzionano sullo stesso ceppo.

che danno piena resistenza alle cefalosporine. **OXA-48** di per sé non idrolizza attivamente ceftazidime, pertanto, ceftazidime avibactam anche da solo potrebbe essere una valida alternativa nel trattamento di queste infezioni [189].

## Algoritmo trattamento infezioni da GN MDR

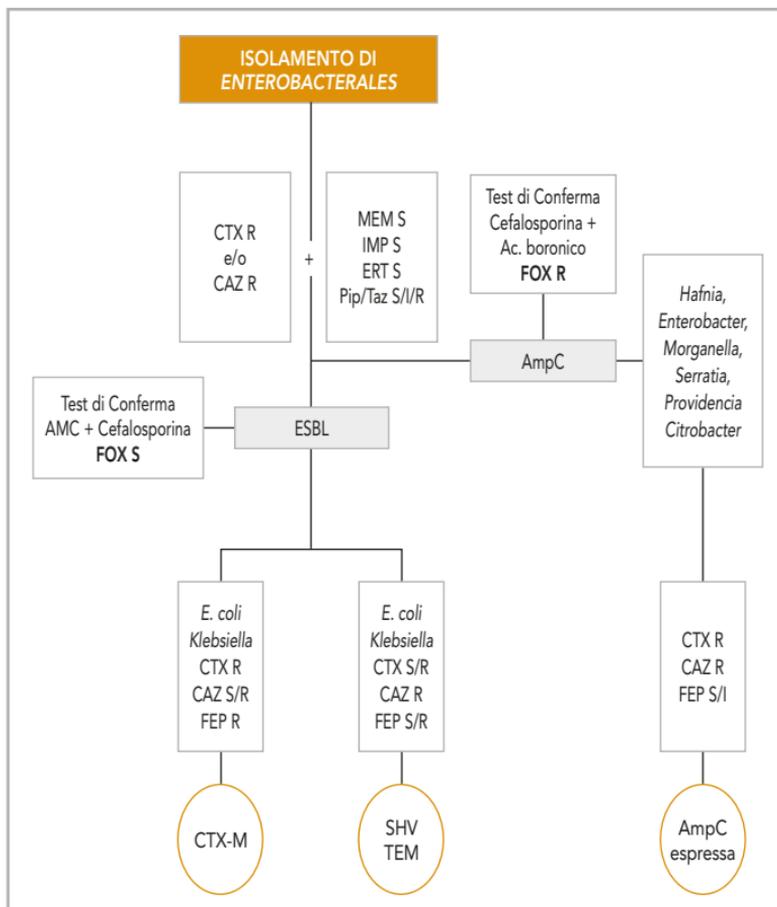


LEGENDA: CRE=Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*

CFT/TAZ=Ceftolozano/Tazobactam – Caz/Avi=Ceftazidime/Avibactam  
ATM=Aztreonam – MEM=Meropenem.

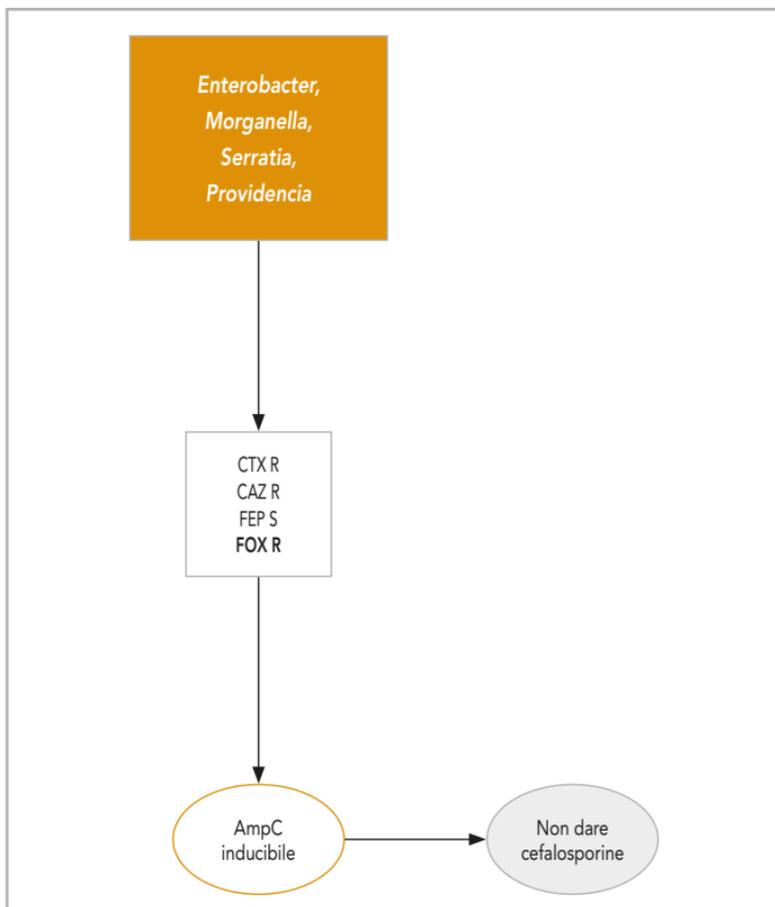
NOTA: in paziente non colonizzato da CRE e stabile in caso di non disponibilità di Pip/Taz valutare se cIAI/cUTI CFT/TAZ o Caz/Avi.

## Algoritmo interpretazione antibiogramma Enterobacterales ESBL/AmpC espressa



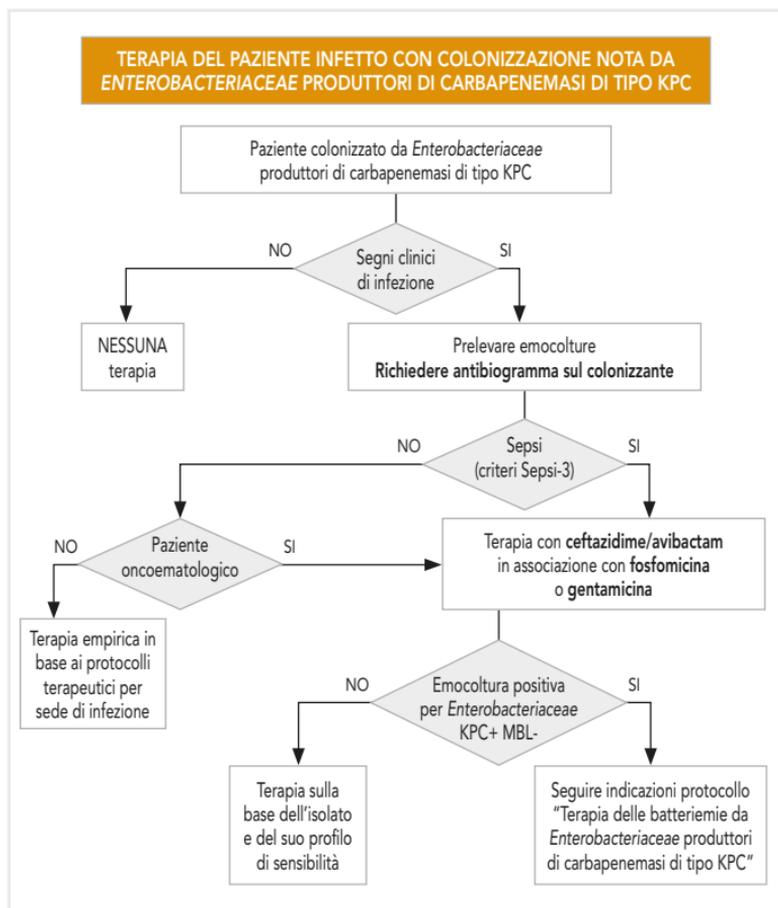
LEGENDA: CTX=Cefotaxima - CAZ=Ceftazidime - MEM=Meropenem - IMP=Imipenem - ERT=Ertapenem - FOX=Cefoxitin - FEP=Cefepime - ESBL=Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase - CTX-M= Cefotaximase ESBL - TEM=Temoneira ESBL - SHV=Sulhydryl variable

## Algoritmo interpretazione antibiogramma Enterobacterales AmpC inducibile



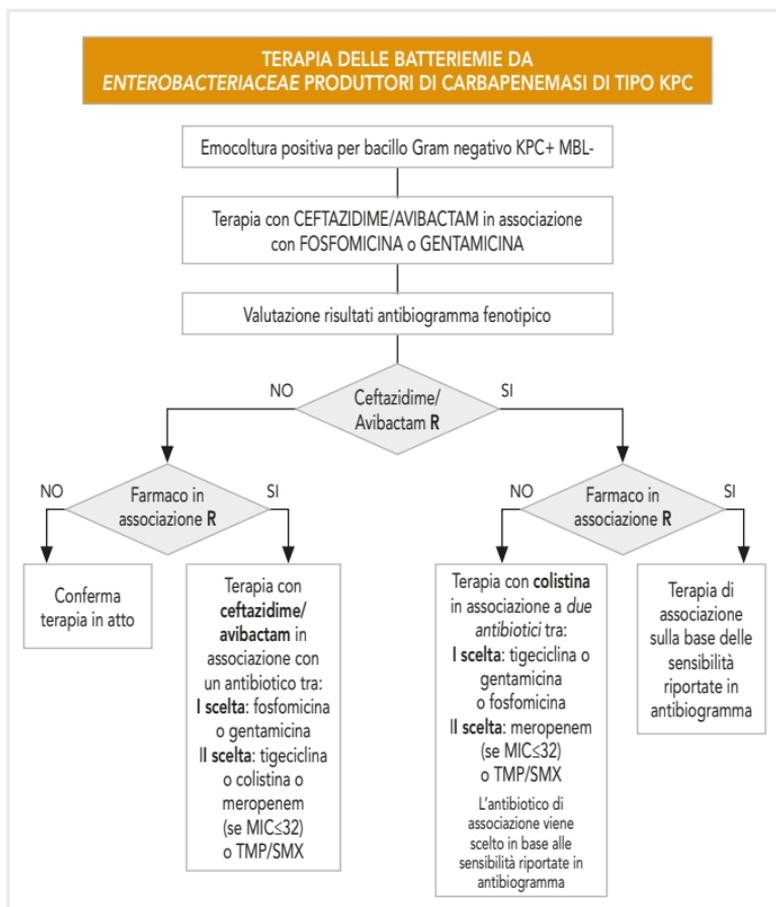
Legenda: CTX=Cefotaxima - CAZ=Ceftazidime - FOX=Cefoxitin - FEP=Cefepime

## Algoritmo terapia del paziente infetto con colonizzazione nota da *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi di tipo KPC



LEGENDA: In collaborazione con il Prof. Bartoloni, il Dr. Farese e la Dr.ssa Mantengoli - Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

## Algoritmo terapia delle batteriemie da *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi di tipo KPC



LEGENDA: In collaborazione con il Prof. Bartoloni, il Dr. Farese e la Dr.ssa Mantengoli - Azienda Ospedaliero Universitaria Careggi

## BIBLIOGRAFIA

1. European Centre for Disease Prevention and Control. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals. Stockholm: ECDC; 2013.
2. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, 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. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016; 66(12): 5575-99. doi: 10.1099/ijsem.0.001485. Epub 2016 Sep 11.
3. www. Eucast.org. EUCAST Expert Rules Version 3.1. Intrinsic Resistance and Exceptional Phenotypes Table 1.
4. Bonomo RA.  $\beta$ -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017; 7(1). pii: a025239. doi: 10.1101/cshperspect.a025239.
5. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(8): 2145-55. doi: 10.1093/jac/dkx146.
6. Rossolini GM, Docquier JD. New  $\beta$ -lactamases: a paradigm for the rapid response of bacterial evolution in the clinical setting. *Future Microbiol*. 2006; 1(3): 295-308.
7. Jacoby GA. AmpC  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22(1): 161-82.
8. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med*. 2012; 27(2): 128-42.
9. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med*. 2012; 18(5): 263-72.
10. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, et al. Occurrence of car-

- bapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17(2): 153-63.
11. Giani T, Antonelli A, Caltagirone M, et al. Evolving beta-lactamase epidemiology in *Enterobacteriaceae* from Italian nationwide surveillance, October 2013: KPC-carbapenemase spreading among outpatients. *Euro Surveill.* 2017; 22(31). pii: 30583. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30583.
  12. Conte V, Monaco M, Giani T, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* from invasive infections in Italy: increasing diversity with predominance of the ST512 clade II sublineage. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(12): 3386-91. Epub 2016 Sep 1.
  13. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010; 13(6): 151-71.
  14. Monaco M, Giani T, Raffone M, et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 2014; 19(42). pii: 20939.
  15. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30(2): 557-96. doi: 10.1128/CMR.00064-16.
  16. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(10): 5696-703. doi: 10.1128/AAC.03110-14.
  17. Sun J, Zhang H, Liu YH, et al. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. *Trends Microbiol.* 2018. pii: S0966-842X(18)30042-8.
  18. Schwarz S, Johnson AP. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(8): 2066-70. doi: 10.1093/jac/dkw274. Epub 2016 Jun 24.
  19. Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, et al. Fosfomicin. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(2): 321-47. doi: 10.1128/CMR.00068-15.

20. Kaase M, Szabados F, Anders A, et al. Fosfomycin susceptibility in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from Germany. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(6): 1893-7. doi: 10.1128/JCM.03484-13. Epub 2014 Mar 19. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2014; 52(8): 3135.
21. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, et al. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2011; 37(5): 415-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012. Epub 2011 Mar 22.
22. Silver LL. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017; 7(2). pii: a025262. doi: 10.1101/cshperspect.a025262.
23. Wong D, van Duin D. Novel Beta-Lactamase Inhibitors: Unlocking Their Potential in Therapy. *Drugs.* 2017; 77(6): 615-628. doi: 10.1007/s40265-017-0725-1.
24. Shields RK, Nguyen MH, Press EG, et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance and Restoration of Carbapenem Susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K pneumoniae*: A Case Report and Review of Literature. *Open Forum Infect Dis.* 2017; 4(3): ofx101. doi: 10.1093/ofid/ofx101.
25. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20 Suppl 1: 1-55. doi: 10.1111/1469-0691.12427.
26. Tischendorf J, de Avila RA, Safdar N. Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A systematic review. *Am J Infect Control.* 2016; 44(5): 539-43. doi: 10.1016/j.ajic.2015.12.005. Epub 2016 Feb 15.
27. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29(1): 1-27. doi: 10.1128/CMR.00108-14.
28. Fonseca EL, Ramos ND, Andrade BG, et al. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiellavariicola*,

- and *Klebsiella* quasipneumoniae in the clinical routine. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 87(4): 315-317.
29. www.eucast.org, EUCAST warnings concerning antimicrobial susceptibility testing products or procedures.
  30. www.eucast.org, clinical breakpoints table.
  31. Camarlinghi G, Parisio EM, Antonelli A, et al. Discrepancies in fosfomycin susceptibility testing of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with various commercial methods. In press: *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases* 2018.
  32. Arena F, Giani T, Pollini S, et al. Molecular antibiogram in diagnostic clinical microbiology: advantages and challenges. *Future Microbiol.* 2017; 12: 361-364. doi: 10.2217/fmb-2017-0019.
  33. Ledebouer NA, Lopansri BK, Dhiman N, et al. Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *J Clin Microbiol.* 2015; 53(8): 2460-72. doi: 10.1128/JCM.00581-15.
  34. Tenover FC, Canton R, Kop J, et al. Detection of colonization by carbapenemase-producing Gram-negative Bacilli in patients by use of the Xpert MDRO assay. *J Clin Microbiol.* 2013; 51(11): 3780-7. doi: 10.1128/JCM.01092-13.
  35. Glupczynski Y, Jousset A, Evrard S, et al. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(7): 1955-1960.
  36. Riccobono E, Antonelli A, Pecile P, et al. Evaluation of the KPC K-SeT® immunochromatographic assay for the rapid detection of KPC carbapenemase producers from positive blood cultures. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(2): 539-540. doi: 10.1093/jac/dkx406.
  37. Pancholi P, Carroll KC, Buchan BW, et al. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *J Clin Microbiol.* 2018; 56(4). pii: e01329-17. doi: 10.1128/JCM.01329-17.

38. Zhanel GG, Chung P, Adam H, et al. Ceftolozane/Tazobactam: A Novel Cephalosporin/ $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combination with Activity Against Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Drugs*. 2014; 74: 31-51.
39. Moya B, Beceiro A, Cabot G, et al. Pan- $\beta$ -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(9): 4771-8.
40. Moulds N, Lister P. Impact of characterized resistance mechanisms on the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to CXA-101 [abstract no. C1-1415 plus poster]. 50<sup>th</sup> Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 12-15 Sep 2010; Boston.
41. Moya B, Zamorano L, Juan C, et al. Activity of a new cephalosporin, CXA-101 (FR264205), against  $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants selected in vitro and after antipseudomonal treatment of intensive care unit patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3): 1213-7.
42. Riera E, Macia MD, Mena A, et al. Anti-biofilm and resistance suppression activities of CXA-101 against chronic respiratory infection phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65(7): 1399-404.
43. Fraile-Ribot PA, Mulet X, Cabot G, et al. In Vivo Emergence of Resistance to Novel Cephalosporin- $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations through the Duplication of Amino Acid D149 from OXA-2  $\beta$ -Lactamase (OXA-539) in Sequence Type 235 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; doi: 10.1128/AAC.01117-17.
44. Haidar G, Philips NJ, Shields RK, et al. Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. *Clin Infect Dis*. 2017; 65: 110-20.
45. MacVane SH, Pandey R, Steed LL, et al. Emergence of Ceftolozane-Tazobactam Resistant *Pseudomonas aeruginosa* During Treatment is Mediated by a Single AmpC Structural Mutation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(12): e01183-17.

46. Berrazeg M, Jeannot K, Ntsogo Enguéné VY, et al. Mutations in  $\beta$ -Lactamase AmpC Increase Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 6248-55.
47. Cabot G, Bruchmann S, Mulet X, et al. *Pseudomonas aeruginosa* ceftolozane-tazobactam resistance development requires multiple mutations leading to overexpression and structural modification of AmpC. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 3091-9.
48. Giani T, Arena F, Pollini S, et al. Italian nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* from invasive infections: activity of ceftolozane/tazobactam and comparators, and molecular epidemiology of carbapenemase producers. *J Antimicrob Chemother.* 2017; doi: 10.1093/jac/dkx453.
49. Castanheira M, Duncan LR, Mendes RE, et al. Activity of Ceftolozane-Tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* isolates collected from Respiratory Tract Specimens of Hospitalized Patients in the United States during 2013 to 2015. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(3): e02125-17.
50. Livermore DM, Mushtaq S, Meunier D, et al. Activity of ceftolozane/tazobactam against surveillance and 'problem' *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* and non-fermenters from the British Isles. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 2278-89.
51. Armstrong ES, Farrell DJ, Palchak M, et al. In vitro activity of ceftolozane-tazobactam against anaerobic organisms identified during the ASPECT-clAI Study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 60: 666-8.
52. Gonzalez MD, Wallace MA, Hink T, et al. Ceftolozane-tazobactam activity against phylogenetically diverse *Clostridium difficile* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 7084-5.
53. Craig WA, Andes DR. *In vivo* activities of ceftolozane, a new cephalosporin, with and without tazobactam against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae*, including strains with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, in the thighs of neutropenic mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 1577-82.
54. MacGowan AP, Noel AR, Tomaselli SG, et al. Pharmacodynam-

- ics of Ceftolozane plus Tazobactam Studied in an In Vitro Pharmacokinetic Model of Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 60: 515-21.
55. Xiao AJ, Miller BW, Huntington JA, et al. Ceftolozane/tazobactam pharmacokinetic/pharmacodynamic-derived dose justification for phase 3 studies in patients with nosocomial pneumonia. *J Clin Pharmacol*. 2016; 56: 56-66.
  56. Monogue ML, Pettit RS, Muhlebach M, et al. Population Pharmacokinetics and Safety of Ceftolozane-Tazobactam in Adult Cystic Fibrosis Patients Admitted with Acute Pulmonary Exacerbation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 6578-84.
  57. Lucasti C, et al. Multicenter, double-blind, randomized, phase II trial to assess the safety and efficacy of ceftolozane-tazobactam plus metronidazole compared with meropenem in adult patients with complicated intra-abdominal infections. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58, 9: 5350-7.
  58. Solomkin J, et al. Ceftolozane/tazobactam plus metronidazole for complicated intra-abdominal infections in an era of multidrug resistance: results from a randomized, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-clAI). *Clinical Infectious Diseases*. 2015; 60, 10: 1462-71.
  59. Miller B, Popejoy MW, Hershberger E, et al. Characteristics and outcomes of complicated intra-abdominal infections involving *Pseudomonas aeruginosa* from a randomized, double-blind, phase 3 ceftolozane-tazobactam study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 4387-90.
  60. Wagenlehner FM, et al. Ceftolozane-tazobactam compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary-tract infections, including pyelonephritis: a randomised, double-blind, phase 3 trial (ASPECT-cUTI). *The Lancet*. 2015; 385, 9981: 1949-56.
  61. Huntington JA, et al. Efficacy of ceftolozane/tazobactam versus levofloxacin in the treatment of complicated urinary tract infections (cUTIs) caused by levofloxacin-resistant pathogens: results from the ASPECT-cUTI trial. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016; 71: 2014-21.
  62. Popejoy MW, Paterson DL, Cloutier D, et al. Efficacy of ceftolozane/tazobactam against urinary tract and intraabdom-

- inal infections caused by ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: a pooled analysis of Phase 3 clinical trials. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72: 268-72.
63. Giacobbe DR, Bassetti M, de Rosa FG, et al. Ceftolozane/tazobactam: place in therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018; 1-14 (Epub ahead of print).
  64. Ehmann DE, Jahic H, Ross PL, et al. Avibactam is a covalent, reversible, non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109: 11663-8.
  65. Coleman K. Diazabicyclooctanes (DBOs): a potent new class of non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Curr Opin Microbiol.* 2011; 14: 550-5.
  66. Stachyra T, Pechereau MC, Bruneau JM, et al. Mechanistic studies of the inactivation of TEM-1 and P99 by NXL104, a novel non- $\beta$ -lactam  $\beta$ -lactamase inhibitor. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy.* 2010; 54: 5132-5138A.
  67. Lagace-Wiens P, Walkty A, Karlowsky JA. Ceftazidime-avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Core Evid.* 2014; 9: 13-25.
  68. Haider G, Clancy CJ, Chen L, et al. Identifying Spectra of Activity and Therapeutic Niches for Ceftazidime- Avibactam and Imipenem-Relebactam against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(9): e00642.
  69. Compain F, Arthur M. Impaired inhibition by Avibactam and resistance to the Ceftazidime-Avibactam combination due to the D179Y substitution in the KPC-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(7): e00451-17.
  70. Shields RK, Chen L, Cheng S, et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(3): e02097-16.
  71. Humphries RM, Hemarajata P. Resistance to ceftazidime-avibactam in *Klebsiella pneumoniae* due to porin mutations and the increased expression of KPC-3. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 doi: 10.1128/AAC.00537-17.

72. Zhanel G, Brunham R. Third-generation cephalosporins. *Can J Hosp Pharm.* 1988; 41(4): 183-94.
73. Merdjan H, Tarral A, Girard A, et al. Safety, single dose pharmacokinetics, and pharmacodynamics of  $\beta$ -lactamase inhibitor NXL104 in healthy young male adults [abstract no. A-809 plus poster]. In: 47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2007 Sep 17-20. Chicago (IL).
74. Das S, Li J, Armstrong J, et al. Randomized pharmacokinetic and drug-drug interaction studies of ceftazidime, avibactam, and metronidazole in healthy subjects. *Pharmacol Res Persp.* 2015; 3(5): e00172.
75. Chandorkar G, Huntington JA, Gotfried MH, et al. Intrapulmonary penetration of ceftolozane/tazobactam and piperacillin/tazobactam in healthy adult subjects. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(10): 2463-9.
76. Mazuki JE, Gasink LB, Armstrong J, et al. Efficacy and Safety of Ceftazidime-Avibactam Plus Metronidazole Versus Meropenem in the Treatment of Complicated Intra-abdominal Infection: Results From a Randomized, Controlled, Double-Blind, Phase 3 Program. *Clin Infect Dis.* 2016; 62: 1380.
77. Wagenlehner FM, Sobel JD, Newell P, et al. Ceftazidime-avibactam Versus Doripenem for the Treatment of Complicated Urinary Tract Infections, Including Acute Pyelonephritis: RECAPTURE, a Phase 3 Randomized Trial Program. *Clin Infect Dis.* 2016; 63(6): 754-62.
78. Carmeli Y, Armstrong J, Laud PJ, et al. Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a randomised, pathogen-directed, phase 3 study. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(6): 661-73.
79. Torres A, Zhong N, Pacht J, et al. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomised, double-blind, phase 3 non-inferiority trial. *Lancet Infect Dis.* 2018; 18(3): 285-95.
80. Shields RK, Nguyen MH, Chen L, et al. Ceftazidime-Avibact-

- am is Superior to other treatment regimens against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(8): e00883-17.
81. King M, Heil E, Kuriakose S, et al. Multicenter study of outcomes with Ceftazidime-Avibactam in patients with Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(7): e00449-17.
  82. Temkin E, Torre-Cisneros J, Beovic B, et al. Ceftazidime-Avibactam as Salvage Therapy for Infections Caused by Carbapenem-Resistant Organisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(2): e01964-16.
  83. de Jonge Boudewijn LM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, et al. In Vitro Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam of Carbapenem- Nonsusceptible *Enterobacteriaceae* Isolates Collected during the INFORM Global Surveillance Study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(5): 3163.
  84. Marshall S, Hujer AM, Rojas LJ, et al. Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam overcome  $\beta$ -lactam resistance conferred by Metallo- $\beta$ -Lactamases in *Enterobacteriaceae*? *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(4): e02243-16.
  85. Wenzler E, Deraedt MF, Harrington AT, et al. Synergistic activity of ceftazidime-avibactam and aztreonam against serine and metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 88: 352-4.
  86. Davido B, Fellous L, Lawrence C, et al. Ceftazidime-avibactam and aztreonam, an interesting strategy to overcome  $\beta$ -lactam resistance conferred by metallo- $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61: e0100-17.
  87. Jayol A, Nordmann P, Poirel L, et al. Ceftazidime/avibactam alone or in combination with aztreonam against colistin-resistant and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73(2): 542-4.
  88. Rodriguez-Bano J, Gutierrez-Gutierrez B, Machuca I, et al. Treatment of infections caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31(2): e00079-17.

89. Van Duin D, Lok JL, Earley M, et al. Colistin Versus Ceftazidime-Avibactam in the Treatment of Infections Due to Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis*. 2018; 66: 163.
90. Shields RK, Nguyen MH, Chen L, et al. Pneumonia and renal replacement therapy are risk factors for ceftazidime-avibactam treatment failures and resistance among patients with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; doi: 10.1128/AAC.02497-17.
91. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleki LS, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58: 2322-8.
92. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Piperaki E, et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 862-72.
93. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*. 2012; 55: 943-50.
94. Hecker SJ, Reddy KR, Totrov M, et al. Discovery of a cyclic boronic acid  $\beta$ -lactamase inhibitor (RPX7009) with utility versus class A serine carbapenemases. *J Med Chem*. 2015; 58: 3682-92.
95. Lomovskaya O, Tsivkovski R. Vaborbactam (RPX7009) plus meropenem is active against the newly discovered BKC-1 and FR-1 carbapenemases, abstr P1289. 2017; Abstr 27th Eur Congr Clin Microbiol Infect Dis. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Basel, Switzerland.
96. Castanheira M, Rhomberg PR, Flamm RK, et al. Effect of the  $\beta$ -Lactamase Inhibitor Vaborbactam Combined with Meropenem against Serine Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(9): 5454.
97. Lomovskaya O, Sun D, Rubio-Aparicio D, et al. Vaborbactam: Spectrum of  $\beta$ -Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(11): e01443-17.

98. Clancy CJ, Chen L, Hong JH, et al. Mutations of the ompK36 porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 5258 -65.
99. Shields RK, Nguyen MH, Potoski BA, et al. Doripenem MICs and ompK36 porin genotypes of sequence type 258, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* may predict responses to carbapenem-colistin combination therapy among patients with bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 1797-801.
100. Garcia-Fernandez A, Villa L, Carta C, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 2143-5.
101. Sun D, Rubio-Aparicio D, Nelson K, et al. Meropenem-Vaborbactam Resistance Selection, Resistance Prevention, and Molecular Mechanisms in Mutants of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(12): e01694-17.
102. Castanheira M, Huband MD, Mendes RE, et al. Effect of the  $\beta$ -Lactamase Inhibitor Vaborbactam Combined with Meropenem against Serine Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(9): 5454.
103. Hackel MA, Lomovskaya O, Dudley MN, et al. *In vitro* activity of Meropenem-Vaborbactam against clinical isolates of KPC-Positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(1): e01904-17y.
104. Pfaller MA, Huband MD, Mendes RE, et al. *In vitro* activity of meropenem-vaborbactam and characterization of carbapenem resistance mechanisms among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from the 2015 meropenem-vaborbactam surveillance program. *Int J Antimicrob Agents.* 2018; doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.02.021. [Epub ahead of print].
105. Kaye KS, Bhowmick T, Metallidis S, et al. Effect of Meropenem-Vaborbactam vs Piperacillin-Tazobactam on Clinical Cure or Improvement and Microbial Eradication in Complicated Urinary Tract Infection The TANGO I Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2018; 319(8): 788-99.

106. Wunderink R, Giomarellos-Bourboulis E, Rahav G, et al. Meropenem-Vaborbactam vs. Best Available Therapy for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections in TANGO II: Primary Outcomes by Site of Infection. *OFID*. 2017; 4 (Suppl. 1): S536-S537.
107. Lucasti C, Vasile L, Sandec D, et al. Phase 2, Dose-Ranging Study of Relebactam with Imipenem-Cilastatin in Subjects with Complicated Intra-abdominal Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(6): e02209-16.
108. Sims M, Mariyanovski V, McLeroth P, et al. Prospective, randomized, double-blind, Phase 2 dose-ranging study comparing efficacy and safety of imipenem/cilastatin plus relebactam with imipenem/cilastatin alone in patients with complicated urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72: 2616-26.
109. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S. Activity of MK-7655 combined with imipenem against *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 2286-90.
110. Lapuebla A, Abdallah M, Olafisoye O, et al. Activity of imipenem with relebactam against Gram-negative pathogens from New York City. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59: 5029-31.
111. Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, et al. In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam against Gram-Negative ESKAPE Pathogens Isolated by Clinical Laboratories in the United States in 2015 (Results from the SMART Global Surveillance Program). *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(6): e02209-16.
112. Haidar G, Clancy CJ, Chen L, et al. Identifying Spectra of Activity and Therapeutic Niches for Ceftazidime- Avibactam and Imipenem-Relebactam against Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(6): e00642-17.
113. Goldstein EJ, Citon DM, Tyrrell KL. Comparative In Vitro Activities of Relebactam, Imipenem, the Combination of the Two, and Six Comparator Antimicrobial Agents against 432 Strains of Anaerobic Organisms, Including Imipenem-Resistant Strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62(2): e01992-17.
114. Rizk ML, Rhee EG, Jumes PA, et al. Intrapulmonary Pharmacokinetics of Imipenem-Relebactam in Patients with Complicated Intra-abdominal Infections.

- kinetics of Relebactam, a Novel - Lactamase Inhibitor, Dosed in Combination with Imipenem- Cilastatin in Healthy Subjects. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(3): e01411-17.
115. Livermore DM, Mushtaq S, Warner M, et al. NXL104 combinations versus *Enterobacteriaceae* with CTX-M extended spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62: 1053-6.
  116. Crandon JL, Nicolau DP. Human Simulated Studies of Aztreonam and Aztreonam-Avibactam To Evaluate Activity against Challenging Gram-Negative Organisms, Including Metallo- $\beta$ -Lactamase Producers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(7): 3299.
  117. Biedenbach DJ, Kazmierczak K, Bouchillon SK, et al. In Vitro Activity of Aztreonam-Avibactam against a Global Collection of Gram-Negative Pathogens from 2012 and 2013. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(7): 4239.
  118. Vasoo S, Cunningham SA, Cole NC, et al. In Vitro Activities of Ceftazidime-Avibactam, Aztreonam-Avibactam, and a Panel of Older and Contemporary Antimicrobial Agents against Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(12): 7842.
  119. Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Hackel M, et al. Global Dissemination of blaKPC into Bacterial Species beyond *Klebsiella pneumoniae* and *In Vitro* Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam-Avibactam. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(8): 4490.
  120. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment, *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 1987-94.
  121. Meini S, Laureano R, Tascini C, et al. Clinical outcome of elderly patients with bloodstream infections due to ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in an Italian Internal Medicine Ward. *Eur J Intern Med.* 2017 Oct 28. pii: S0953-6205(17)30422-3.
  122. De Rosa G, Pagani N, Fossatiet L, et al. The effect of inappropriate therapy on bacteremia by ESBL-producing bacteria, *Infection.* 2011; 39: 555-61.

123. Chopra T, Marchaim D, Veltman J, et al. Impact of cefepime therapy on mortality among patients with bloodstream infections caused by extended-Spectrum- $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(7): 3936-42.
124. Tamma PD, Han JH, Rock C, et al. Antibacterial resistance leadership group. Carbapenem therapy is associated with improved survival compared with piperacillin-tazobactam for patients with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase bacteremia, *Clin Infect Dis.* 2015; 60(9): 1319-25.
125. Harris NA, Tambyah PA, Lye DC. Effect of Piperacillin-Tazobactam vs Meropenem on 30-Day Mortality for patients with *E coli* or *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection and Ceftriaxone Resistance. A randomized clinical trial. *JAMA.* 2018; 320(10): 984.
126. Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, et al. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2793-803.
127. Lee B, Kang SY, Kang HM, et al. Outcome of antimicrobial therapy of pediatric urinary tract infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Infect Chemother.* 2013; 45: 415-21.
128. Gutiérrez-Gutiérrez B, Bonomo RA, Carmeli Y, et al. Ertapenem for the treatment of bloodstream infections due to ESBL-producing *Enterobacteriaceae*: a multinational pre-registered cohort study. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71: 1672-80.
129. Elliott E, Brink AJ, van Greune J, et al. *In vivo* development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Clin Infect Dis.* 2006; 42: e95-e98.
130. Rodriguez-Bano J, Navarro MD, Retamar P, et al.  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -lactam inhibitor combinations for the treatment of bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli*: A post-hoc analysis of prospective cohorts. *Clin Infect Dis.* 2012; 54: 167-74.
131. Harris PNA, Yin M, Jureen R, et al. Comparable outcomes for  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations and carbapen-

- ems in definitive treatment of bloodstream infections caused by cefotaxime-resistant *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2015; 14:23.
132. Retamar P, Lopez-Cerero L, Munian M, et al. Impact of the MIC of Piperacillin-Tazobactam on the Outcome of Patients with Bacteremia Due to Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(7): 3402.
  133. Delgado-Valverde M, et al. Impact of the MIC of piperacillin/tazobactam on the outcome for patients with bacteraemia due to *Enterobacteriaceae*: the Bacteraemia-MIC project. *J Antimicrob Chemother*. 2016; 71: 521.
  134. Bassetti M, Rodriguez Bano J. Should we take into account ESBLs in empirical antibiotic treatment? *Intensive Care Med*. 2016; 42: 2059-62.
  135. Mazuski JE, Gasink LB, Armstrong J, et al. Efficacy and safety of ceftazidime-avibactam plus metronidazole versus meropenem in the treatment of complicated intra-abdominal infection: results from a randomized, controlled, double-blind, phase 3 program. *Clin Infect Dis*. 2016; 62: 1380-9.
  136. Mendes RE, Castanheira M, Woosley LN, et al. Molecular  $\beta$ -lactamase characterization of gram-negative pathogens recovered from patients enrolled in the ceftazidime-avibactam phase 3 trials (RECAPTURE 1 and 2) for complicated urinary tract infections: Efficacies analysed against susceptible and resistant subsets. *Int J Antimicrob Agents*. 2018; doi: 10.1016/j.ijantimicag.2018.04.001.
  137. Stone GG, Newell P, Gasink LB, et al. Clinical activity of ceftazidime/avibactam against MDR *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*: pooled data from the ceftazidime/avibactam Phase III clinical trial programme. *J Antimicrob Chemother*. 2018; doi: 10.1093/jac/dky204.
  138. Flamm RK, Farrell DJ, Sader HS, et al. Ceftazidime-avibactam activity tested against select Gram-negative organisms from a global surveillance programme (2011) in relation to the ceftazidime epidemiologic cut-off value. In: Abstracts of the Twenty-fourth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Barcelona, Spain, 2014. eP435. ESCMID, Basel, Switzerland.

139. Pangon B, Bizet C, Buré AA, et al. *In vivo* selection of a cephamycin-resistant, porin-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae* producing a TEM-3  $\beta$ -lactamase. *J Infect Dis.* 1989; 159: 1005-6.
140. Lee CH, Su LH, Chen FJ, et al. Comparative effectiveness of flomoxef versus carbapenems in the treatment of bacteraemia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase - producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* with emphasis on minimum inhibitory concentration of flomoxef: a retrospective study. *Int J Antimicrob Agents.* 2015; 46: 610-5.
141. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, et al. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31(2).
142. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, et al. *Enterobacter* bacteremia: clinical features and emergence of antibiotic resistance during therapy. *Ann Intern Med.* 1991; 115(8): 585-90.
143. Kaye KS, Cosgrove S, Harris A, et al. Risk factors for emergence of resistance to broad-spectrum cephalosporins among *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(9): 2628-30.
144. Tamma PD, Girdwood SC, Gopaul R, et al. The use of cefepime for treating AmpC $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis.* 2013; 57(6): 781-8.
145. Lee NY, Lee CC, Li CW, et al. Cefepime Therapy for Monomicrobial *Enterobacter cloacae* Bacteremia: Unfavorable Outcomes in Patients Infected by Cefepime-Susceptible Dose-Dependent Isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(12): 7558-63.
146. Harris PN, Wei JY, Shen AW, et al. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bloodstream infections caused by *Enterobacter*, *Citrobacter* or *Serratia* species: a systematic review with meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71(2): 296-306.
147. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25: 682-707.

148. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem- hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 2011; 6: 653-66.
149. Del Bono V, Giacobbe DR, Marchese A, et al. Meropenem for treating KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Should we get to the PK/PD root of the paradox? *Virulence.* 2017; 8(1): 66-73.
150. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect.* 2012; 17: 1135-41.
151. Pea F, et al. Might real-time pharmacokinetic/pharmacodynamic optimisation of high-dose continuous-infusion meropenem improve clinical cure in infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*? *Int J Antimicrob Agents.* 2017; 49(2): 255-8.
152. Gomez-Simmonds A, Nelson B, Eiras DP, et al. Combination regimens for treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 3601-7.
153. Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, de Cueto M, et al. REIPI/ESGBIS/INCREMENT Investigators. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (INCREMENT): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2017; 17: 726-34.
154. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3881-9.
155. Hidalgo-Grass C, Warburg G, Temper V, et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(11): 6057-9.
156. Fredborg M, Sondergaard TE, Wang M. Synergistic activities of meropenem double and triple combinations against carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017; 88: 355-60.
157. De Pascale G, Martucci G, Montini L et al. Double carbapenem as a rescue strategy for the treatment of severe carbapene-

- mase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a two-center, matched case-control study. *Crit Care*. 2017; 21: 173.
158. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65: 1119-25.
  159. Paul M, et al. Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet Inf Dis* 2018; 18: 391-400.
  160. Dalfino L, Puntillo F, Ondok MJ, et al. Colistin-associated acute kidney injury in severely ill patients: a step toward a better renal care? A prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2015; 61: 1771-7.
  161. Leung LM, Cooper VS, Rasko DA, et al. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2017; doi: 10.1093/jac/dkx234.
  162. Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, et al. ISGRI-SITA (Italian Study Group on Resistant Infections of the Società Italiana Terapia Antinfettiva). Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case-control-control study. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21: 1106. e1-1106.e8.
  163. Capone A, Giannella M, Fortini D, et al. SEERBIO-GRAB Network. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect*. 2013; 19: E23-E30.
  164. Can F, Menekse S, Ispir P, et al. Impact of the ST101 clone on fatality among patients with colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2018; doi: 10.1093/jac/dkx532.
  165. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, et al. mcr-1.2, a new mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60: 5612-5.
  166. Louise A, Maynard M, Duncanson B, et al. Determination of

- the Dynamically Linked Indices of Fosfomycin for *Pseudomonas aeruginosa* in the Hollow Fiber Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62(6): e02627-17.
167. Heavner MS, Claeys KC, Masich AM, et al. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations of Antibiotics of Last Resort in Treating Gram-Negative Infections in Adult Critically Ill Patients. *Curr Infect Dis Reports.* 2018; 20: 10.
  168. Karageorgopoulos DE, Miriagou V, Tzouveleakis LS, et al. Emergence of resistance to fosfomycin used as adjunct therapy in KPC *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia: report of three cases. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2777-9.
  169. Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S, et al. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43: 52-9.
  170. Sbrana F, Malacarne P, Viaggi B, et al. Carbapenem-sparing antibiotic regimens for infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in intensive care unit. *Clin Infect Dis.* 2013; 56(5): 697-700.
  171. Alexandre K, Chau F, Gu erin F, et al. Activity of temocillin in a lethal murine model of infection of intra-abdominal origin due to KPC-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2016; 71: 1899-904.
  172. Woodford N, Pike R, Meunier D, et al. *In vitro* activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 564-7.
  173. European Medicines Agency (EMA). European public assessment report (EPAR) for Zavicefta. Last update June 2016. Available at: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Summary\\_for\\_the\\_public/human/004027/WC500210237.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/004027/WC500210237.pdf). Accessed 19 March 2018.
  174. Caston JJ, Lacort-Peralta I, Martin-Davila P, et al. Clinical efficacy of ceftazidime/avibactam versus other active agents for the treatment of bacteremia due to carbapenemase-producing

- Enterobacteriaceae* in hematologic patients. *Int J Infect Dis.* 2017; 59: 118-23.
175. van Duin D, Lok JJ, Earley M, et al. Antibacterial Resistance Leadership Group. Colistin vs. ceftazidime-avibactam in the treatment of infections due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis.* 2018; 66: 163-71.
  176. Tumbarello M, Trecarichi EM, Corona A, et al. Efficacy of Ceftazidime-avibactam Salvage Therapy in Patients with Infections Caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2018; doi: 10.1093/cid/ciy492.
  177. Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant kpc-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(8): 3990-3.
  178. Andes D, Craig WA. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 11 (Suppl. 6): 10-7.
  179. Shields RK et al. Pneumonia and RRT are risk Factors for ceftazidime-avibactam treatment failures and resistance among patients with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62: e02497-17.
  180. Abuhussain SS, Kuti JL, Nicolau DP. Antibacterial Activity of Human Simulated Epithelial Lining Fluid Concentrations of Ceftazidime-Avibactam Alone or in Combination with Amikacin Inhale (BAY41-6551) against Carbapenem Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 62: e00113-18.
  181. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, et al. European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015; 20(45): piiD30062;
  182. Panagiotakopoulou A, Daikos GL, Miriagou V, et al. Comparative in vitro killing of carbapenems and aztreonam against *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29: 360-2.
  183. MacVane SH, Crandon JL, Nichols WW, et al. Unexpected in vivo activity of ceftazidime alone and in combination with avi-

- bactam against New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in a murine thigh infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 7007-9.
184. Monogue ML, Abbo LM, Rosa R, et al. In vitro discordance with in vivo activity: humanized exposures of ceftazidime-avibactam, aztreonam, and tigecycline alone and in combination against New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a murine lung infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61: e00486-17.
185. Drawz SM, Papp-Wallace KM, Bonomo RA. New  $\beta$ -lactamase inhibitors: a therapeutic renaissance in an MDR world. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 1835-46.
186. Asli A, Brouillette E, Krause KM, et al. Distinctive binding of avibactam to penicillin-binding proteins of Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60: 752-6.
187. Rahme C, Butterfield JM, Nicasio AM, et al. Dual  $\beta$ -lactam therapy for serious Gram-negative infections: is it time to revisit? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 80: 239-59.
188. Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* 2017; 8: 460-9.
189. Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, et al. Efficacy of humanized carbapenem and ceftazidime regimens against *Enterobacteriaceae* producing OXA-48 carbapenemase in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58: 1678-83.





PP-ZVA-ITA-0071 – 28ZV265  
Depositato in AIFA in data 14/01/2019

EDIZIONI INTERNAZIONALI srl  
**EDMES**  
Edizioni Medico Scientifiche - Pavia

ISBN 978-88-88541-02-0