



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Bologna, 19 Aprile 2023

Oggetto: Relazione sulle attività ed obiettivi raggiunti nell'ambito del protocollo di studio: "*Microbiota intestinale e rischio di infezione da Enterobacteriaceae resistenti ai carbapenemi in pazienti sottoposti a trapianto di fegato*" finanziato dalla Fondazione Fornasini (bando 2018).

Grazie al finanziamento, le attività portate a termine per la realizzazione dello studio sono state:

- Avvio di un assegno di ricerca per un medico specialista infettivologo responsabile dell'arruolamento pazienti, monitoraggio procedure dello studio, e raccolta dei campioni e dei dati clinici. Borsa avviata a Giugno 2019 per la durata di un anno.
- Presentazione del protocollo di studio al Comitato Etico di Area Vasta Emilia Romagna con codice n°279/2018/Sper/AOUBo e scioglimento delle condizioni per l'inizio dello studio in data 03/12/2018. Durante il periodo di ricerca è stato inoltre deciso di ampliare la raccolta dati al fine di valutare e descrivere l'eventuale sviluppo di infezione nel primo mese dopo il trapianto di fegato anche da batteri non produttori di carbapenemasi, ipotizzando che tale evento sia da attribuire all'importante alterazione del microbioma intestinale in tale arco temporale. A tale scopo è stata effettuata formale richiesta di emendamento al Comitato Etico attraverso la modifica della documentazione e la sottomissione della stessa (Approvazione da parte del Comitato Etico dell'emendamento 01 dello studio EM210/2020\_279/2018/Sper/AOUBo valutato il 24/02/2020).
- Coordinamento con l'Unità Operativa di *Microbial Ecology of Health*, Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie - Università di Bologna diretta dalla Professoressa Patrizia Brigidi in merito a raccolta, consegna e stoccaggio dei campioni di materiale fecale dei pazienti arruolati nello studio.
- Attività di formazione del personale medico ed infermieristico coinvolto nello studio: in particolare è stata portata a termine la formazione del personale infermieristico coinvolto nello studio relativamente alla modalità di raccolta dei campioni biologici (campioni di feci ed esecuzione di tampone mucosa rettale), loro conservazione e timing di esecuzione.
- Screening e arruolamento dei pazienti sottoposti a trapianto di fegato presso il Policlinico Sant'Orsola Malpighi. I pazienti sottoposti o in procinto di essere sottoposti ad OLT e



## DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

rispondenti ai criteri di inclusione del progetto sono stati informati degli obiettivi dello studio e per coloro i quali hanno accettato di partecipare è stato raccolto consenso informato scritto.

- Creazione di un database ed ivi inserimento dei dati raccolti: i dati epidemiologici, demografici e clinici dei pazienti arruolati nello studio sono stati raccolti mediante CRF cartacea e successivamente raccolti in un database elettronico per permetterne l'elaborazione.
- Analisi ed interpretazione dei risultati con redazione di un manoscritto in fase di sottomissione ad un peer reviewed Journal.

Di seguito le caratteristiche dello studio ed il report dei principali risultati raggiunti:

### *Caratteristiche dello studio:*

- Obiettivo dello studio è la descrizione delle caratteristiche del microbioma intestinale in pazienti sottoposti a trapianto di fegato in un arco temporale che va dal giorno del trapianto fino alla dimissione. Particolare attenzione è stata posta al sottogruppo di pazienti con colonizzazione e/o batteriemia rettale da *Enterobacteriales* produttrici di carbapenemasi (CRE). Per il raggiungimento dell'obiettivo sono stati raccolti campioni di feci durante tutto il periodo di studio e su questi è stata eseguita analisi del microbioma intestinale attraverso una metodica di amplificazione genica 16S rRNA. Per un sottogruppo di campioni è stata eseguita inoltre un'analisi di metagenomica e di resistomica.
- Disegno dello studio e Popolazione di studio: Si tratta di uno studio prospettico di coorte su pazienti adulti sottoposti a trapianto di fegato da Novembre 2018 a Gennaio 2020. Criteri di esclusione dello studio erano: l'esecuzione di trapianto multi-organo, il re-trapianto ed il rifiuto alla partecipazione allo studio.
- Procedure dello studio: Durante il periodo di studio, tutti i candidati al trapianto di fegato sono stati screenati con tamponi rettali per la ricerca di CRE al momento dell'inserimento in lista, in caso di ricovero in Ospedale o al momento del trapianto. Il tampone rettale è stato ripetuto settimanalmente durante il periodo di ricovero fino alla dimissione. Per l'analisi del microbioma intestinale, i tamponi rettali ed i campioni di feci sono stati affidati all'Unita Operativa di *Microbial Ecology of Health*. Il management del trapianto è stato eseguito secondo la normale pratica clinica.



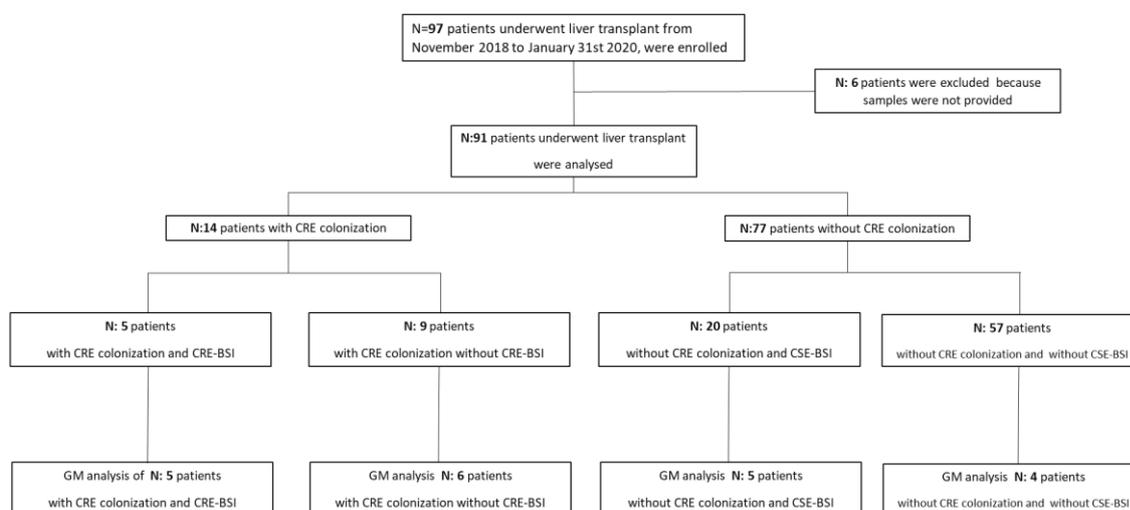
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

- Analisi del Microbioma Intestinale: l'estrazione del DNA dai campioni di feci è stata eseguita utilizzando il protocollo "bead-beating" (Yu and Morrison, 2004). Per quanto riguarda il sottogruppo di pazienti in cui è stata eseguita l'analisi del resistoma è stata utilizzata la shotgun metagenomics. Le "DNA libraries" sono state preparate utilizzando il kit QIAseq FX DNA Library Kit (QIAGEN).

*Risultati:*

Durante il periodo di studio sono stati sottoposti a trapianto di fegato 97 pazienti. Di questi, 6 pazienti sono stati esclusi dallo studio per la mancata raccolta del campione di feci. In totale sono stati arruolati 91 pazienti (Fig.1).

Fig.1bis Study Flow Chart



Le caratteristiche della popolazione di studio sono riassunte in tabella 1.

**Tabella 1. Caratteristiche della popolazione di studio.**

	<b>Total N=91 (%)</b>
<b>Demographic data</b>	
Age (years) (median, IQR)	58 (49-63)



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Sex, male	65 (71.4)
<b>Underlying liver disease</b>	
Viral hepatitis	53 (58.3)
HCV infection	29 (31.9)
HBV infection	24 (26.4)
Alcohol	28 (30.8)
Metabolic disease	21 (23.1)
Autoimmune disease	8 (8.8)
Fulminant hepatitis	2 (2.2)
HCC	49 (53.8)
MELD at inclusion in waiting list (median, IQR)	14 (10-19)
Time in waiting list (days) (median, IQR)	234 (69 - 577)
<b>Events within 90 days prior to LT</b>	
Antibiotic exposure	48 (52.7)
Bacterial infections	17 (18.7)
Hepato-renal syndrome	3 (3.3)
Ascites grade III/refractory	14 (15.4)
Bleeding	6 (6.6)
Encephalopathy	10 (11)
ACLF	12 (13.2)
Hospital admission	26 (28.6)
ICU admission	3 (3.3)
MELD at transplantation (days) (median, IQR)	16 (10-24)
<b>CMV serostatus mismatch</b>	
Donor recipient mismatch (D+/R-)	16 (17.6)
<b>Induction regimen</b>	
Bolus of steroids	91 (100)
Antithymocyte globulins	2 (2.2)
Rituximab	2 (2.2)
<b>Intraoperative complications</b>	
Prolonged operation (> 8 hours)	31 (34.1)
Intraoperative bleeding	18 (19.8)
Coledocojejunostomy	14 (15.4)
<b>Post-operative complications</b>	
Acute renal failure	37 (40.7)
Renal replacement therapy	18 (19.8)



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Prolonged mechanical ventilation (>48 hours)	10 (11)
Poor graft disfunction	17 (18.7)
Primary graft non function	2 (2.2)
Biliary procedure	3 (3.3)
Re-intervention	14 (15.4)
Rejection	5 (5.5)
<b>Outcome</b>	
Length of hospital stay (days) (median, IQR)	17 (12-31)
All cause 180-day mortality	3 (3.3)

Legenda: ACLF, acute-on-chronic liver failure; CMV, cytomegalovirus; D, donor; HBV, hepatitis B virus; HCC, Hepatocellular carcinoma; HCV, hepatitis C virus; ICU, intensive care unit; IQR, interquartile range; MELD, model of end-stage liver disease; R, recipient; LT, liver transplant.

Sul totale dei pazienti arruolati, 65 pazienti (71.4%) erano di sesso maschile con un'età mediana di 58 anni (IQR 49-63). Il motivo che ha portato all'esecuzione del trapianto era la presenza di una malattia epatica conseguente ad infezione da virus epatitici in 53/91 pazienti (58.3%), seguita da un'abuso alcolico in 28/91 (30.8%) pazienti. Circa la metà dei pazienti arruolati (49/91, 53.8%) presentava una neoplasia epatica (epatocarcinoma, HCC). Il valore mediano dello score MELD al momento del trapianto era di 16 (10-19). Fino ad un terzo del totale dei pazienti ha sviluppato dopo il trapianto un evento di natura infettiva (31, 34%), entro i 60 giorni dopo la procedura chirurgica (Tab2).

**Tabella 2. Caratteristiche delle infezioni batteriche sviluppatasi entro I 60 giorni dal trapianto di fegato.**

<b>Overall</b>	<b>31 (34.1)</b>
Gram positive	8 (25.8)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (3.2)
<i>Streptococcus spp.</i>	1 (3.2)
CoNS	2 (6.4)
<i>Enterococcus faecium</i>	4 (12.9)
Gram negative	23 (74.2)
<i>Enterobacteriaceae</i>	20 (64.5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13 (65)
<i>Escherichia coli</i>	6 (19.4)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (3.2)
<i>Enterobacter spp.</i>	3 (9.7)



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

Site of infection	
BSI	12 (38.7)
Primary BSI	4 (12.9)
Secondary to intra-abdominal	2 (6.5)
Secondary to urinary tract	2 (6.5)
Secondary to surgical site	1 (3.2)
CVC-related	3 (9.7)
Intra-abdominal infection	9 (29)
Lower respiratory infection	7 (22.6)
Urinary tract infection	4 (12.9)
Surgical site infection	4 (12.9)
Time from LT to infection (days) (median, IQR)	15 (7 - 29)

Legenda: BSI, bloodstream infection; CoNS, coagulase-negative staphylococci; CVC, central venous catheter; IQR, interquartile range; LT, liver transplant.

Su tutti i pazienti analizzati, 14 (15.4%) sono stati identificati colonizzati da CRE durante il periodo di studio. Di questi, 5 (5.5%) erano colonizzati al momento del trapianto, i rimanenti 9 (9.9%) hanno sviluppato la colonizzazione con una mediana di 31 giorni (19-62) dal trapianto. Tra i colonizzati da CRE, 5/14 (35.7%) hanno sviluppato un'infezione da CRE entro 31 (3-46.5) giorni dal trapianto. Le complicanze chirurgiche più comuni sono presentate in Tab.1. La mortalità cruda a 180 giorni è stata del 6.2%.

Come già spiegato, per ogni paziente sono stati raccolti campioni di feci dal momento del trapianto (T0) e poi settimanalmente fino ad un mese dalla procedura chirurgica (T1 - T4), per un totale di 430 campioni per l'esecuzione del profilo del microbioma intestinale. Si segnala che 25 campioni sono risultati missing al momento dell'analisi.

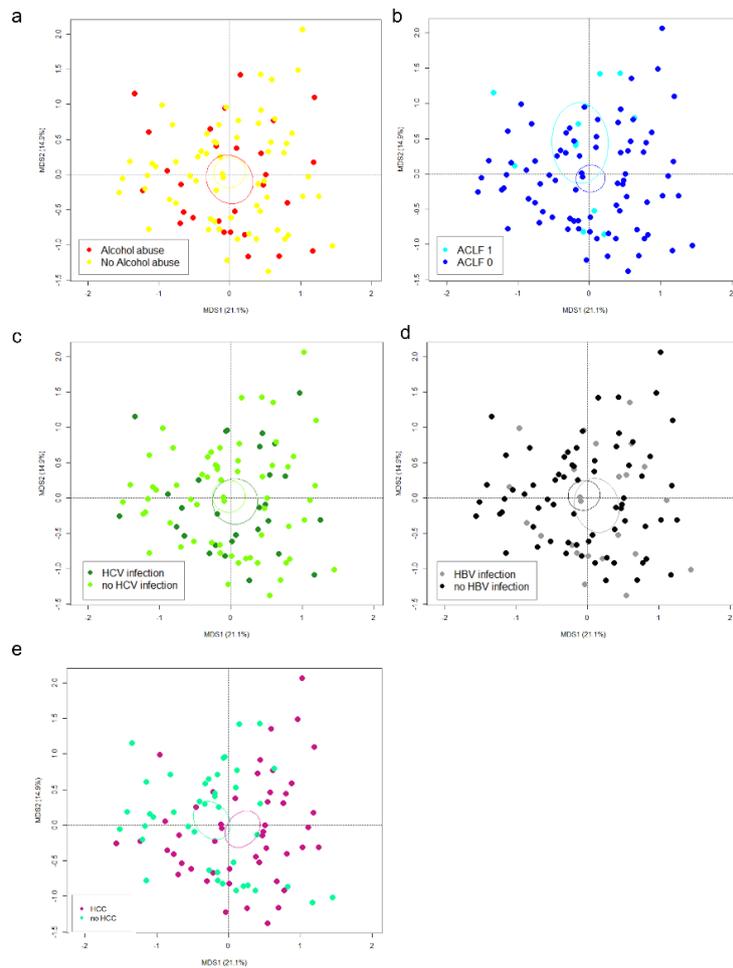
#### *Analisi del Microbioma Intestinale*

Il sequenziamento genico in 16S rRNA di tutti i campioni fecali ha portato all'analisi di 9.745.201 *2high-quality reads*". Una prima analisi è stata fatta per valutare il profilo del GM dei 91 pazienti al T0 in relazione alle condizioni che hanno portato al trapianto (Figura 1).

**Figura 1: Baseline del GM stratificato per la patologia di base che ha portato al trapianto di fegato.**



## DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE



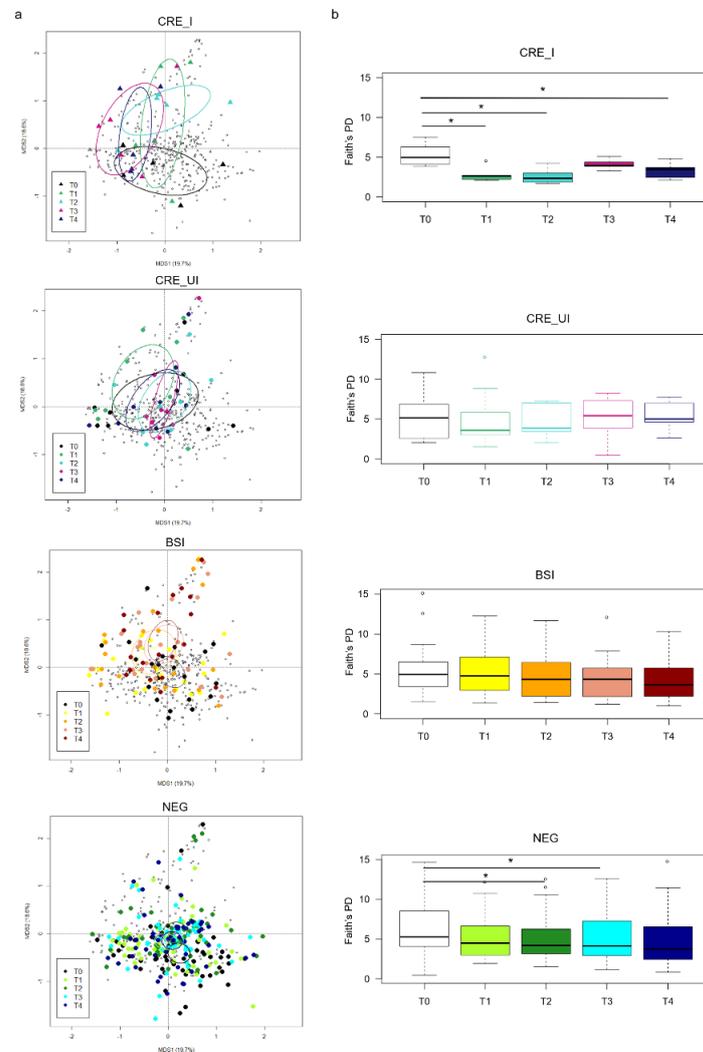
*Legenda: Analisi del GM stratificato in base alle condizioni di base del paziente: abuso alcolico (a), scompenso epatico acuto su cronico (b), infezione da HCV (c), infezione da HBV, infezione batterica e presenza di HCC (e).*

Successivamente, l'analisi del GM è stata eseguita suddividendo i pazienti in 4 gruppi: i) pazienti con colonizzazione da CRE che hanno sviluppato BSI dallo stesso microrganismo (CRE\_I); pazienti con colonizzazione da CRE senza BSI da CRE (CRE\_UI); pazienti senza colonizzazione da CRE che hanno sviluppato BSI da *Enterobacterales* non resistenti ai carbapenemi (BSI); pazienti senza colonizzazione da CRE e senza episodi di BSI (NEG) (Figura 2).

### **Figura 2: Analisi del GM nei quattro gruppi di studio**



## DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE



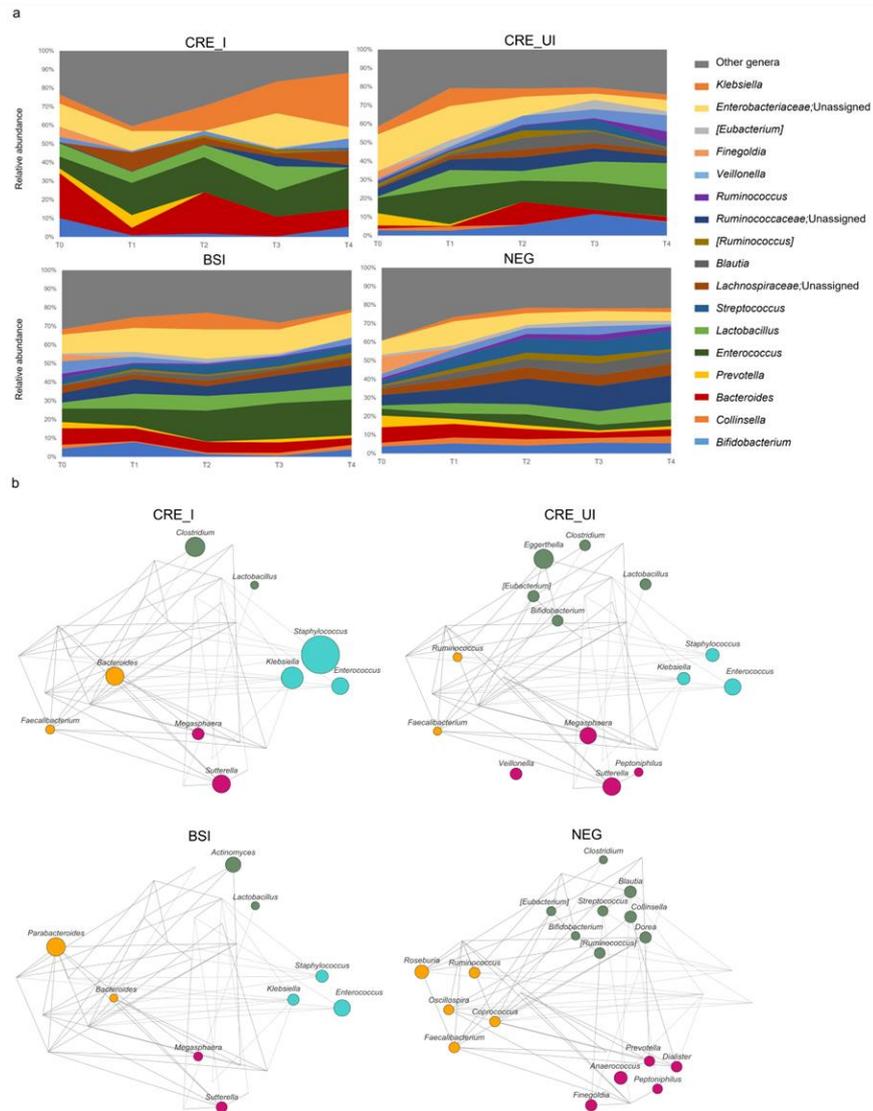
*Legenda: Analisi del GM nei quattro gruppi di studio: a) pazienti con colonizzazione da CRE che hanno sviluppato BSI dallo stesso microrganismo (CRE\_I); b) pazienti con colonizzazione da CRE senza BSI da CRE (CRE\_UI); c) pazienti senza colonizzazione da CRE che hanno sviluppato BSI da Enterobacterale non resistenti ai carbapenemi (BSI); e) pazienti senza colonizzazione da CRE e senza episodi di BSI (NEG).*

La composizione del GM è stata analizzata nei 4 gruppi ora definiti mostrando una “destrutturazione” del GM ed un generale impoverimento delle specie microbiche nel periodo T0-T4 (Figura 3).

### **Figura 3: Composizione del GM nel periodo di studio**



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE



*Legenda: Andamento della composizione del GM nei 4 gruppi di studio (CRE\_I, CRE\_UI, BSI, NEG) dal T0 (trapianto) al T4 (un mese dal trapianto).*

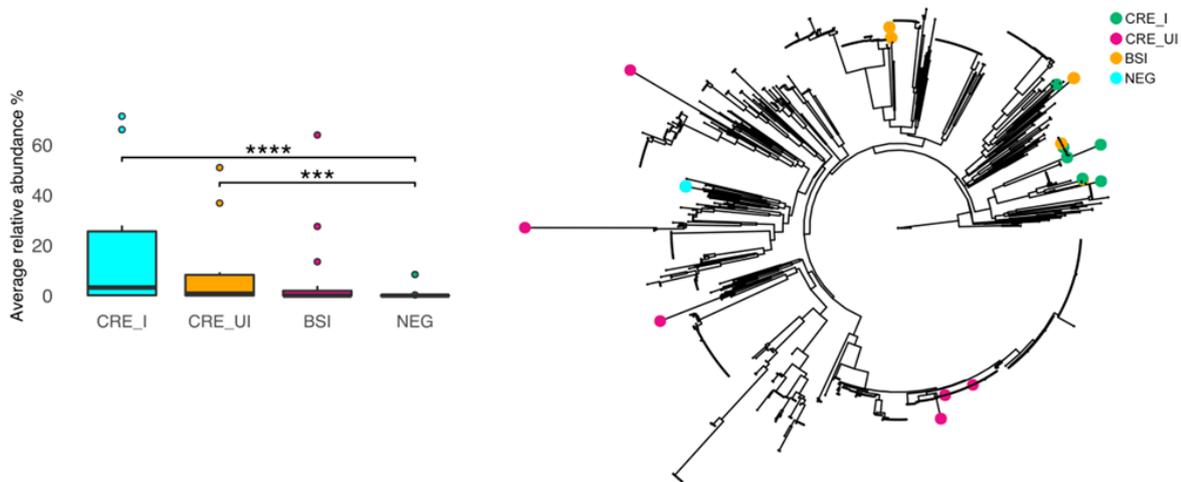
Infine, è stata eseguita un'analisi del resistoma in un sottogruppo di pazienti per la valutazione dell'espressione dei geni di resistenza (Figura 4). Non sono state riscontrate differenze significative nel numero di geni di resistenza nei 4 gruppi analizzati.

**Figura 4: Analisi del resistoma**



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

## *Klebsiella pneumoniae*



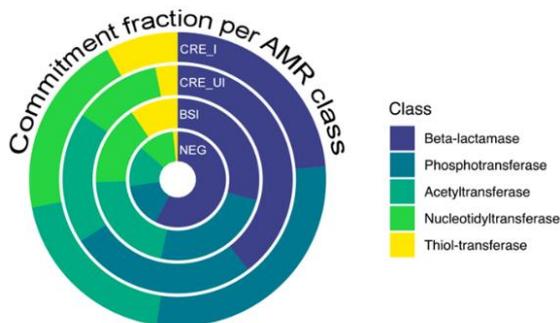
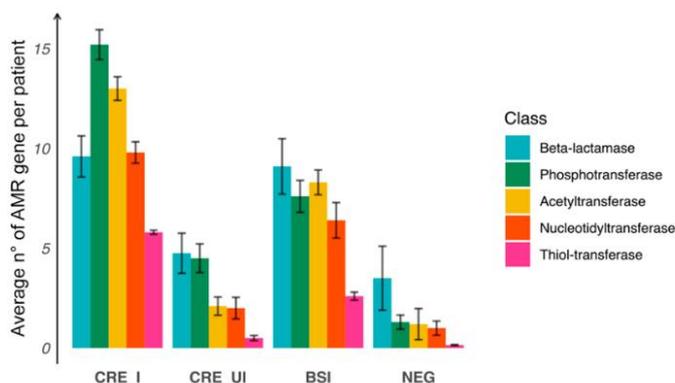
*Legenda: Rappresentazione dei geni di resistenza nei 4 gruppi di studio.*

Tuttavia, quando ci si è focalizzati sui meccanismi di resistenza è stata osservata una modifica dell'espressione dei meccanismi di resistenza correlati al gruppo di appartenenza con una maggiore espressione di geni codificanti beta-lattamasi, fosfotransferasi, acetil-transferasi, nucleotidil-transferasi e tiol-transferasi nei gruppi CRE\_I e BSI confrontati con i gruppi BSI e NEG (Figura 5).



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

**Figura 5** Espressione dei meccanismi di resistenza per classe nel GM nei gruppi di studio.



*Legenda: Media dei meccanismi di resistenza espressi nei 4 gruppi di studio.*

**Conclusioni:**

In conclusione, le caratteristiche e la funzionalità del GM nel primo mese post trapianto nei pazienti colonizzati da CRE, e che sviluppano BSI dallo stesso microrganismo, risultano differenti rispetto ai pazienti esclusivamente colonizzati ed ai pazienti non colonizzati o che sviluppano infezione da altro microrganismo. Queste differenze sembrerebbero correlate alla ridotta quota di differenziazione microbica e dei pattern di resistenza nei pazienti che sviluppano BSI da CRE confrontati con i restanti gruppi. Appare rilevante che tali alterazioni osservate nel primo mese dopo il trapianto erano presenti anche al momento del trapianto, indicando che strategie di prevenzione e di intervento mirate a restaurare il GM (ad esempio: utilizzo di pre/probiotici e postbiotici) potrebbero ridurre il rischio di infezione nel periodo post-trapianto migliorando quindi la prognosi complessiva di questi pazienti.



DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE E CHIRURGICHE

A disposizione per fornire ulteriori informazioni sulle attività e risultati svolti nell'ambito di tale progetto.

Cordiali saluti

Maddalena Giannella  
Professore Associato di Malattie Infettive  
Dipartimento di Scienze Mediche e Chirurgiche Università di Bologna  
IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna