

INTRODUZIONE DI TECNICHE DI NUOVA GENERAZIONE PER LA CARATTERIZZAZIONE DEL MICROBIOMA AMBIENTALE E RESISTOMA IN AMBITO MATERNO-INFANTILE



Carolina Cason¹, Francesco Maria Risso², Manola Comar^{1,3}

¹ SSD Diagnostica Avanzata Microbiologica Traslazionale, Istituto Materno-Infantile IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste;
² SC Neonatologia, Istituto Materno-Infantile IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste;
³ Dipartimento di Scienze Mediche Chirurgiche e della Salute, Università degli Studi di Trieste, Trieste.

manola.comar@burlo.trieste.it

INTRODUZIONE

I neonati pretermine, per le loro caratteristiche, rappresentano un gruppo ad alto rischio di contrarre di infezioni associate all'assistenza (ICA), considerate tra le cause più frequenti e gravi di complicanze legate all'assistenza sanitaria, ad alto impatto socio-sanitario. Il problema delle ICA nei reparti neonatali è reso ancor più critico dallo sviluppo da parte dei batteri di resistenze ad antibiotici. A causa di sintomi clinici spesso non specifici nei neonati, gli antibiotici sono tra i farmaci più usati nei reparti di Terapia Intensiva Neonatale (TIN), spesso con terapia empirica. Negli ultimi anni c'è stato un crescente interesse nei confronti del ruolo dell'ambiente ospedaliero contaminato nella trasmissione di ICA. Le superfici contaminate fungono da serbatoio per molti agenti patogeni, anche provenienti dai pazienti stessi, e possono quindi essere una fonte per la trasmissione di infezioni. Il monitoraggio della composizione microbica in ambiente nosocomiale è condotto essenzialmente con metodologie a bassa sensibilità e specificità, mirate a specifici patogeni. Da ciò l'urgenza dell'implementazione dei sistemi di sorveglianza e di disinfezione ambientale con nuove tecniche.

METODI

Sono stati raccolti in totale 55 tamponi nasali da 30 neonati pretermine ricoverati presso il reparto di TIN dell'IRCCS Burlo Garofolo, indipendentemente dalle loro condizioni cliniche. Lo studio prospettico comprendeva: 30 tamponi al momento della nascita (gruppo N), 18 dopo 9 giorni (gruppo S) e 7 dopo 13 giorni (gruppo SA). Allo stesso tempo sono stati raccolti campioni dall'ambiente, (lavandini/carrelli medici, pediere dei letti e pavimenti). La caratterizzazione del microbioma è stata eseguita simultaneamente mediante:

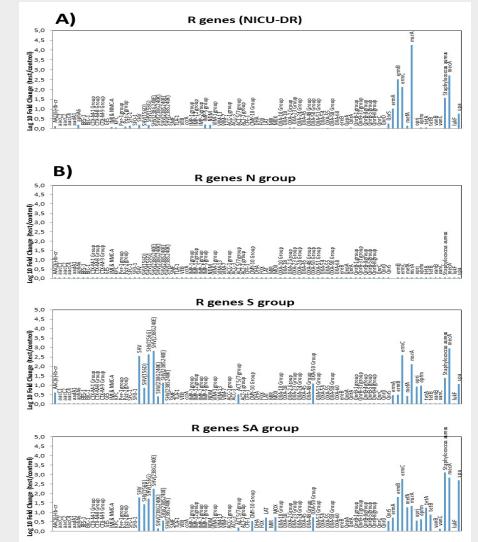
OBIETTIVO

Lo scopo di questo studio è di esplorare l'impatto del microbioma ambientale sulla colonizzazione del paziente pediatrico, mediante l'utilizzo di tecniche di nuova generazione, al fine di ottimizzare il management del paziente pediatrico, e prevenire l'insorgenza di resistenze agli antibiotici.

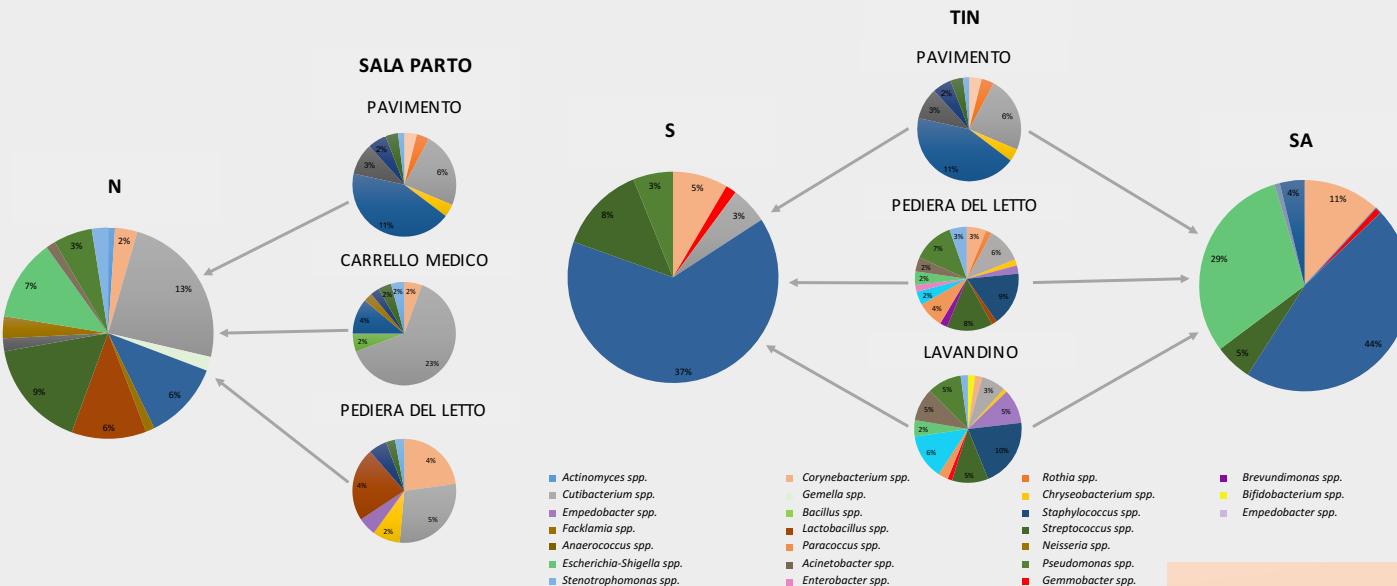
- Ion Torrent sequenziamento high-throughput Next Generation Sequencing (NGS) dell'rRNA 16s.
- Microarray PCR (qPCR) per l'identificazione di 21 microrganismi associati ad ICA.
- Array qPCR di DNA microbico per l'identificazione di geni di resistenza agli antibiotici

RISULTATI

Le analisi NGS dei tamponi nasali, confrontati con il microbioma ambientale dei reparti di origine, hanno mostrato una somiglianza tra il microbioma dei neonati e quello ambientale. In particolare, nella SALA PARTO, *Cutibacterium* spp. era presente con le più alte percentuali di abbondanza relativa nei tamponi nasali (N) rispetto ad altri generi, ed è stato rilevato alle più alte percentuali nei carrelli medici. *Staphylococcus* spp. ha mostrato un'abbondanza relativa del 6% nei tamponi nasali e rappresentava il principale contaminante del pavimento. Per quanto riguarda il microbioma ambientale della TIN, *Staphylococcus* spp., presente in tutte le superfici analizzate, è stato rilevato con le più alte percentuali di abbondanza relativa sia nei tamponi nasali del gruppo S, che del gruppo SA. *Escherichia-Shigella* spp., Presente nel 29% del gruppo SA, è stato rilevato principalmente nel pavimento. *Streptococcus* spp. aveva valori simili nei tamponi nasali nati e nelle superfici. Altri generi batterici presenti sia nei pazienti che nell'ambiente della TIN erano: *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp. e *Stenotrophomonas* spp. I risultati sono espressi come abbondanza relativa dei generi rilevati sui tre tipi di superfici considerate e nei tamponi nasali.

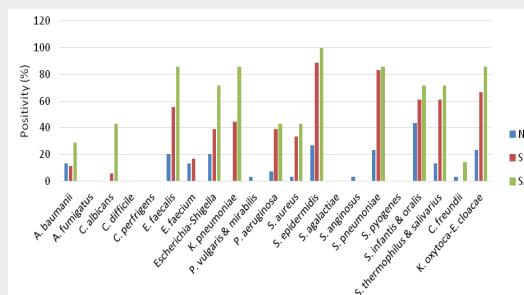


L'analisi comparativa del resistoma dei neonati ricoverati in TIN ha evidenziato un progressivo aumento nel tempo di ceppi batterici che hanno geni di resistenza ad antibiotici (R). Mentre nel microbioma nasale dei neonati alla nascita non sono stati rilevati geni R, dopo 9 (gruppo S) e 13 giorni (gruppo SA) di ricovero in ospedale, l'analisi ha rilevato la comparsa e l'aumento di geni R, la maggior parte dei quali erano presenti anche nel ambiente della TIN. I risultati sono espressi come Log₁₀ Fold Change (Test / NTC) per ciascun gene R.



Le analisi effettuate con **microarray qPCR** hanno consentito l'identificazione di batteri fino a livello di specie, evidenziando un progressivo aumento della positività per specifici microrganismi nei tamponi nasali di neonati ricoverati nel reparto di TIN nel tempo. In particolare, all'interno del genere

Staphylococcus le specie principali erano *aureus* ed *epidermidis*. Invece, all'interno del genere *Streptococcus* il le specie più frequentemente rilevate erano *pneumoniae*, *infantis*, *oralis* e *salivarius*, con tassi di identificazione più elevati nel gruppo SA. Questo il metodo ha anche permesso l'identificazione del fungo *Candida albicans* nei gruppi S e SA, ma non nel gruppo N. I dati sono rappresentati come percentuale di pazienti positivi sul totale, per ciascun gruppo.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Sulla base delle analisi molecolari, questo studio evidenzia l'importanza di uno screening di routine per la caratterizzazione del microbioma ambientale.

L'introduzione di questo nuovo approccio è importante sia per il monitoraggio ambientale sia per la conseguente gestione clinica dei pazienti pediatrici. Conoscere le principali specie microbiche in un reparto, nonché i geni che conferiscono resistenza agli antibiotici, può rappresentare un vantaggio e un utile strumento per definire protocolli terapeutici mirati. Inoltre, i dati dello screening ambientale rappresentano un'impronta microbiologica per attivare azioni mirate alla prevenzione di possibili outbreak. Da cui l'esigenza di introdurre sistemi di pulizia alternativi atti a ridurre il livello di colonizzazione ambientale e a limitare la colonizzazione del paziente.

BIBLIOGRAFIA

Caselli E et al. Impact of a Probiotic-Based Cleaning Intervention on the Microbiota Ecosystem of the Hospital Surfaces: Focus on the Resistome Remodulation; PLoS One 2016