

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

AR-ISS: sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in Italia

Rapporto del triennio 2006-2008

Valeria Alfonsi (a), Romina Camilli (b), Martina Del Manso (a),
Fabio D'Ambrosio (b), Fortunato D'Ancona (a), Maria Del Grosso (b),
Stefania Giannitelli (a), Monica Monaco (b), Andrea Sanchini (b),
Annamaria Sisto (c), Annalisa Pantosti (b) e i referenti dei laboratori AR-ISS

*(a) Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) Cineca, Consorzio Interuniversitario, Casalecchio di Reno (Bologna)

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

10/37

Istituto Superiore di Sanità

AR-ISS: sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in Italia. Rapporto del triennio 2006-2008.

Valeria Alfonsi, Romina Camilli, Martina Del Manso, Fabio D'Ambrosio, Fortunato D'Ancona, Maria Del Grosso, Stefania Giannitelli, Monica Monaco, Andrea Sanchini, Annamaria Sisto, Annalisa Pantosti e i referenti dei laboratori AR-ISS

2010, iv, 77 p. Rapporti ISTISAN 10/37

La sorveglianza dell'Antibiotico-Resistenza dell'Istituto Superiore della Sanità (AR-ISS) rappresenta uno strumento essenziale per studiare e descrivere l'emergenza e la diffusione del fenomeno in Italia. Dal 2001, la sorveglianza AR-ISS è coordinata dall'ISS ed è basata su laboratori ospedalieri sentinella, presenti sul territorio nazionale, che inviano i dati di sensibilità agli antibiotici, ottenuti nella normale routine di laboratorio per patogeni selezionati isolati da infezioni invasive (sangue e liquor). I patogeni sotto sorveglianza sono: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Inoltre AR-ISS raccoglie i ceppi di *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *E. faecalis/faecium* con particolari caratteristiche di resistenza al fine di approfondirne la caratterizzazione fenotipica e genotipica. Questi dati sono utili per monitorare la situazione epidemiologica e migliorare la conoscenza dei cloni antibiotico-resistenti circolanti in Italia. Nel presente rapporto vengono presentati i risultati della sorveglianza e le caratterizzazioni microbiologiche, relativi agli anni 2006-2008.

Parole chiave: Sistema di sorveglianza; Antibiotico-resistenza

Istituto Superiore di Sanità

AR-ISS: antibiotic resistance surveillance in Italy. Report for three-year period 2006-2008.

Valeria Alfonsi, Romina Camilli, Martina Del Manso, Fabio D'Ambrosio, Fortunato D'Ancona, Maria Del Grosso, Stefania Giannitelli, Monica Monaco, Annamaria Sisto, Annalisa Pantosti and reference persons for AR-ISS laboratories
2010, iv, 77 p. Rapporti ISTISAN 10/37

The antibiotic resistance surveillance of the Istituto Superiore di Sanità (ISS, the National Institute of Health in Italy) (AR-ISS) is a valuable tool to study and describe the emergence and spread of antibiotic resistance in Italy. Since 2001, the AR-ISS surveillance, coordinated by the ISS, is based on sentinel hospital laboratories, from different areas of the country. These laboratories send routine antibiotic susceptibility data for selected pathogens from invasive infections (blood and cerebrospinal fluid). The bacterial species under surveillance are: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, AR-ISS collects strains of *S. aureus*, *S. pneumoniae* and *E. faecalis/faecium*, with particular resistance profile, to provide further phenotypic and genotypic characterization. These data are useful for monitoring the Italian epidemiological situation and improving the awareness of antibiotic-resistant clones circulating in our country. In this report we present the results of the surveillance and of the microbiological characterizations carried out for the period 2006-2008.

Key words: Surveillance system; Antibiotic resistance

Per informazioni su questo documento scrivere a: valeria.alfonsi@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it.

Citare questo documento come segue:

Alfonsi V, Camilli R, Del Manso M, D'Ambrosio F, D'Ancona F, Del Grosso M, Giannitelli S, Monaco M, Sanchini A, Sisto A, Pantosti A e i referenti dei laboratori AR-ISS. *AR-ISS: sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in Italia. Rapporto del triennio 2006-2008*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2010. (Rapporti ISTISAN 10/37).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2010

Laboratori sentinella partecipanti alla rete di sorveglianza AR-ISS e loro referenti (2006-2008)

Alessandria	Azienda Ospedaliera Sant'Antonio Biagio e Arrigo Andrea ROCCHETTI
Ancona	Ospedale Torrette Umberto I Esther MANSO
Asti	Ospedale Civile ASL 19 Gabriella MONTICONE
Bari	Unità Operativa Igiene Epidemiologia Sanità Pubblica I Danila DE VITO
Bergamo	Ospedali Riuniti Francesca VAILATI
Biella	Ospedale degli Infermi Aurelio MALABAILA
Bolzano	Ospedale Generale Regionale Gianna DE FINA, Ludwig MORODER, Richard ASCHBACHER
Cagliari	Ospedale Civile Santissima Trinità Barbara SADDI
Cagliari	Ospedale G. Brotzu Maria Graziella GARAU, Claudia CROCIANI
Camposampiero	Presidio Ospedaliero Leonarda BICCIATO
Catania	Ospedale Vittorio Emanuele Vittorio AMATO
Cesena	Ospedale Maurizio Bufalini Antonio CIPOLLONI
Chieti	Ospedale SS. Annunziata Adele RULLI
Cittadella	Ospedale Civile Paola SARTORE
Como	Ospedale Valduce Emilia ALIVERTI
Cosenza	Presidio Ospedaliero dell'Annunziata Paolina CAVALCANTI
Cuneo	Azienda Ospedaliera Santa Croce e Carle Marina OSENDA, Claudio GARRO
Domodossola	Ospedale San Biagio ASL 14 Cinzia ROSSI
Empoli	Ospedale Generale Provinciale San Giuseppe Carlotta DODI
Ferrara	Ospedale Sant'Anna Maria Rita ROSSI
Foggia	Azienda Mista Universitaria OORR Anna DI TARANTO
Forlì	Ospedale Morgagni Pierantoni Giuseppe MONTINI
Genova	Ospedale San Martino Maria Pia MOLINARI
Lecco	Ospedale A. Manzoni Angelo SALA
Napoli	Azienda Ospedaliera Monaldi Susanna CUCCURULLO
Napoli	Ospedale D. Cotugno Marco CONTE

Novara	Azienda Ospedaliera di Novara Vesseline KROUMOVA
Palermo	Dipartimento di Igiene e Microbiologia Università degli Studi Anna GIAMMANCO
Perugia	Policlinico Monteluce M. Bruna PASTICCI
Ravenna	Ospedale Santa Maria delle Croci Marina VISANI
Reggio Calabria	Ospedali Riuniti Melacrino Giuseppe BOLIGNANO
Rimini	Ospedale degli Infermi Franca BENINI/Giovanna TESTA
Roma	Ospedale Bambin Gesù Paola BERNASCHI
Roma	Ospedale San Camillo Gabriella PARISI
Roma	Policlinico Umberto I Maria Teresa MASCELLINO
Roma	Azienda Policlinico S. Andrea Paola CIPRIANI/Andrea PETRUCCA
Rovereto	Ospedale Santa Maria del Carmine Paola GUALDI
Sanremo	Ospedale di Sanremo Pier Andrea DUSI
Sassari	Ospedale Civile SS. Annunziata Giovanni Maria PORCHEDDU
Savona	Ospedale San Paolo Rosalba BONA
Sondalo	Ospedale E. Morelli Panajota TROUPIOTI
Torino	Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista Roberto SERRA
Trento	Ospedale Santa Chiara Rossella SARTORI, Patrizia OBER, Paolo LANZAFAME
Treviglio	Ospedale di Treviglio Angelo PESENTI
Udine	A.O. Santa Maria Misericordia Angelo MICHELUTTI
Varese	Ospedale di Circolo Francesco LUZZARO, Beatrice PINI
Venezia	Ospedale Civile Umberto I Bruno FANTIN, Stefano GRANDESSO
Verbania	Ospedali Castelli Claudia CANALE, Cinzia ROSSI
Vercelli	Ospedale Sant'Andrea Fulvia MILANO
Vezzano Predabissi	Ospedale Predabissi Patrizia CAMBIERI
Viterbo	Ospedale Grande degli Infermi Ivano PICARI

INDICE

Introduzione	1
Obiettivi	3
Metodi del sistema di sorveglianza	4
Metodi epidemiologici.....	4
Eventi sotto sorveglianza e loro definizione di caso.....	4
Rilevazione e raccolta dati.....	5
Periodo di rilevazione.....	5
Analisi dei dati.....	6
Metodi microbiologici.....	6
Raccolta dei ceppi batterici.....	6
Metodi utilizzati dai laboratori ospedalieri.....	6
Controllo di qualità esterno.....	7
Risultati generali	8
Caratteristiche dei laboratori partecipanti.....	8
Metodi per la determinazione della sensibilità agli antibiotici.....	11
Trasmissione dei dati e invio dei ceppi batterici.....	11
Qualità dei dati.....	14
Controllo di qualità esterno.....	16
Risultati della sorveglianza epidemiologica	20
Segnalazioni inviate.....	20
<i>Staphylococcus aureus</i>	20
Analisi dei dati.....	21
MRSA.....	24
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	28
Analisi dei dati.....	29
<i>S. pneumoniae</i> non sensibile alla penicillina.....	32
<i>S. pneumoniae</i> non sensibili alla eritromicina.....	33
<i>Enterococcus faecalis/faecium</i>	35
Analisi dei dati.....	35
VRE.....	40
Batteri Gram-negativi: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae/oxytoca</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Analisi dei dati.....	42
ESBL.....	47
Conclusioni.....	47

Risultati della sorveglianza microbiologica: caratterizzazioni fenotipiche e genotipiche	49
<i>Staphylococcus aureus</i>	49
Metodi	50
Risultati	53
Conclusioni	55
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	56
Resistenza agli antibiotici	57
Resistenza alla penicillina	57
Resistenza alla eritromicina	59
Discrepanze con i dati forniti dai laboratori	60
Altri antibiotici	61
Sierotipizzazione	62
Genotipizzazione	63
Conclusioni	65
<i>Enterococcus faecalis/faecium</i> resistenti alla vancomicina	65
Fenotipo VRE	66
Genotipo VRE	66
Multiresistenza nei VRE	68
Caratteristiche clonali	68
Conclusioni	71
 Considerazioni finali	 72
 Bibliografia	 74

INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza è uno dei principali problemi di Sanità Pubblica e ha raggiunto negli ultimi anni proporzioni tali da indurre istituzioni internazionali quali l'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) e il Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (*European Centre for Disease Prevention and Control*, ECDC) a lanciare un serio allarme. Già dieci anni fa, la problematica fu inserita tra le priorità da affrontare da parte dei Paesi della Comunità Europea con la risoluzione denominata "una strategia contro la minaccia microbica", in cui si affermava che un'efficace riduzione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, non poteva essere conseguita solo attraverso misure intraprese a livello nazionale, ma richiedeva una strategia comune e un'azione coordinata sia a livello comunitario che internazionale (1). I provvedimenti adottati dalla Comunità Europea al riguardo, quindi, hanno previsto una serie di azioni specifiche, volte a contenere il diffondersi della resistenza agli antibiotici: rafforzare la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza e del consumo di antibiotici, migliorare la prevenzione delle malattie infettive per ridurre la necessità di ricorrere agli antibiotici, favorire la formazione e l'informazione sulla materia, favorire la ricerca.

Sulla base di tali raccomandazioni, nel 1999 l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) ha avviato uno studio pilota di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza per i microrganismi *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* isolati da sangue (2). Nel 2001 il progetto si è consolidato e la sorveglianza si è ampliata ad altri 3 microrganismi divenendo uno studio prospettico multicentrico, denominato AR-ISS (Antibiotico-Resistenza-Istituto Superiore di Sanità) (3). Negli anni successivi, AR-ISS è diventato un vero e proprio sistema di sorveglianza sentinella, che si basa su una rete di laboratori ospedalieri di microbiologia clinica reclutati su tutto il territorio nazionale, che raccolgono dati di sensibilità agli antibiotici, come parte della normale routine di laboratorio, riguardo ad alcuni patogeni rilevanti. La sorveglianza AR-ISS ha caratteristiche uniche in Italia, in quanto coinvolge numerosi laboratori su tutto il territorio nazionale, è continuativa nel tempo e ha un finanziamento pubblico. AR-ISS fa parte della sorveglianza europea EARSS (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) sostenuta dall'Unione Europea (4) e dall'inizio del 2010 trasferita all'ECDC. EARSS consiste, a sua volta, di una rete di reti nazionali di sorveglianza; ad oggi raccoglie dati di antibiotico-resistenza da 800 laboratori, che servono 1200 ospedali, in 32 Paesi europei. I dati vengono analizzati a cadenza annuale e pubblicati sul sito internet <http://www.rivm.nl/earss/>, e in un report annuale che permette la comparazione tra i vari Paesi e la descrizione dei trend più significativi.

A livello nazionale, nel 2007 è stato pubblicato il primo rapporto ISTISAN che presentava i dati raccolti nell'ambito della sorveglianza AR-ISS per gli anni 2003-2005: un totale di 11.731 segnalazioni riguardanti i 5 microrganismi oggetto di studio da parte dei quarantotto laboratori che hanno collaborato nel triennio considerato (5). Questo primo rapporto ha fornito dati interessanti e unici in Italia, utili non solo per identificare le principali problematiche di antibiotico-resistenza, ma anche per migliorare il sistema di sorveglianza e sensibilizzare gli operatori del settore. I risultati hanno evidenziato, fra l'altro, una frequenza di MRSA di poco inferiore al 40%, mantenutasi stabile negli anni (39,0% nel 2003, 39,9% nel 2004 e 37,2% nel 2005); non è stato segnalato alcun ceppo di *S. aureus* intermedio o resistente a vancomicina né a teicoplanina. Per ciò che riguarda i ceppi di *S. pneumoniae*, si metteva in evidenza un incremento del numero di segnalazioni da parte dei laboratori partecipanti nei tre anni (308 nel 2003, 319 nel 2004 e 346 nel 2005). La prevalenza di *S. pneumoniae* non sensibili alla

penicillina (*Penicillin-Nonsusceptible Streptococcus Pneumoniae*, PNSSP) si è mantenuta stabile intorno al 10% con un profilo di resistenza del 4,5%. La percentuale di ceppi resistenti alla eritromicina si aggirava intorno al 30% (in particolare variava dal 36,6% nel 2003, al 28,4% nel 2004, al 30,1% nel 2005).

A distanza di tre anni, si è ritenuto opportuno pubblicare un nuovo report. Questo rapporto illustra i metodi e i risultati della sorveglianza epidemiologica dell'antibiotico-resistenza AR-ISS, per il triennio 2006-2008, e i risultati di studi microbiologici effettuati sui ceppi batterici raccolti nell'ambito della sorveglianza.

Tra le iniziative che in seguito sono state intraprese, va ricordata l'istituzione della "Giornata europea degli antibiotici", voluta dall'ECDC, per sensibilizzare la popolazione sull'uso consapevole di questi farmaci. A partire dal 2008, si celebra annualmente in tutti i Paesi membri, il 18 novembre.

Per celebrare tale la giornata, in Italia è stato organizzato dall'Istituto Superiore di Sanità il convegno "Prima giornata europea degli antibiotici. Per un uso consapevole degli antibiotici", che ha riunito rappresentanti delle istituzioni, del mondo scientifico e professionale e le organizzazioni dei consumatori e dei pazienti (6). Parallelamente, l'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco), l'ISS e il Ministero del Lavoro, della Salute e delle Politiche Sociali, hanno organizzato la campagna di comunicazione "Antibiotici sì, ma con cautela", per informare i cittadini dell'importanza di ricorrere agli antibiotici solo in caso di necessità e comunque sempre sotto stretta sorveglianza medica.

Questo rapporto illustra gli obiettivi e i metodi della rete AR-ISS e i principali risultati per il triennio 2006-2008 della sorveglianza epidemiologica e microbiologica, oltre a risultati di studi *ad hoc* per la caratterizzazione microbiologica di ceppi di particolare interesse di sanità pubblica.

OBIETTIVI

La sorveglianza AR-ISS si prefigge l'obiettivo primario di descrivere l'antibiotico-resistenza in un selezionato gruppo di batteri isolati da infezioni di sicura rilevanza clinica (batteriemie o meningiti) che rappresentano sia infezioni acquisite in ambito comunitario che associate all'assistenza sanitaria.

Specificatamente gli obiettivi per il periodo 2006-2008 sono stati i seguenti:

1. Rilevare dati di antibiotico-resistenza relativi a ceppi di *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis/faecium*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* responsabili di infezioni invasive (meningiti e batteriemie) e quindi isolati da sangue o liquor, attraverso una rete di laboratori sentinella. Per ogni microrganismo l'attenzione è posta prevalentemente su un antibiotico o una classe di antibiotici particolarmente importante in terapia perché di prima scelta nei confronti di quel patogeno, o, significativo per monitorare l'andamento dell'antibiotico-resistenza.
2. Confrontare i dati osservati nel triennio 2006-2008 con quelli pubblicati nel precedente rapporto ISTISAN (5).
3. Descrivere i dati e diffondere i risultati in termini di trend di antibiotico-resistenza, al fine di ampliare la conoscenza del problema e di fornire un feedback verso i laboratori stessi, la comunità scientifica in generale e le autorità di Sanità Pubblica.
4. Raccogliere dati sulla popolazione servita da ciascun laboratorio e ospedale, necessari per ottenere il denominatore degli eventi sorvegliati e valutare la rappresentatività dei dati prodotti.
5. Raccogliere isolati con peculiari caratteristiche fenotipiche di particolare interesse per la sanità pubblica.
6. Approfondire la caratterizzazione fenotipica e genotipica di ceppi di *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ed *Enterococcus faecalis/faecium* raccolti nell'ambito della sorveglianza per migliorare le conoscenze dei cloni di batteri antibiotico-resistenti circolanti in Italia.

METODI DEL SISTEMA DI SORVEGLIANZA

La sorveglianza AR-ISS nel triennio 2006-2008 si è avvalsa di:

- *laboratori sentinella* partecipanti su base volontaria afferenti a strutture ospedaliere, che hanno effettuato la selezione, l'identificazione e la caratterizzazione del fenotipo di resistenza dei ceppi oggetto di studio (test di sensibilità agli antibiotici).
Tale campione pur non essendo esaustivo dell'intera realtà, ha offerto un dato unico nazionale soddisfacente in termini completezza, accuratezza e tempestività di diffusione dell'informazione.
I laboratori che per primi hanno preso parte alla rete, sono stati reclutati su base volontaria fra quelli che avevano scelto di partecipare su invito da parte dell'ISS al progetto pilota EARSS in Italia, condotto nel periodo aprile 1999-aprile 2000 (2), e fra quelli che contribuivano all'invio di ceppi per la Sorveglianza Nazionale delle Meningiti Batteriche, coordinata dall'ISS (7). Il reclutamento di nuovi laboratori è comunque sempre disponibile, sebbene subordinato all'autorizzazione da parte della Direzione Sanitaria dell'ospedale e alla scelta di un referente per ciascun laboratorio. A ciascun laboratorio è assegnato un codice identificativo di riconoscimento costituito dalla sigla della provincia di appartenenza e un numero crescente.
- *coordinamento centrale epidemiologico*, responsabile della raccolta, integrazione, analisi e divulgazione dei dati, del controllo di qualità dei dati pervenuti, inviati dai centri sul territorio, presso il Reparto Epidemiologia delle Malattie Infettive del CNESPS (Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute) dell'Istituto Superiore di Sanità.
- *coordinamento centrale microbiologico*, responsabile della raccolta e dello studio dei ceppi batterici inviati dai laboratori, presso il Reparto Malattie Batteriche, Respiratorie e Sistemiche del Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità.

Metodi epidemiologici

Eventi sotto sorveglianza e loro definizione di caso

Sono state sorvegliate tutte le infezioni invasive (da sangue e/o da liquor), indipendentemente dal profilo di antibiotico-resistenza osservato, sostenute da: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. faecalis/faecium*, *K. pneumoniae/oxytoca*, *E. coli* e *P. aeruginosa*; e definite come:

1. primo isolamento da sangue o liquor di un paziente (qualora sia stato isolato lo stesso patogeno da sangue e liquor, viene riportato il dato dell'isolamento da liquor ed eliminato il dato dell'isolato da sangue);
2. isolamento dello stesso patogeno ottenuto almeno dopo 1 mese (30 giorni) dalla segnalazione precedente, indipendentemente da eventuali isolamenti occorsi nel frattempo (gli isolamenti dello stesso patogeno dallo stesso paziente, entro il mese successivo al primo isolamento devono essere considerati isolamenti ripetuti e pertanto non devono essere segnalati);
3. isolamento di un patogeno diverso.

Rilevazione e raccolta dati

La rilevazione ha riguardato sia le infezioni nosocomiali che le infezioni comunitarie.

Per ogni infezione invasiva, le informazioni di interesse raccolte hanno incluso: i dati anagrafici e clinici del paziente (codice identificativo, nome e cognome, sesso, data di nascita, regime di ricovero, reparto e data di ricovero, quadro clinico principale), i dati relativi al campione (codice del campione, data e tipo di campione -sangue o liquor) e i dati di antibiotico-resistenza (qualitativi e/o quantitativi).

I dati sono stati raccolti a scadenza trimestrale presso il Reparto di Malattie Infettive del Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute (CNESPS) dell'ISS, dove sono stati standardizzati e aggregati in un unico database informatizzato e analizzati. Per l'input e la gestione dei dati a livello centrale, è stato utilizzato il programma WHONET (software creato dalla WHO per la gestione dei dati di antibiotico-resistenza e distribuito gratuitamente) (8).

Per l'invio dei dati al CNESPS i laboratori hanno potuto utilizzare, compatibilmente con le proprie esigenze e disponibilità tecniche, 4 diverse modalità:

1. schede di rilevazione cartacee via fax;
2. file elettronico contenente i dati esportati dagli strumenti automatizzati di laboratorio per l'esecuzione di antibiogrammi, mediante posta elettronica, che viene poi convertito presso il CNESPS dal formato originale (Testo od altri formati quali Dbase, Access, Excel, ecc) in uno compatibile con quello del programma WHONET, attraverso la ricodifica a mezzo di un modulo (BacLink) del software stesso;
3. file elettronico nel formato WHONET ottenuto mediante l'inserimento manuale dei dati o l'importazione dai sistemi automatizzati a livello locale, mediante posta elettronica;
4. immissione diretta dei dati sul sito web del progetto all'indirizzo <http://www.ar-iss.iss.it>, attraverso una maschera di inserimento che permette di inserire tutte le informazioni presenti sulla scheda di rilevazione.

Nel caso di *E. coli* e *P. aeruginosa* hanno inviato i dati solo quei laboratori in grado di esportarli dai sistemi automatizzati.

Allo scopo di conoscere l'entità del contesto della sorveglianza e ottenere dati per il denominatore è stato proposto annualmente un questionario conoscitivo, al fine di avere informazioni il più aggiornate possibile necessarie per valutare la rappresentatività dei dati prodotti. Esso era composto di una prima parte rivolta agli ospedali che raccoglieva informazioni sulla popolazione servita, sulle attività e le caratteristiche del servizio; una seconda parte rivolta ai laboratori per valutare il numero di emocolture effettuate in un anno, il numero di isolamenti delle specie batteriche in oggetto, le tecniche di laboratorio utilizzate, i controlli di qualità, che ha permesso fra l'altro di avere una stima delle infezioni diagnosticate in ospedale mediante emocoltura o liquorcoltura, ad esempio il numero di MRSA isolati per 1000 giorni/paziente.

Questo rapporto presenta i risultati dei questionari distribuiti negli anni 2007 e 2008.

Periodo di rilevazione

Sono incluse in questo report le segnalazioni raccolte a partire dal 1° gennaio 2006 fino al 31 dicembre 2008.

Analisi dei dati

Per archiviare i dati è stato realizzato a livello centrale presso il CNESPS, un database unico, che sta quindi alla base dell'analisi statistica ed epidemiologica. L'aggregazione di tutti i dati in un unico database, prevede la codifica in tabelle e variabili standard comuni a tutti i laboratori. Sia durante l'inserimento che in fase di analisi è stata svolta un'accurata verifica della qualità dei dati, che ha considerato la congruenza delle date di nascita, del prelievo e di ricovero dove esistenti. Per l'analisi statistica sono stati utilizzati programmi di analisi costruiti ad hoc utilizzando EPI-INFO versione 3.5.1 e versione 6.04 e il programma di analisi di WHONET.

Per valutare la significatività statistica del trend temporale degli isolamenti per le variabili considerate e dell'antibiotico-resistenza nel triennio oggetto di studio, è stato utilizzato il test *Chi squared* (χ^2) *for trend* (livello di significatività di 0,05).

Metodi microbiologici

Raccolta dei ceppi batterici

Oltre alla raccolta dati di antibiotico-resistenza, nel triennio in studio, la rete di sorveglianza AR-ISS, allo scopo di approfondire studi di caratterizzazione di ceppi antibiotico-resistenti mediante sierotipizzazione e/o genotipizzazione, ha previsto la raccolta di alcune specie batteriche con determinati profili di resistenza:

- *Staphylococcus aureus*
ceppi resistenti alla meticillina (*Methycillin Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) che presentano un valore di MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*; minima concentrazione inibente) per la vancomicina ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$;
- *Streptococcus pneumoniae*
tutti i ceppi isolati da sangue o liquor senza tener conto della sensibilità o resistenza agli antibiotici;
- *Enterococcus faecalis/faecium*
ceppi che rientrassero nell'ambito della sensibilità attenuata o della resistenza (MIC per la vancomicina ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) o alone di inibizione della crescita ≤ 16 mm con il metodo dei dischetti (Kirby-Bauer).

Inoltre sono stati raccolti ceppi di *S. aureus* indipendentemente dalla sensibilità alla vancomicina, per uno studio *ad hoc*. Nello studio non è stata prevista la raccolta di ceppi batterici Gram-negativi.

Metodi utilizzati dai laboratori ospedalieri

La sorveglianza AR-ISS suggerisce protocolli per il saggio della sensibilità agli antibiotici mutuati dall'EARSS per ciascun patogeno oggetto di sorveglianza. Tuttavia la sorveglianza prevede che ogni laboratorio utilizzi la sua metodica di routine. Nella maggior parte dei laboratori la valutazione della sensibilità *in vitro* agli antibiotici è stata condotta mediante sistemi automatizzati. Soltanto pochi laboratori hanno utilizzato il test di diffusione in Agar (Kirby-Bauer); in alcuni casi i laboratori hanno usato l'E-test.

Tutti i laboratori afferenti alla sorveglianza hanno utilizzato, per i criteri interpretativi di sensibilità e resistenza, nel periodo considerato, le linee guida del CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Institute*)

Controllo di qualità esterno

Per verificare l'affidabilità e l'accuratezza dei risultati provenienti dai laboratori e allo scopo di valutarne la comparabilità, il progetto EARSS organizza periodici esercizi di controllo di qualità (*External Quality Assurance, EQA*) in collaborazione con l'ente inglese UK-NEQAS (*United Kingdom – National External Quality Assessment Service*).

In questo rapporto sono presentati i risultati degli esercizi di controllo di qualità esterno organizzati nel 2007 e 2008.

Ogni esercizio ha richiesto l'identificazione e lo studio della sensibilità agli antibiotici di 6 ceppi batterici tra quelli sorvegliati da EARSS. Prima di essere distribuiti ai laboratori, tutti i ceppi sono stati testati da tre centri di riferimento indipendenti: *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu* (RIVM) di Bilthoven (NL); *Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory* (ARMRL) di Londra (UK); e *Addenbrookers Hospital* di Cambridge (UK). Ognuno di questi laboratori di riferimento dava un'interpretazione dei risultati secondo i criteri del CLSI, del CRG (*Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen*), del BSAC (*British Society for Antimicrobial Chemotherapy*), del CA-SFM (*Comité del'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*). Ai laboratori coinvolti nell'esercizio è stato richiesto di riportare i risultati dei saggi di sensibilità agli antibiotici utilizzando le categorie:

- S: sensibili;
- I: intermedi;
- R: resistenti.

e di specificare i metodi e le linee guida interpretative utilizzate.

RISULTATI GENERALI

Caratteristiche dei laboratori partecipanti

Nel periodo in oggetto (2006-2008), hanno fatto parte della rete di sorveglianza 51 laboratori.

In questo rapporto sono riportati i risultati dell'analisi delle segnalazioni inviate da 49 (96%) laboratori, ovvero quelli che hanno trasmesso i dati per almeno uno dei tre anni considerati. La Figura 1 illustra la loro distribuzione sul territorio nazionale, suddivisi per aree geografiche (Nord, Centro e Sud e Isole).

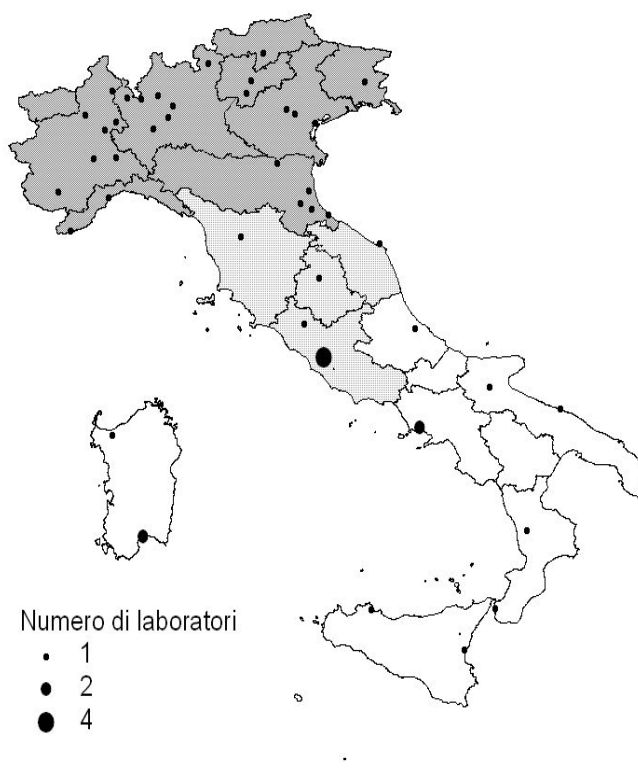


Figura 1. AR-ISS 2006-2008: distribuzione dei laboratori sul territorio nazionale, suddivisi per aree geografiche

La distribuzione regionale dei laboratori non è del tutto omogenea (Tabella 1). Sono rappresentate 16 Regioni e 2 Province Autonome (PA); nelle restanti tre Regioni (Basilicata, Molise, Valle d'Aosta), nessun laboratorio ha partecipato alla sorveglianza nel triennio in studio. La regione Friuli-Venezia Giulia ha una rete di rilevamento dell'antibiotico-resistenza regionale che comprende quasi su tutti i laboratori ospedalieri pubblici. Questi laboratori sono principalmente concentrati al Nord; solo il 16% è localizzato al Centro; il 25% al Sud e Isole. Sarebbe quindi auspicabile aumentare la rappresentatività del Centro-Sud.

Tabella 1. AR-ISS 2006-2008: distribuzione regionale dei laboratori

Regione	n. laboratori	%
Abruzzo	1	2,0
Bolzano (PA)	1	2,0
Calabria	2	4,1
Campania	2	4,1
Emilia Romagna	6	12,2
Friuli-Venezia Giulia	1	2,0
Lazio	5	10,3
Liguria	1	2,0
Lombardia	7	14,3
Marche	1	2,1
Piemonte	8	16,4
Puglia	2	4,1
Sardegna	3	6,1
Sicilia	2	4,1
Toscana	1	2,0
Trento (PA)	2	4,1
Umbria	1	2,0
Veneto	3	6,1
Totale	49	100

Mediamente in ogni Regione sono presenti 2,7 laboratori della rete AR-ISS, con un minimo di 1 e un massimo di 8.

Allo scopo di descrivere le caratteristiche dei laboratori e degli ospedali, cui fanno capo, partecipanti alla sorveglianza, e per ottenere i dati demografici rispetto alla popolazione servita, necessari per valutare la rappresentatività dei dati prodotti, annualmente è stato proposto da EARSS un questionario conoscitivo riguardante informazioni generali sui laboratori e sugli ospedali serviti.

Il questionario, distribuito nel 2007, riguardava la situazione dell'anno precedente e consisteva di due parti: una prima parte sul laboratorio, con domande riguardanti le emocolture eseguite, e una seconda parte sull'ospedale con domande riguardo al livello di cura e alle dimensioni e alla struttura.

Nel 2008, in occasione dell'istituzione della giornata europea dell'antibiotico-resistenza, è stato somministrato un questionario più dettagliato sul profilo dei servizi forniti dai laboratori, con domande che riguardavano anche le consuetudini prescrittive intraprese e la comunicazione fra microbiologi e clinici e altre importanti informazioni, per mettere in luce i fattori che influenzano il controllo dell'antibiotico-resistenza in Europa. Il questionario è consistito quindi di quattro parti per un totale di 23 domande orientate a conoscere il ruolo che il laboratorio svolge nella diagnosi delle infezioni batteriche e se l'ospedale cui fa riferimento intraprende terapie adeguate e mirate ad un uso prudente degli antibiotici. La prima parte consisteva di domande generali sui servizi forniti e sulle caratteristiche del laboratorio; la seconda parte focalizzava l'attenzione sui metodi diagnostici; la terza esaminava il ruolo del laboratorio sulle attitudini prescrittive empiriche o guidate; la quarta infine era indirizzata a esplorare la comunicazione fra microbiologo e clinico. Tutte le domande riguardavano la situazione nel 2007.

Presentiamo i risultati più salienti dei questionari al fine di dare un quadro del contesto su cui verteva il progetto. Per la parte generale, i risultati dei questionari somministrati nei due anni, sono stati del tutto sovrapponibili: riportiamo pertanto solo i risultati del questionario 2007, riferiti all'anno 2006, che in questo caso ipotizziamo possano illustrare la situazione di tutto il periodo in studio.

Hanno inviato i questionari compilati 32 laboratori.

Per ciò che riguarda il livello di cura, 17 (53%) ospedali sono di secondo livello (aziende ospedaliere o presidi a media specializzazione: 5-10 specialità cliniche; posti letto da 200 ad 800); 14 (44%) di terzo livello (aziende ospedaliere o presidi, ad alta specializzazione, spesso anche universitari; presenti anche reparti di terapia intensiva; posti letto da 300 a oltre 1.500); solo 1 (3%) ospedale della rete è di primo livello ovvero un presidio ospedaliero a bassa specializzazione con un numero di posti letto da 30 a 200 (presenti solo alcuni reparti, ad esempio medicina, ostetricia-ginecologia, pediatria, chirurgia generale; laboratorio disponibile per analisi generali). Per illustrare più nel dettaglio l'ordine di grandezza degli ospedali riportiamo gli indicatori più significativi dell'attività di ricovero. In 29 (90%) ospedali è presente il reparto di terapia intensiva, ma solo in 20 (62%) la terapia intensiva neonatale. Agli ospedali della rete AR-ISS afferisce in media una popolazione di 279.285 utenti (range: 10.000-1.572.037) (Tabella 2), per un totale di 6.702.835 utenti, pari all'11,4% dell'intera popolazione italiana. Si può pertanto riassumere che la sorveglianza AR-ISS copre poco più di un decimo dell'intera utenza del Servizio Sanitario Nazionale. Sono per la maggior parte di ospedali di grandi dimensioni: numero medio di posti letto 564 (range: 233-1.215), di cui 25 di terapia intensiva (range: 5-61); numero medio di ricoveri 28.195 (range: 9.190-55.739); numero medio di giornate di degenza 174.812 (range: 55.138-434.767) (Tabella 2), per una degenza media di 6,2 giorni (range: 6-7,8). Il tasso di occupazione dei posti letto è stato 84%.

Tabella 2. AR-ISS 2006-2008: indicatori dell'attività di ricovero media degli ospedali

Indicatore	n. medio	n. minimo	n. massimo
Popolazione afferente	279.285	10.000	1.572.037
Numero posti letto in regime di ricovero ordinario	564	233	1.215
Numero posti letto di terapia intensiva	25	5	61
Numero ricoveri per anno	28.195	9.190	55.739
Giornate di degenza	174.812	55.138	434.767

Per ciò che riguarda l'indagine sugli indicatori di attività dei laboratori, dati ottenuti dal questionario somministrato nel 2008, di particolare rilevanza è risultata l'informazione sul numero di emocolture effettuate in un anno. La totalità dei laboratori che hanno risposto al questionario, ha effettuato più di 600 emocolture l'anno, con una media di 5.265 (range: 634-14.783). a questo proposito vale la pena spiegare che tale dato corrisponde ai set di emocolture. Quasi la totalità dei laboratori (17, 94,4%) ha eseguito un controllo di qualità interno sui reagenti e i test di antibiotico-resistenza a cadenza regolare, per la maggior parte mensile (64,7%). I ceppi ATCC (*American Type Culture Collection*) come standard di riferimento sono stati di gran lunga i più utilizzati (88,2%) rispetto a quelli NCTC (*National Collection of Type Cultures*, Londra, Regno Unito) (11,8%). Un controllo di qualità esterno è stato effettuato da 15 (88,2%) laboratori, il 75% dei quali in collaborazione con l'ente inglese UK-NEQAS (*United Kingdom – National External Quality Assessment Service*).

I dati di antibiotico-resistenza, in report redatti sulla base di statistiche interne, o in pubblicazioni curate da AR-ISS/EARSS sono stati regolarmente divulgati ai clinici e agli operatori sanitari nella maggior parte degli ospedali (83%). Nell'81,3% degli ospedali esistono e vengono utilizzate linee guida sulla terapia antibiotica.

Per ciò che riguarda le consuetudini prescrittive in uso all'interno dell'ospedale, è molto difficile trarre delle conclusioni dal questionario, perché spesso le domande per quanto articolate, non riescono a tenere in considerazione le possibili criticità e i dati raccolti possono non dare completezza e attendibilità. Pur tuttavia emergono alcune considerazioni di fondo sulla percezione che i clinici e i microbiologi dimostrano di avere. Dalle risposte ottenute si può evincere che le

scelte terapeutiche sono state molto spesso orientate già in prima battuta verso farmaci a largo spettro, con scarsa propensione a rivedere le scelte una volta disponibili i responsi degli antibiogrammi. Sarebbe sicuramente interessante misurare il consumo di antibiotici nelle strutture, attraverso l'indicatore *Definded Daily Dose*, misurare eventuali variazioni nei rispettivi trend di utilizzo, circostanziare le modalità di impiego di alcuni antibiotici definiti critici; in particolare valutare se l'impiego avviene in prima battuta piuttosto che a seguito di precedenti fallimenti terapeutici, in monoterapia piuttosto che in associazione con altre molecole, in presenza o meno di antibiogramma. Tuttavia tali analisi specifiche andrebbero fatte a livello di laboratorio. Le domande riguardanti la comunicazione hanno dato risultati molto interessanti: viene stimato che in media solo il 67% dei risultati diagnostici è comunicato direttamente al medico curante (per telefono, o faccia a faccia durante un colloquio concordato o durante le visite di reparto); tuttavia, nella totalità dei casi, il medico ha la possibilità di controllare tali risultati direttamente dopo che vengono refertati su carta o attraverso il LIS (sistema informatizzato di laboratorio). Non sempre è facile la comunicazione fra i microbiologi e i clinici: gli incontri di persona a cadenza regolare, prevalentemente mensile, avvengono solo nel 40% degli ospedali; per la maggior parte gli incontri sono solo occasionali e avvengono per discutere casi clinici peculiari e specifiche problematiche.

Metodi per la determinazione della sensibilità agli antibiotici

Nel periodo considerato, 45 laboratori utilizzavano le linee guida CLSI, 1 laboratorio più di un tipo di linea guida, per 2 laboratori non si è avuta questa informazione. La Tabella 3 riporta i metodi e i sistemi automatizzati utilizzati dai laboratori partecipanti al progetto.

Tabella 3. AR-ISS 2006-2008: metodi e sistemi automatizzati utilizzati dai laboratori per la determinazione della sensibilità agli antibiotici

Modalità di determinazione	Numero di laboratori
Metodo utilizzato	
MIC	3
Disco	3
Sistema automatizzato	39
Più di un sistema	3
Sistemi automatizzati utilizzati	
Microscan	2
Phoenix	3
Vitek	33
Altro	1

Trasmissione dei dati e invio dei ceppi batterici

La partecipazione dei laboratori è stata buona per tutti e tre gli anni considerati, anche se non tutti i laboratori coinvolti nella sorveglianza hanno trasmesso i dati regolarmente. Il 66% (32/48) dei laboratori ha trasmesso i dati per tutti e tre gli anni. Il 63% dei laboratori ha utilizzato un supporto informatizzato per l'invio dei dati o il loro inserimento diretto su web; un terzo dei laboratori ha inviato le schede cartacee. La Tabella 4 riporta, in ordine di codice, i laboratori partecipanti e la completezza dei dati che hanno trasmesso a livello centrale.

Tabella 4. AR-ISS 2006-2008: dati trasmessi dai laboratori partecipanti, per anno

Codice di laboratorio	Dati trasmessi		
	2006	2007	2008
IT001		X	X*
IT003	X	X*	
IT004	X	X	X
IT005	X	X	X
IT006	X*	X	
IT008	X	X	X*
IT009	X	X	X
IT010	X	X*	
IT012	X	X	X
IT014	X	X	X
IT015		X	
IT016	X	X	
IT019	X	X	X
IT021	X	X*	
IT022	X		
IT024	X	X	X
IT028	X	X	X
IT029	X	X	X**
IT030	X	X	
IT031	X	X	X
IT034	X	X	X
IT035	X	X*	X**
IT036		X*	
IT037	X	X	X
IT038	X	X	X
IT039	X*		
IT042	X*	X	X
IT044	X	X	
IT045	X	X	X*
IT047	X	X	X
IT049	X*	X	X
IT050	X	X	X
IT052	X*		
IT059	X*	X	X
IT060	X	X	X
IT061	X	X	X
IT062	X		
IT064	X	X	X
IT065	X	X	X
IT067	X	X*	X
IT069	X	X	X
IT070	X	X	X
IT071	X	X	
IT072	X	X	X
IT074	X	X	X
IT075	X	X	X
IT076	X	X	X
IT077		X	X
IT079		X	X

* invio parziale;

** laboratorio partecipante al progetto MICRONET: i dati vengono acquisiti direttamente dal database di tale progetto.

Per quanto riguarda la raccolta di isolati con peculiari caratteristiche fenotipiche di particolare interesse per la sanità pubblica, con determinati profili di resistenza, nel triennio

2006-2008, 33 laboratori (67%) hanno inviato al Dipartimento MIPI dell'ISS almeno un ceppo di una delle diverse specie batteriche di interesse. In particolare 19 laboratori hanno inviato ceppi di *S. aureus*, 26 di *S. pneumoniae*, 11 di *E. faecalis/faecium*. La distribuzione sul territorio di questi laboratori che hanno contribuito alla sorveglianza inviando i ceppi batterici, rispecchia quella dell'invio delle segnalazioni: più della metà sono stati laboratori del Nord. In particolare: 18 (55%) dei laboratori erano nel Nord, 8 (24%) e 7 (21%) rispettivamente nel Centro e nel Sud e Isole.

Come illustrato nella Tabella 5, sono stati inviati un totale di 153 ceppi di *S. aureus*, 330 di *S. pneumoniae* e 61 di *E. faecalis/faecium*.

Tabella 5. AR-ISS 2006-2008: numero di ceppi inviati dai laboratori, per specie batterica

Codice di laboratorio	Numero ceppi batterici		
	<i>S.aureus</i>	<i>S.pneumoniae</i>	<i>E.faecalis/faecium</i>
IT003	-	35	-
IT005	9	9	2
IT008	10	-	-
IT009	8	39	1
IT012	-	-	1
IT014	8	1	7
IT016	6	-	-
IT019	10	69	18
IT021	-	17	1
IT024	6	3	-
IT025	9	-	-
IT028	-	4	-
IT031	10	17	12
IT034	-	5	-
IT036	-	1	-
IT037	-	7	4
IT042	13	-	-
IT044	-	11	-
IT045	3	5	-
IT049	-	2	-
IT050	-	1	-
IT059	10	23	12
IT060	8	5	-
IT061	9	17	-
IT062	9	10	2
IT064	-	13	-
IT065	-	14	-
IT069	8	-	-
IT070	7	-	1
IT072	3	5	-
IT075	7	10	-
IT077	-	3	-
IT078	-	4	-
Totale	153	330	61

Il numero di ceppi inviati è stato costante nel tempo, con un leggero aumento nell'anno 2007 (101 nel 2006, 133 nel 2007 e 97 nel 2008).

Qualità dei dati

A cadenza regolare, ovvero ad ogni trasmissione dei dati da parte dei laboratori, nel momento della transcodifica dei file in formato WHONET, ne è stata verificata la qualità. In particolare sono stati rimossi dal database i duplicati (l'isolamento dallo stesso paziente dello stesso patogeno entro 30 giorni dalla precedente segnalazione) e i record in cui mancavano variabili essenziali per l'analisi: codice del laboratorio, data del campione, materiale, organismo, dati di sensibilità agli antibiotici.

Poiché non tutte le informazioni richieste sono state sempre disponibili per tutti i laboratori, sono stati assunti anche record incompleti con risultato mancante (*missing*) per alcune variabili. Tutte le percentuali riportate nei risultati sono calcolate utilizzando come denominatori i dati disponibili per ogni variabile. Si ritiene utile quindi presentare anche la percentuale dei *missing* per ciascuna variabile, per sottolineare la necessità di acquisire informazioni di base il più possibile complete. Per quanto riguarda la variabile "sesso", una parte dei dati mancanti è stata recuperata a posteriori, evincendo l'informazione dal nome del paziente. La Tabella 6 mostra il numero totale e le percentuali di dati mancanti per le principali variabili.

Tabella 6. AR-ISS 2006-2008: dati mancanti per variabile

Variabile	n. (%)
Sesso	3143 (25)
Età	3627 (29)
Data di nascita	4111 (33)
Data di ricovero	9704 (78)
Reparto di ricovero	2202 (18)
Regime di ricovero	4117 (33)
Diagnosi	11617 (93)

Il dato mancante può avere origini diverse: la variabile può non essere riportata dal laboratorio, o può non essere estratta dal sistema.

Un controllo di qualità sulla congruenza delle date di nascita e di ricovero ha portato alla eliminazione di parte di quelle informazioni dai record: non è stato tuttavia possibile una quantificazione delle date non congruenti poiché la modifica è avvenuta in fase di ricezione dell'informazione e non sono state registrate tutte le modifiche. La variabile "diagnosi", registrata con una frequenza di poco inferiore al 7%, non viene considerata in sede di analisi perché ritenuta non rappresentativa.

Per quanto riguarda i dati di sensibilità agli antibiotici, riportiamo la percentuale di dati mancanti per gli antibiotici raccomandati dal protocollo (Tabella 7).

Da un confronto con i dati pubblicati nel precedente rapporto per gli anni 2003-2005 (5), non risultano differenze evidenti riguardo al numero di ceppi testati ovvero le percentuali di dati mancanti sugli antibiotici raccomandati dal protocollo. Il fatto che il dato di sensibilità non sia presente nel database AR-ISS non dimostra necessariamente che manca anche a livello di laboratorio; può essersi verificato invece che l'informazione non sia pervenuta al progetto. Nonostante questo, dobbiamo senz'altro considerare di migliorare la qualità di raccolta di questi dati, soprattutto per ciò che riguarda le segnalazioni di ESBL.

Tabella 7. AR-ISS 2006-2008: dati mancanti sugli antibiotici raccomandati dal protocollo

Antibiotico per microrganismo	n. (%)
<i>S. aureus</i> (4009)	
Oxacillina	264 (6)
Penicillina	325 (8)
Vancomicina	85 (2)
Rifampicina	225 (6)
Linezolid	1746 (43)
<i>S. pneumoniae</i> (846)	
Oxacillina	83 (8)
Penicillina	46 (5)
Cefotaxime e/o Ceftriaxone	241 (28)
Eritromicina	102 (12)
Clindamicina	650 (77)
<i>E. faecium/faecalis</i> (2166)	
Penicillina	737 (34)
Ampicillina/amoxicillina	136 (6)
Gentamicina (alto dosaggio)	414 (19)
Streptomicina (alto dosaggio)	523 (24)
Vancomicina	68 (3)
Teicoplanina	122 (6)
<i>K. pneumoniae/oxytoca</i> (1486)	
Ampicillina	417 (28)
Amoxicillina/Acido clavulanico	622 (42)
Cefotaxime e/o Ceftazidime	495 (33)
Aztreonam	1087 (73)
ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase)*	1258 (85)
<i>E. coli</i> (3382)**	
Amipicillina	35 (1)
Cefalosporine	12 (0)
Ciprofloxacina	229 (7)
Gentamicina	229 (7)
ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase)*	2426 (71)
<i>P. aeruginosa</i> (589)**	
Piperacillina	241 (41)
Ceftazidime	246 (42)
Ciprofloxacina	209 (35)
Gentamicina	212 (36)
ESBL (Extended Spectrum Beta-Lactamase)*	567 (96)

* la mancanza di questo dato è dovuta ad un problema di esportazione dai sistemi automatici per il saggio della sensibilità agli antibiotici.

**solo dai laboratori che possono esportare direttamente i dati dai sistemi automatizzati.

La mancanza di questa informazione, è prevalentemente legata a un problema di esportazione dai sistemi automatici per antibiogramma, nonostante che gli strumenti automatici d'identificazione e di esecuzione più diffusi in commercio e dotati di sistemi esperti, sono in grado di riconoscere, con buona sensibilità, i ceppi produttori di ESBL. È pertanto sicuramente necessario uno sforzo ulteriore al fine di ottimizzare la raccolta dei dati riguardanti la sensibilità agli antibiotici per tutte le specie sotto sorveglianza e la produzione di ESBL nei batteri Gram-negativi.

Controllo di qualità esterno

Si riportano i risultati degli esercizi per il controllo di qualità esterno (*European Quality Assurance -EQA- exercise*), effettuati in collaborazione con UK-NEQAS e offerti da EARSS, per gli anni 2007 e 2008.

Nel 2007, 41 (95%) laboratori dei 49 invitati, hanno partecipato all'esercizio.

La Tabella 8 riporta i risultati dell'identificazione e sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici dell'esercizio per l'anno 2007:

- S: sensibili;
- I: intermedi;
- R: resistenti.

La prestazione dei laboratori italiani è stata complessivamente buona sia per quanto riguarda l'identificazione che il saggio dell'antibiotico-resistenza dei ceppi testati, soprattutto se paragonata a quanto emerge dal confronto con gli altri Paesi che hanno partecipato al controllo di qualità.

Tabella 8. EQA 2007: risultato corretto, percentuale di laboratori italiani che hanno dato un risultato corretto e media europea dei risultati corretti

Campione	Risultato corretto	Laboratori italiani	Media europea
	CLSI	% corretto	% corretto
Specimen 8563 <i>Escherichia coli</i>			
<i>Identificazione</i>		100	99
Amikacina	S	100	97
Ampicillina	R	95	99
Ceftazidime	S	100	99
Cefotaxime	S	100	99
Ceftriaxone	S	100	99
Ciprofloxacina	S	100	100
Gentamicina	S	100	99
Imipenem	S	100	100
Meropenem	S	100	100
Piperacillina	R	80	81
Piperacillina-Tazobactam	S	100	98
Tobramicina	S	100	98
ESBL	Neg	100	99
Specimen 8564 <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
<i>Identificazione</i>		100	95
Amikacina	R	15	39
Ampicillina	R	100	100
Ceftazidime	R	100	93
Cefotaxime	R	100	84
Ceftriaxone	R	100	86
Ciprofloxacina	R	100	99
Gentamicina	I/S	80	72
Imipenem	S	100	100
Meropenem	S	100	99
Piperacillina	R	100	100
Piperacillin/Tazobactam	I/R	*	*
Tobramicina	R	100	98
ESBL	Pos	97	98

segue

continua

Campione	Risultato corretto	Laboratori italiani	Media europea
	CLSI	% corretto	% corretto
Specimen 8565 <i>Enterococcus faecium</i>			
<i>Identificazione</i>		95	96
Ampicillina	R	100	100
Gentamicina (alto dosaggio)	R	100	99
Teicoplanina	S	97	97
Vancomicina	R	93	98
Specimen 8566 <i>Streptococcus pneumoniae</i>			
<i>Identificazione</i>		98	99
Cefotaxime	I/S	*	*
Ceftriaxone	S	90	86
Ciprofloxacina	R	100	97
Clindamicina	R	87	86
Erithromicina	R	89	97
Oxacillina	R	84	98
Penicillina	I	21	59
Specimen 8567 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Identificazione</i>		98	98
Amikacina	S	100	95
Ceftazidime	S	34	58
Ciprofloxacina	R	100	99
Gentamicina	R	100	99
Imipenem	R	100	98
Meropenem	R	100	99
Piperacillina/Tazobactam	I/S	*	*
Tobramicina	R	100	98
Specimen 8568 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Identificazione</i>		100	98
Amikacina	S	95	97
Ceftazidime	S	88	83
Ciprofloxacina	S	98	97
Gentamicina	S	93	94
Imipenem	S/I	92	93
Meropenem	S	97	93
Piperacillina/Tazobactam	S	93	89
Tobramicina	S	97	99

* Non è stata data un'interpretazione a causa delle differenze di criteri di interpretazione utilizzati o nelle MIC.

La percentuale di corretta interpretazione è stata molto buona per i laboratori italiani partecipanti al controllo di qualità: infatti per più della metà degli esercizi, la totalità dei laboratori italiani ha ottenuto il risultato corretto. Solo in tre esercizi, meno del 40% dei laboratori italiani ha dato un risultato corretto; esercizi che hanno creato “difficoltà” anche agli altri laboratori europei partecipanti. Per il resto, più dell'80% dei laboratori ha fornito un'interpretazione corretta delle resistenze. Nel complesso sono quindi dati incoraggianti dal momento che il 70% dei laboratori italiani ha superato o eguagliato la media europea delle performance.

Nel 2008 sono stati interessati nel controllo di qualità esterno 48 laboratori; tutti hanno risposto e inviato i risultati.

La Tabella 9 mostra i risultati dei test di identificazione e sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici, per l'anno 2008.

Tabella 9. EQA 2008: risultato corretto, percentuale di laboratori italiani che hanno dato un risultato corretto e media europea dei risultati corretti

Campione	Risultato corretto	Laboratori italiani	Media europea
	CLSI	% corretto	% corretto
Specimen 9010 <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
<i>Identificazione</i>		100%	99%
Amikacina	S	100%	99%
Amoxicillina	R	100%	98%
Ampicillina	R	100%	100%
Ceftazidime	S	100%	98%
Cefotaxime	S	100%	99%
Ceftriaxone	S	100%	97%
Ciprofloxacina	S	100%	100%
Gentamicina	R	100%	99%
Imipenem	S	100%	99%
Meropenem	S	100%	99%
Piperacillina	R	100%	96%
Piperacillina-Tazobactam	S	51%	46%
Tobramicina	I	87%	85%
ESBL	Neg	92%	89%
Specimen 9011 <i>Escherichia coli</i>			
<i>Identificazione</i>		100%	98%
Amikacina	S	100%	98%
Amoxicillina	R	100%	99%
Ampicillina	R	100%	100%
Ceftazidime	R	100%	99%
Cefotaxime	R	97%	74%
Ceftriaxone	R	56%	85%
Ciprofloxacina	R	100%	100%
Gentamicina	R	100%	99%
Imipenem	S	100%	99%
Meropenem	S	100%	100%
Piperacillina		78%	87%
Piperacillina/Tazobactam	S	89%	67%
Tobramicina	I	52%	39%
ESBL	Neg	76%	69%
Specimen 9012 <i>Klebsiella pneumoniae</i>			
<i>Identificazione</i>		99%	98%
Amikacina	S	100%	99%
Amoxicillina		90%	97%
Ampicillina	R	100%	99%
Ceftazidime	R	93%	94%
Cefotaxime	R	92%	89%
Ceftriaxone	R	88%	92%
Ciprofloxacina	S	100%	100%
Gentamicina	S	100%	100%
Imipenem	S	100%	100%
Meropenem	S	100%	100%
Piperacillina	R	92%	93%
Piperacillina/Tazobactam	S	91%	75%
Tobramicina	S	100%	97%
ESBL	Pos	98%	98%

segue

continua

Campione	Risultato corretto	Laboratori italiani	Media europea
	CLSI	% corretto	% corretto
Specimen 9013 <i>Enterococcus faecium</i>			
<i>Identificazione</i>			
Amoxicillina	R	100%	99%
Ampicillina	R	100%	96%
Teicoplanina	R	96%	99%
Vancomicina	S	100%	97%
Gentamicina (alto dosaggio)	R	78%	96%
	R	94%	82%
Specimen 9014 <i>Streptococcus pneumoniae</i>			
<i>Identificazione</i>			
Cefotaxime		100%	98%
Ceftriaxone	S	94	96%
Oxacillina (test di screening)	S	97	96%
Clindamicina	R	88%	86%
Eritromicina	S	90%	96%
Penicillina-G	R	98%	97%
Interpretazione: Meningiti	I	63%	74%
Polmoniti	R	52%	70%
Norfloxacina 10mg screen disc	S	69%	56%
Ciprofloxacina 1ug or 5ug	R	95	32%
	I	95%	24%
Specimen 9015 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<i>Identificazione</i>			
Amikacina		100%	98%
Ceftazidime	S	100%	100%
Ciprofloxacina	R	92%	94%
Gentamicina	S	100%	100%
Imipenem	S	100%	99%
Meropenem	R	93%	87%
Piperacillina/Tazobactam	I	7%	16%
Tobramicina	R	93%	92%
	S	100%	99%

Negli esercizi del 2008, i laboratori italiani confermano ottime performance: nel 50% degli esercizi la totalità dei laboratori italiani ha ottenuto risultati corretti; un terzo degli esercizi sono stati eseguiti correttamente da più dell'80% dei laboratori italiani. In più della metà degli esercizi, i laboratori italiani hanno superato le performance dei colleghi europei.

Alcune volte la bassa percentuale di concordanza dipende da una complessa interpretazione del dato di sensibilità come ad esempio nel caso di *S. pneumoniae*, in cui si richiedeva di differenziare l'interpretazione a seconda della patologia (meningite o polmonite). In altri casi, la bassa performance dei laboratori italiani corrisponde con una bassa performance generale; ciò è stato attribuito da UK-NEQAS a problemi inerenti ai ceppi inviati (stabilità della resistenza).

RISULTATI DELLA SORVEGLIANZA EPIDEMIOLOGICA

Segnalazioni inviate

Sono state inviate un totale di 12.458 segnalazioni di ceppi isolati, di cui 4.601 (37%) nel 2006, 4.548 (36%) nel 2007 e 3.309 (27%) nel 2008.

La Tabella 10 mostra il numero di ceppi segnalati al progetto AR-ISS nei tre anni in studio, nel totale e per ciascun patogeno sotto sorveglianza.

Tabella 10. AR-ISS 2006-2008: numero di isolati segnalati per microrganismo, per anno e loro distribuzione percentuale

Microrganismo	2006	2007	2008	Totale (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.513	1.502	991	4.006 (32,2)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	329	320	189	838 (6,7)
<i>Enterococcus spp.</i>	801	753	608	2.162 (17,4)
<i>E. faecalis</i>	576	468	371	1.415 (11,4)
<i>E. faecium</i>	225	285	237	747 (6,0)
<i>Klebsiella spp.</i>	519	546	418	1.483 (11,9)
<i>K. pneumoniae</i>	425	428	338	1.191 (9,6)
<i>K. oxytoca</i>	94	118	80	292 (2,3)
<i>Escherichia coli</i>	1.218	1.231	931	3.380 (27,1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	221	196	172	589 (4,7)
Totale	4.601	4.548	3.309	12.458

Di seguito vengono riportati i risultati epidemiologici per ciascun ceppo batterico in studio.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus è un importante agente patogeno dell'uomo responsabile di batteriemie, polmoniti, meningiti, artriti settiche, infezioni della cute e dei tessuti molli (SSTI) sia in ambito ospedaliero che comunitario a livello mondiale, in tutti i gruppi di età. La penicillina G che negli anni '40 era il trattamento di scelta per le infezioni causate da *S. aureus* ha avuto vita breve a causa dell'isolamento di ceppi produttori di penicillinasi descritti da Kirby già nel 1943 (9). A partire dal 1960, ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA), la prima penicillina semisintetica resistente alle penicillinasi, sono progressivamente emersi in tutto il mondo (10). Questi ceppi risultano pertanto resistenti a tutti i beta-lattamici e mostrando resistenza anche ad altre classi di antibiotici quali macrolidi, lincosamidi, tetracicline, gentamicina, trimetoprim e sulfamidici. Un ulteriore elemento di preoccupazione è la recente diffusione di ceppi MRSA di comunità (CA-MRSA). Questi ceppi, responsabili prevalentemente di infezioni a carico della cute e dei tessuti molli possono causare anche gravi infezioni quali polmonite necrotizzante, sepsi e meningite (11;12). Casi di infezioni sostenute da CA-MRSA sono stati descritti in ogni parte del mondo per la peculiarità dei quadri clinici dei pazienti, per lo più giovani e senza fattori di rischio, e per i differenti background genetici dei ceppi (13). Per contrastare la rapida diffusione dei ceppi

MRSA la vancomicina, introdotta a metà degli anni '50, ha rappresentato, per anni, il caposaldo nel trattamento delle infezioni sostenute da questi ceppi. L'uso eccessivo e poco razionale di questo glicopeptide con il conseguente aumento della pressione selettiva ha portato all'emergenza di ceppi con diminuita sensibilità alla vancomicina. A tutt'oggi in letteratura sono riportati 11 ceppi di *S. aureus* resistenti alla vancomicina (*Vancomycin-Resistant S. aureus* VRSA) (14) e sempre più frequenti sono le segnalazioni di ceppi con resistenza intermedia (*Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus*, VISA). Di recente, due nuove molecole antibiotiche quali linezolid e daptomicina, introdotte come alternativa terapeutica alle infezioni sostenute da MRSA con diminuita sensibilità alla vancomicina, si sono dimostrate molto efficaci. Poiché è difficile predire per quanto tempo linezolid e daptomicina conserveranno la loro efficacia nei confronti dei ceppi MRSA è importante che opportune misure di controllo e prevenzione siano adottate al fine di impedire una maggiore diffusione di questi ceppi sia in ospedale che in comunità.

Analisi dei dati

Durante il triennio in studio sono stati segnalati ad AR-ISS 3.974 ceppi di *S. aureus* isolati da sangue (99,2%) e 32 (0,8%) da liquor, per un totale di 4.006.

Il numero di ceppi segnalati dai laboratori partecipanti alla rete, si è mantenuto pressoché stabile negli anni; la flessione del 2008 è attribuibile a un numero minore di laboratori partecipanti. Non risultano variazioni significative neppure nella loro distribuzione mensile (range 69-155) (Figura 2).

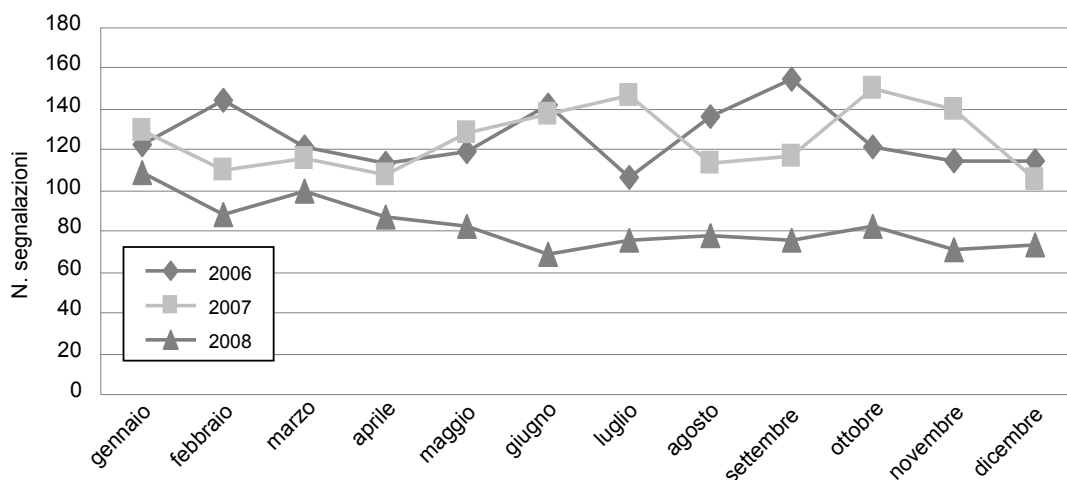


Figura 2. AR-ISS 2006-2008: distribuzione mensile delle segnalazioni di *S. aureus*

Sono state segnalate in media al mese 87 (range 69-155) infezioni invasive sostenute da questo microrganismo. Sono state raccolte 2.781 segnalazioni di *S. aureus* dal Nord (che contribuisce quindi per più di due terzi), 465 dal Centro e 760 dal Sud e Isole (Tabella 11). La frequenza delle segnalazioni si mantiene pressoché stabile in ciascuna area geografica (Tabella 11).

La Regione che maggiormente ha contribuito alla sorveglianza con più del 20% delle segnalazioni inviate, è stata l'Emilia Romagna; a seguire il Piemonte i cui laboratori hanno inviato il 16% delle segnalazioni (Tabella 12).

Tabella 11. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *S. aureus* per area geografica

Area geografica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Nord	1.066	70,4	1.015	67,6	700	70,6	2.781	69,4
Centro	186	12,3	208	13,8	71	7,2	465	11,6
Sud e Isole	261	17,3	279	18,6	220	22,2	760	19,0

Tabella 12. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *S. aureus* per Regione partecipante

Regione	n. laboratori	n. segnalazioni	n. medio di segnalazioni per laboratorio
Abruzzo	1	44	44
Bolzano (PA)	1	156	156
Calabria	2	67	33
Campania	1	59	59
Emilia Romagna	6	978	163
Friuli-Venezia Giulia	1	64	64
Lazio	4	247	62
Liguria	1	64	64
Lombardia	5	433	87
Marche	1	168	168
Piemonte	8	643	80
Puglia	2	158	79
Sardegna	3	287	96
Sicilia	2	145	72
Toscana	2	40	20
Trento (PA)	2	293	146
Umbria	1	10	10
Veneto	3	150	50
Totale	46	4.006	87

La Tabella 13 descrive le caratteristiche dei pazienti con infezione invasiva da *S. aureus* inclusi nella sorveglianza per gli anni 2006-2008. Circa il 60% dei pazienti era di sesso maschile e aveva un'età ≥ 65 anni. Al momento dell'isolamento, il 93,6% dei pazienti era ricoverato. Non si evidenziano rilevanti differenze fra aree geografiche per ciò che riguarda la distribuzione per le caratteristiche considerate, in quanto l'analisi dei dati riguardanti il sesso, le classi d'età e il regime di ricovero, ripartiti per area geografica rispecchia quella dei dati aggregati a livello nazionale presentati nella Tabella 13.

Tabella 13. AR-ISS 2006-2008: caratteristiche dei pazienti con infezione da *S. aureus*

Caratteristica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Sesso								
F	531	40,9	439	38,9	275	40,9	1.245	40,1
M	768	59,1	690	61,1	398	59,1	1.856	59,9
Classe di età								
0-15	45	3,5	37	3,1	28	4,1	110	3,5
16-64	455	34,9	419	35,1	215	31,6	1.089	34,3
≥ 65	802	61,6	739	61,8	437	64,3	1.978	62,3
Regime di ricovero								
paziente ricoverato	1.237	93,1	924	94,6	451	93,0	2.612	93,6
paziente ambul./esterno	56	4,2	32	3,3	9	1,9	97	3,5

Nei reparti di medicina è stato isolato il 46,9% dei ceppi, il 14,4% dei ceppi è stato isolato da pazienti ricoverati in reparti di terapia intensiva e il 10,5% da pazienti ricoverati in reparti di chirurgia (Tabella 14). Il profilo di antibiotico-resistenza dei ceppi di *S. aureus* mostra una resistenza media alla penicillina di poco inferiore all'86% e una resistenza alla oxacillina del 35%. La percentuale di resistenti alla eritromicina e alla ciprofloxacina è di poco inferiore al 35%, la percentuale di resistenza alla clindamicina è del 20%, mentre per la gentamicina è inferiore al 30% (Tabella 15, Figura 3).

Tabella 14. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *S. aureus* per reparto di ricovero

Reparto di ricovero	n.	%
Medicina	1.315	46,9
Terapia intensiva	403	14,4
Chirurgia	295	10,5
Malattie infettive	237	8,5
Dialisi	107	3,8
Pronto soccorso/DEA (Dipartimento Emergenza Accettazione)	90	3,2
Ematologia/oncologia	75	2,7
Pediatria	43	1,5
Ostetricia/ginecologia	8	0,3
Altro	230	8,2

Tabella 15. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza nei ceppi di *S. aureus* segnalati

Antibiotico	n. ceppi testati	% S	% I	% R	IC 95% R
Penicillina	3.684	14,2	0,1	85,7	84,5-86,8
Oxacillina	3.745	65,0	0,0	35,0	33,5-36,6
Clindamicina	3.609	79,3	0,4	20,3	19,0-21,7
Ciprofloxacina	3.669	64,4	1,4	34,2	32,7-35,8
Eritromicina	3.752	64,9	1,0	34,1	32,6-35,6
Gentamicina	3.685	74,4	1,3	24,3	22,9-25,7
Rifampicina	3.784	91,3	2,5	6,2	5,5-7,0
Tetraciclina	2.728	92,9	0,2	6,9	6,0-7,9

IC: Intervallo di confidenza

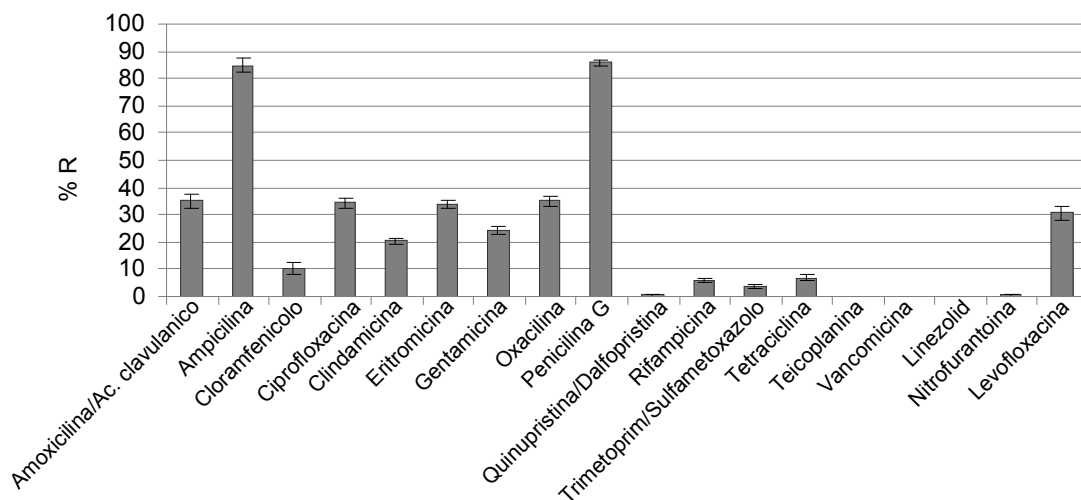


Figura 3. AR-ISS 2006-2008: frequenza di resistenza agli antibiotici in *S. aureus* e rispettivi intervalli di confidenza

Nel periodo considerato sono stati segnalati 41 ceppi di *S. aureus* con resistenza intermedia alla vancomicina (VISA: MIC 4-8 µg/mL) e 2 ceppi resistenti (VRSA: MIC>16 µg/mL). Inoltre sono state raccolte 3 segnalazioni di ceppi di *S. aureus* con resistenza intermedia alla teicoplanina (MIC 16 µg/mL) e 3 ceppi resistenti (MIC>32). Da un più approfondito controllo avvenuto contattando telefonicamente i referenti dei laboratori, è risultato quanto segue: dei 41 ceppi VISA, 15 sono risultati MSSA e quindi probabilmente errori; gli altri 26 ceppi sono stati confermati VISA (MIC=4 µg/mL) dai laboratori. Uno dei 2 ceppi VRSA è risultato MSSA; l'altro presentava una MIC per la vancomicina >16 µg/mL. Questi dati provenienti dai referti dei sistemi automatizzati (soprattutto VITEK 2) non sono stati confermati in ISS per il mancato invio dei ceppi da parte dei laboratori.

MRSA

Negli anni 2006-2008 i ceppi di MRSA segnalati al progetto AR-ISS, sono stati 1.309 e la frequenza cumulativa della meticillino-resistenza è stata del 35,0%. Nel periodo considerato si registra una differenza statisticamente significativa nella proporzione di MRSA nei ceppi testati (χ^2 for trend=9,5; p=0,002) (Tabella 16) con un trend in diminuzione.

Tabella 16. AR-ISS 2006-2008: profilo di meticillino-resistenza nei ceppi di *S. aureus*

Anno di studio	Ceppi testati		MRSA	
	n.	n.	%	IC 95%
2006	1.513	552	36,5	34,1-39,0
2007	1.502	447	29,8	27,5-32,2
2008	991	310	31,3	28,4-34,3

Analizzando i dati raccolti dall'inizio della sorveglianza, si evince un trend in diminuzione della frequenza di meticillino-resistenza in Italia statisticamente significativo ($\chi^2=77,9$; p<0,05). In particolare si può notare che da frequenze superiori al 40% registrate negli anni 2000-2002, gli MRSA hanno abbattuto questa soglia scendendo a frequenza intorno al 35% fino al 2006. Negli ultimi due anni in studio, infine, la proporzione di MRSA nei ceppi testati è scesa di altri 5 punti percentuali, raggiungendo valori intorno al 30% (Figura 4).

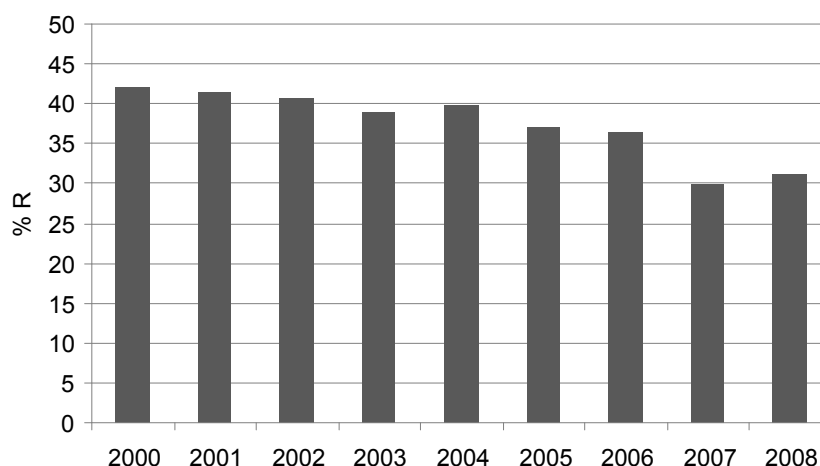


Figura 4. AR-ISS 2000-2008: andamento della resistenza alla meticillina in Italia

La Tabella 17 riporta la frequenza di meticillino-resistenza, sul totale di infezioni da *S. aureus* in relazione ad alcune caratteristiche dei pazienti e dell'ospedale presso il quale sono stati ricoverati (sesso, classi d'età e tipo di ricovero), stratificata per anno.

Tabella 17. AR-ISS 2006-2008: MRSA segnalati (n.) e frequenza di resistenza (%) per caratteristiche dei pazienti

Caratteristica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Sesso								
F	170	34,8	127	33,8	101	37,1	398	35,0
M	301	41,7	225	36,8	124	32,3	650	37,9
Classe di età								
0-15	4	10,0	10	27,0	3	11,1	17	16,3
16-64	131	31,1	97	26,7	42	20,2	270	27,2
≥65	336	44,6	262	40,0	172	40,0	770	41,9
Regime di ricovero								
paziente ricoverato	446	38,4	313	35,2	141	32,0	900	36,1
paziente ambul./esterno	10	21,3	3	10,7	1	11,1	14	16,7

Risultano associati ad una più elevata frequenza di MRSA i soggetti di età >65 anni e l'essere ricoverato nelle strutture ospedaliere ma non si evidenziano differenze significative per il sesso e per le tre area geografiche (Tabella 18).

Tabella 18. AR-ISS 2006-2008: MRSA segnalati (n.) e frequenza di resistenza (%) per area geografica

Area geografica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Nord	375	37,2	306	34,3	226	33,0	907	35,1
Centro	69	42,3	50	24,0	19	27,1	138	31,3
Sud e Isole	108	42,7	91	35,3	65	31,4	264	36,8

L'età media dei soggetti in cui è stato isolato un ceppo di MRSA è 68,9 anni.

La frequenza di MRSA varia in modo considerevole tra i diversi laboratori/ospedali partecipanti alla sorveglianza. Se si tiene conto solo dei laboratori che hanno segnalato almeno 40 infezioni invasive da *S. aureus*, l'incidenza varia da 58,0% a 10,3% nei diversi centri con una mediana della distribuzione pari al 34,4% (Figura 5).

La frequenza di meticillino-resistenza è molto più elevata nei reparti di terapia intensiva (51,7%) (Rischio Relativo, RR=1,38, IC 95%: 1,24-1,53). Nei reparti di chirurgia, la frequenza di MRSA risulta superiore al 40%; tuttavia, non vi è significatività statistica (Tabella 19).

Si registra un trend temporale in diminuzione, statisticamente significativo nei tre anni considerati ($p < 0,05$) della frequenza di MRSA nel reparto di terapia intensiva, le altre diminuzioni non sono statisticamente significative. Per gli altri reparti non si registrano variazioni di rilievo (Figura 6).

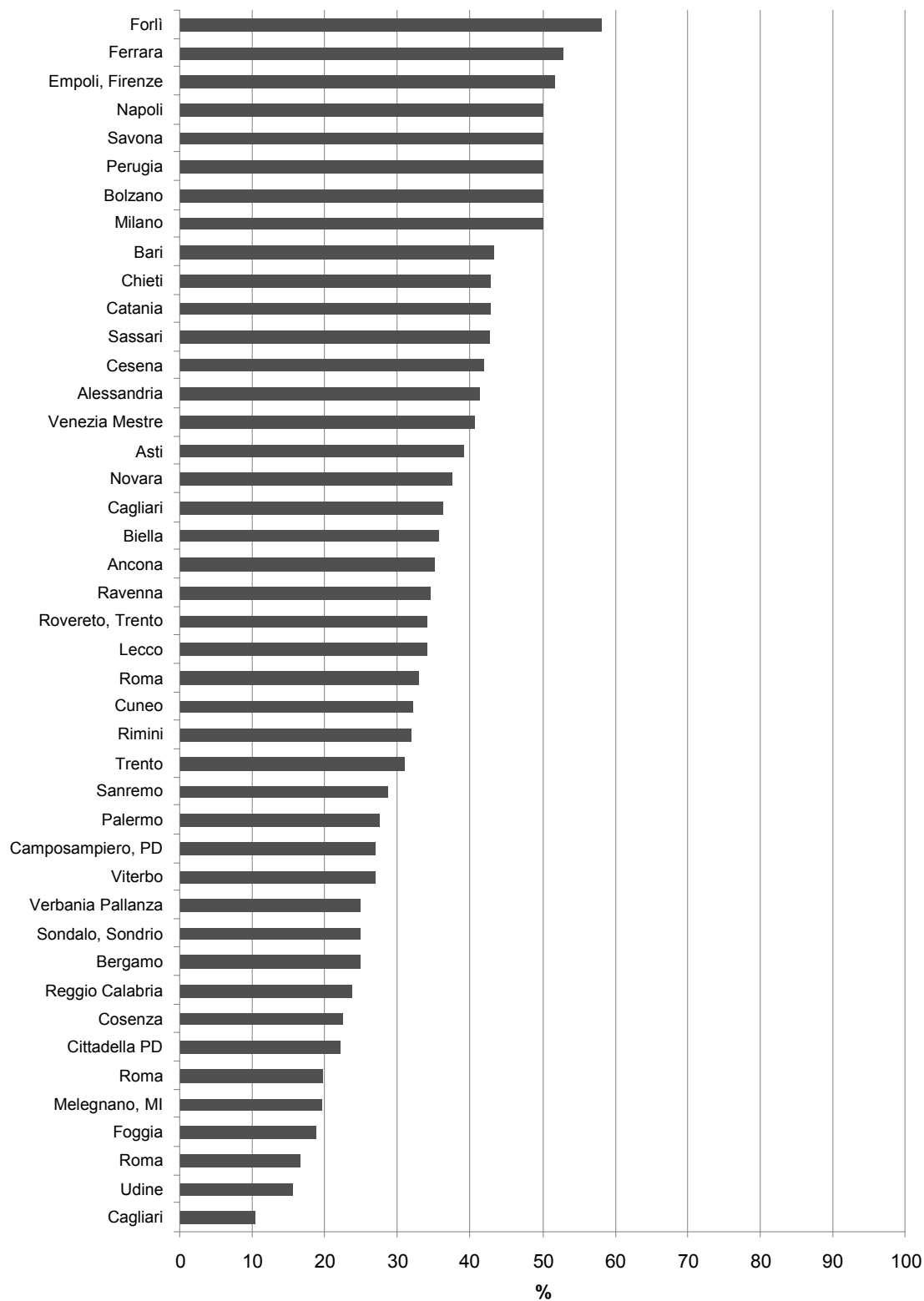


Figura 5. AR-ISS 2006-2008: percentuale di MRSA sul totale delle segnalazioni di *S. aureus*, per laboratorio

Tabella 19. AR-ISS 2006-2008: MRSA segnalati (N) e frequenza di resistenza (%) per reparto di ricovero

Reparto di ricovero	N	%
Terapia intensiva	202	51,7
Chirurgia	140	41,7
Medicina	493	33,2
Dialisi	35	30,2
Pronto soccorso/DEA	20	23,8
Malattie infettive	53	22,2
Ematologia/oncologia	16	22,2
Ostetricia/ginecologia	1	12,5
Pediatria	5	7,0
Altro	170	43,4

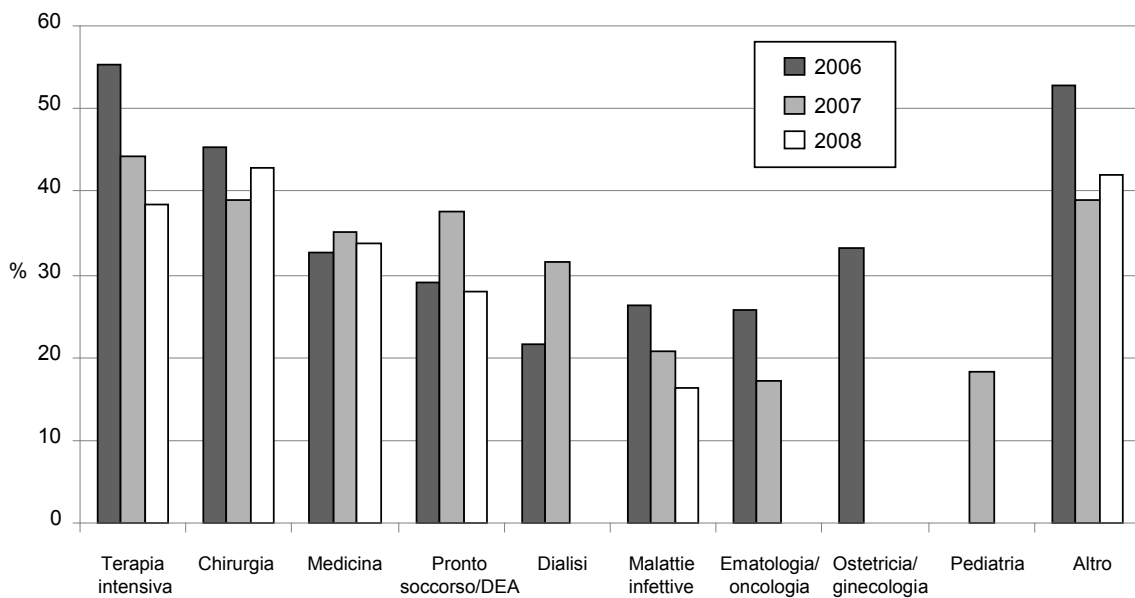


Figura 6. AR-ISS 2006-2008: percentuale di MRSA per reparto di ricovero per anno

Aggregando i reparti cosiddetti ad alto rischio (terapia intensiva, dialisi, ematologia/oncologia), la frequenza di meticillino-resistenza nei tre anni risulta pari al 43,7% (RR = 1,17; IC 95% 1,09-1,27).

Gli MRSA sono più frequentemente resistenti ad altri antibiotici rispetto ai ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-sensibili (*Methicillin-Sensitive Staphylococcus Aureus*, MSSA), poiché associano la resistenza alla meticillina a quella di altri antibiotici o classi di antibiotici (Figura 7).

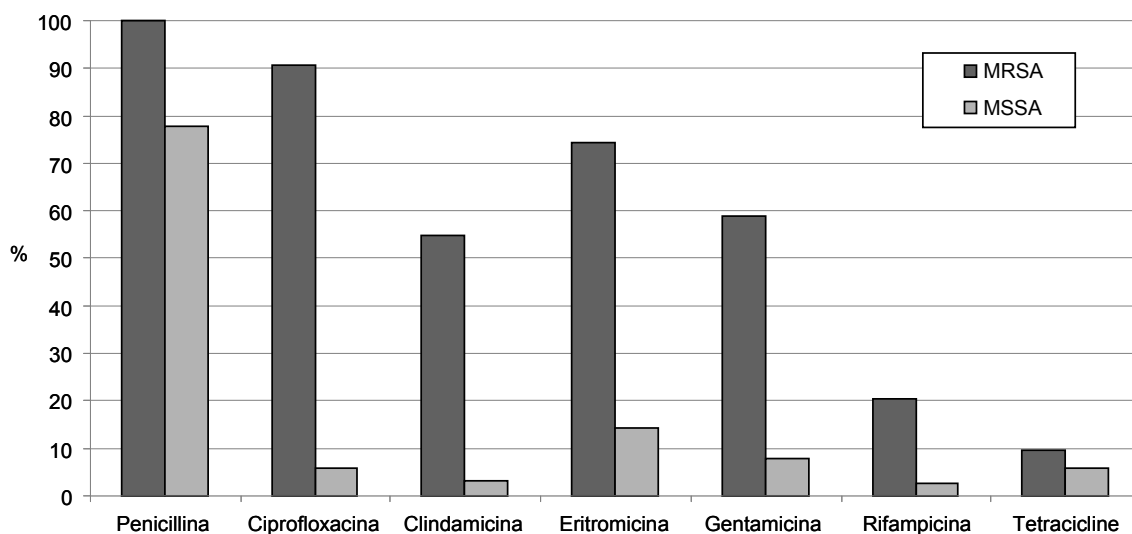


Figura 7. AR-ISS 2006-2008: percentuale dei ceppi resistenti ad altre classi di antibiotici tra gli MRSA e gli MSSA

Nella sorveglianza AR-ISS sono stati osservati ceppi di MRSA che presentano resistenza a più antibiotici (considerando tetracicline, clindamicina, eritromicina, gentamicina, rifampicina, ciprofloxacina, eritromicina, amoxicillina/ac. clavulateicoplanina, co-trimossazolo); in particolare il 24,6% di MRSA è resistente ad almeno altre 4 classi di antibiotici oltre alla meticillina; il 19,6% ad almeno 5 classi.

Streptococcus pneumoniae

Streptococcus pneumoniae (oggi comunemente detto pneumococco) è un batterio Gram-positivo, capsulato, che rappresenta un importante problema di sanità pubblica. Lo pneumococco è un ospite delle prime vie respiratorie dell'uomo, ma può diventare responsabile di processi infettivi fra cui otite media, polmonite, sinusite, sepsi e meningite sono i più importanti in termini di frequenza e/o gravità. D'altra parte, la condizione di portatore sano di *S. pneumoniae* è estremamente frequente: il 20-60% dei bambini sani e il 5-10% degli adulti sani sono portatori nasofaringei del microrganismo (15).

S. pneumoniae possiede una capsula polisaccaridica, in base alla quale sono stati identificati 91 sierotipi diversi. Tuttavia, la maggior parte delle malattie invasive in età pediatrica è causata da un numero limitato di sierotipi. Negli Stati Uniti, gli studi effettuati in epoca prevaccinale hanno evidenziato che i sierotipi 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F e 23F erano responsabili di oltre il 90% di casi di malattie invasive. Questa osservazione ha portato allo sviluppo di un vaccino 7-valente coniugato (PCV-7), che includesse tali sierotipi (16).

L'epidemiologia delle malattie da pneumococco è influenzata da diversi fattori tra i quali l'area geografica, la prevalenza dei sierotipi, l'età e lo stato vaccinale della popolazione. L'incidenza maggiore delle malattie pneumococciche si registra nelle età estreme della vita: nei bambini fino all'età di 5 anni e negli anziani. In Italia, i dati sulle malattie invasive da pneumococco, mostrano stime di incidenza nel 2008 pari a 5,5/100.000 fra i bambini con meno di 1 anno di età e a

2,6/100.000 fra gli ultrasessantacinquenni; l'incidenza di meningite risulta pari a 2,0/100.000 e 1,0/100.000 nelle stesse classi di età, rispettivamente (17).

La diffusione della resistenza alla penicillina (e ai beta-lattamici in generale) nei ceppi di pneumococco rappresenta un aspetto particolarmente temibile, con ripercussioni sulla terapia soprattutto della meningite. Tuttavia la maggior parte dei sierotipi che manifestano questa resistenza sono compresi nel vaccino PCV-7 attualmente disponibile (si tratta in particolare dei sierogruppi 6, 9, 14, 19 e 23): per questo motivo la vaccinazione ad oggi rappresenta un'importante arma di prevenzione e potrebbe essere un buon sistema per portare alla diminuzione delle resistenze (18).

Analisi dei dati

Nel triennio 2006-2008 sono stati segnalati ad AR-ISS 838 ceppi di *S. pneumoniae* di cui 118 (14,1%) isolati da liquor e 720 (85,9%) da sangue. La distribuzione annuale mette in evidenza un sostanziale mantenimento stabile del numero di segnalazioni da parte dei laboratori partecipanti negli anni, tranne per il 2008 (329 nel 2006, 320 nel 2007 e 189 nel 2008).

Per tutti e tre gli anni i ceppi segnalati sono stati isolati soprattutto durante i mesi invernali (Figura 8). Mediamente sono stati segnalati 23 ceppi di *S. pneumoniae* per mese (range 5-47).

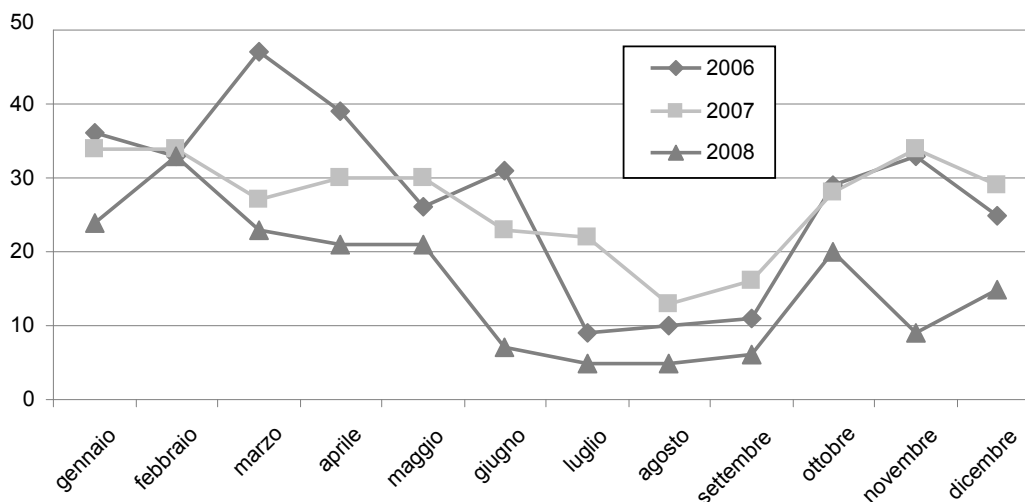


Figura 8. AR-ISS 2006-2008: distribuzione mensile delle segnalazioni di *S. pneumoniae*

La maggior parte delle segnalazioni provengono da laboratori del Nord (Tabella 20).

Tabella 20. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *S. pneumoniae* per area geografica

Area geografica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Nord	271	82	264	83	160	85	695	83
Centro	12	4	22	7	1	0,5	35	4
Sud e Isole	46	14	34	10	28	14,5	108	13

La Tabella 21 mostra la distribuzione per Regione delle segnalazioni degli isolati di *S. pneumoniae* nel totale dei tre anni.

Tabella 21. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *S. pneumoniae* per Regione partecipante*

Regione	n. laboratori	n. segnalazioni	n. medio di segnalazioni per laboratorio
Abruzzo	1	3	3
Bolzano (PA)	1	32	32
Calabria	2	12	6
Campania	2	21	10
Emilia Romagna	6	187	31
Friuli-Venezia Giulia	1	7	7
Lazio	3	19	6
Liguria	1	8	8
Lombardia	6	164	27
Marche	1	15	15
Puglia	2	18	9
Sardegna	3	48	16
Sicilia	2	6	3
Toscana	1	1	1
Trento (PA)	2	95	47
Veneto	3	56	19
Totale	42	838	20

* Il Piemonte e l'Umbria non hanno inviato dati

Nella sorveglianza AR-ISS, il 60,6% dei ceppi di *S. pneumoniae* è stato isolato in soggetti di sesso maschile e il 48,2% in soggetti di età superiore ai 65 anni (età media 55 anni; range 0-101). Al momento della segnalazione il 91,5% dei pazienti era ricoverato (Tabella 22).

Tabella 22. AR-ISS 2006-2008: caratteristiche dei pazienti con infezione da *S. pneumoniae*

Caratteristica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Sesso								
F	103	38,7	96	45,3	35	30,2	234	39,4
M	163	61,3	116	54,7	81	69,8	360	60,6
Classe di età								
<5	36	13,0	29	11,2	9	7,8	74	11,4
5-15	11	4,0	4	1,6	7	6,1	22	3,4
16-64	100	36,1	98	38,0	43	37,4	241	37,1
≥65	130	46,9	127	49,2	56	48,7	313	48,2
Regime di ricovero								
paziente ricoverato	274	91,3	182	90,1	71	95,9	527	91,5
paziente ambul./esterno	12	4,0	5	2,5	1	1,4	18	3,1

Effettuando un'analisi stratificata per area geografica dei dati riguardanti il sesso, le classi di età e il regime di ricovero, non emergono sostanziali differenze con i dati presentati per tutto il territorio nazionale.

Più del 40% delle segnalazioni di *S. pneumoniae* proviene da reparti di medicina; circa il 20% proviene da reparti di malattie infettive (Tabella 23).

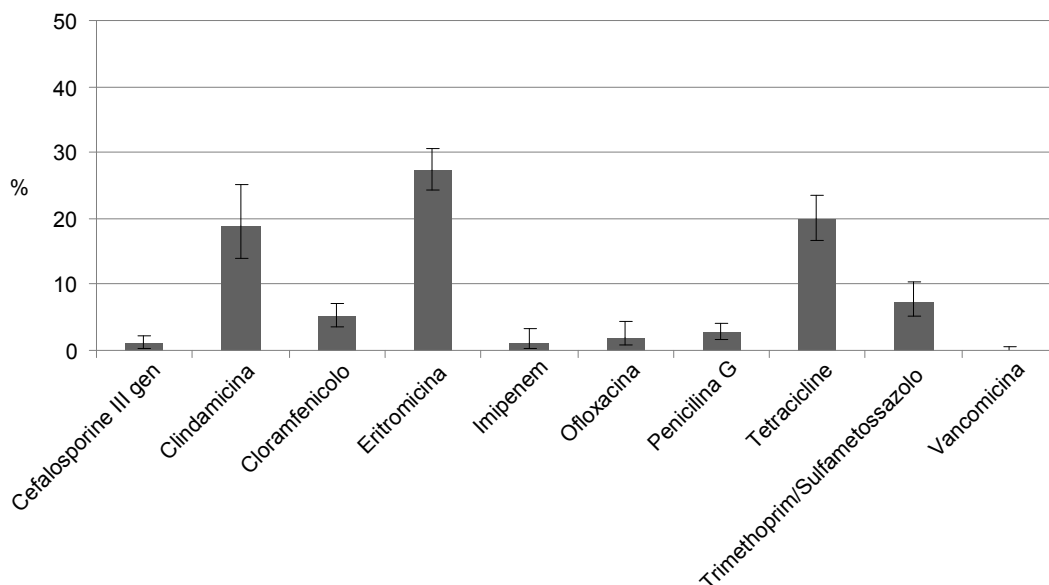
Tabella 23. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *S. pneumoniae* per reparto di ricovero

Reparto di ricovero	n.	%
Medicina	236	40,9
Malattie infettive	136	23,6
Pediatria	65	11,3
Terapia intensiva	51	8,8
Pronto soccorso/DEA	25	4,3
Chirurgia	8	1,4
Ematologia/oncologia	6	1,0
Dialisi	3	0,5
Altro	47	8,1

Il profilo di antibiotico-resistenza dei ceppi di *S. pneumoniae* segnalati ad AR-ISS, nei confronti degli antibiotici più frequentemente saggiati (Tabella 24), mostra una resistenza alla penicillina del 2,6% e a eritromicina intorno al 30% (Figura 9).

Tabella 24. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza in *S. pneumoniae* segnalati

Antibiotico	Ceppi testati n.	% S	% I	% R	%R IC 95%
Penicillina	800	89,2	8,1	2,6	1,7-4,0
Cefalosporine III gen	605	98,0	1,0	1,0	0,4-2,3
Eritromicina	744	69,8	2,8	27,3	24,2-30,7
Clindamicina	196	79,6	1,5	18,9	13,8-25,2
Tetracicline	554	78,5	1,4	20,0	16,8-23,6
Cloramfenicolo	667	94,9	0,0	5,1	3,6-7,1
Imipenem	344	97,7	0,9	1,2	0,4-3,2
Ofloxacina	306	95,8	2,3	2,0	0,8-4,5
Trimetroprim/sulfametossazolo	452	81,4	11,0	7,5	5,3-10,4

**Figura 9. AR-ISS 2006-2008: antibiotico-resistenza in isolati di *S. pneumoniae***

Nel periodo considerato, non è stato segnalato alcun ceppo resistente o intermedio alla vancomicina su 759 ceppi testati.

Il 9,8% dei ceppi è risultato resistente ad almeno due antibiotici, il 5,3% ad almeno tre, il 1,1% ad almeno quattro (penicillina, eritromicina, tetracicline, cloramfenicolo, clindamicina, ceftriaxone/cefotaxime, imipenem, ofloxacina).

S. pneumoniae non sensibile alla penicillina

La prevalenza di *S. pneumoniae* non sensibili alla penicillina (*Penicillin-Nonsusceptible Streptococcus Pneumoniae*, PNSSP) che comprendono i ceppi sensibili in maniera intermedia (MIC da 0,12 a 1,0 µg/mL) e gli altamente resistenti (MIC >2 µg/mL), segnalati al progetto AR-ISS in questi 3 anni di sorveglianza, è complessivamente del 10%. Non si evidenzia, nel periodo considerato, un trend significativo in aumento di prevalenza di *S. pneumoniae* non sensibili alla penicillina rispetto ai ceppi testati; in particolare è variata dal 7,3% nel 2006, al 13,8% nel 2007, al 9,5% nel 2008 (Figura 10).

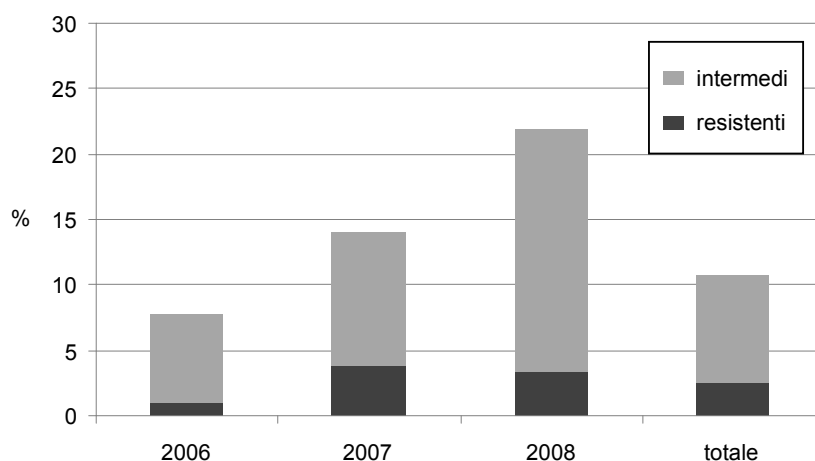


Figura 10. AR-ISS 2006-2008: percentuale di ceppi non sensibili alla penicillina in isolati di *S. pneumoniae*

La penicillino-non suscettibilità è risultata maggiore nei bambini di età inferiore ai 5 anni (17,6%) rispetto alle altre classi di età (4,5% nei soggetti di età compresa fra 5 e i 15 anni, 12% nei soggetti di età compresa fra i 16 e i 64 anni; 6,1% nei soggetti di età superiore ai 65 anni) e tali differenze risultano statisticamente significative (Tabella 25).

È risultata significativamente più alta la frequenza di ceppi non sensibili alla penicillina al Centro e al Sud (rispettivamente 17,1% e 15,7%) rispetto al Nord (9,2%); maggiore nei maschi (12,4%) rispetto nelle femmine (9,2%) (RR: 0,96; IC 95%: 0,91-1,02); più elevata nei reparti di pronto soccorso/DEA (Tabella 26), rispetto agli altri reparti, senza tuttavia nessuna significatività statistica.

Spesso risulta un'associazione fra la resistenza alla penicillina e quella ad altri antibiotici: i ceppi di *S. pneumoniae* resistenti alla penicillina, sono molto più frequentemente resistenti anche ad altri antibiotici o classi di antibiotici, rispetto ai ceppi sensibili (Figura 11).

Tabella 25. AR-ISS 2006-2008: PNSSP segnalati (n.) e frequenza di resistenza (%) per classe d'età, per anno

Classe d'età	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
0-4	7	19,4	4	13,8	2	22,2	13	17,6
5-15	0	0	0	0	1	14,3	1	4,5
16-64	9	9,0	15	15,3	5	11,6	29	12,0
≥65	4	3,1	14	11,0	1	1,8	19	6,1

Tabella 26. AR-ISS 2006-2008: PNSSP segnalati (N) e frequenza di resistenza (%) per reparto di ricovero

Reparto di ricovero	n.	%
Pronto soccorso/DEA	4	16,0
Pediatria	7	10,8
Malattie infettive	13	9,5
Medicina	22	9,3
Terapia intensiva	3	5,1

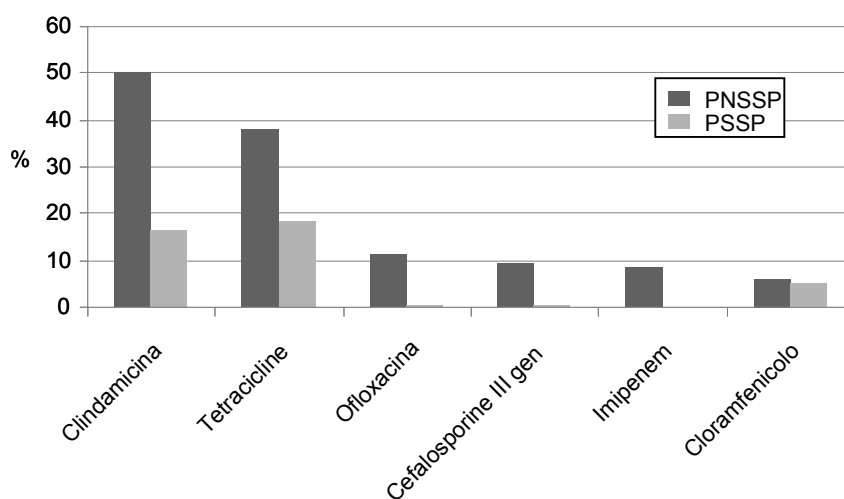


Figura 11. AR-ISS 2006-2008: percentuale di ceppi resistenti agli antibiotici tra gli isolati di *S. pneumoniae* sensibili (PSSP) e non sensibili (PNSSP) alla penicillina

***S. pneumoniae* non sensibili alla eritromicina**

La percentuale di ceppi di *S. pneumoniae* resistenti alla eritromicina, che sono stati segnalati al progetto AR-ISS in questi 3 anni di sorveglianza, si è mantenuta intorno al 27% (Figura 12): in particolare è variata dal 27,7% nel 2006, al 28,4% nel 2007, al 22,2% nel 2008.

La resistenza alla eritromicina è maggiore nei bambini di età inferiore ai 5 anni (35,1%), rispetto alle altre classi di età (18,2% nei bambini di età compresa fra i 5 e i 15 anni; 26,6% nei soggetti di età compresa fra i 16 e i 64 anni; e infine 23,6% in quelli di età >65 anni) (Tabella 27).

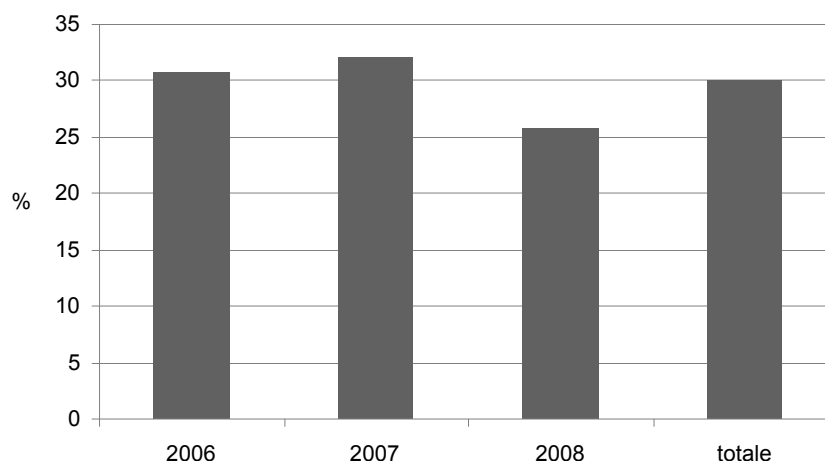


Figura 12. AR-ISS 2006-2008: percentuale di ceppi resistenti alla eritromicina in isolati di *S. pneumoniae*

Tabella 27. AR-ISS 2006-2008: ceppi di *S. pneumoniae* resistenti a eritromicina segnalati (n.) e frequenza di resistenza (%) per classe d'età, per anno

Classe d'età	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
0-4	8	22,2	16	55,2	2	22,2	26	35,1
5-15	2	18,2	1	25,0	1	14,3	4	18,2
16-64	31	31,0	26	26,5	7	16,3	64	26,6
≥65	38	29,2	23	18,1	13	23,2	74	23,6

Risulta altresì maggiore nelle femmine (29,9%) rispetto ai maschi (26,9%) (RR: 0,96; IC 95%: 0,86-1,06) e più alta al Sud (36,1%) rispetto al Centro (28,6%) e al Nord (25,2%). Non si evidenzia alcuna significatività statistica in queste differenze. È più elevata, inoltre, nei reparti di pronto soccorso, chirurgia e malattie infettive benché la differenza non sia statisticamente significativa rispetto agli altri reparti nei quali più frequentemente vengono isolati ceppi di *S. pneumoniae* resistenti a tale antibiotico (Tabella 28).

Tabella 28. AR-ISS 2006-2008: ceppi di *S. pneumoniae* resistenti a eritromicina segnalati (n.) e frequenza di resistenza (%) per reparto di ricovero

Reparto di ricovero	n.	%
Pronto soccorso/DEA	12	33,3
Chirurgia	6	31,6
Malattie infettive	39	28,3
Pediatria	22	27,5
Medicina	95	25,2
Terapia intensiva	12	21,8

Spesso risulta un'associazione fra la resistenza alla eritromicina e quella ad altri antibiotici: i ceppi di *S. pneumoniae* resistenti alla eritromicina, sono molto più frequentemente resistenti anche ad altri antibiotici o classi di antibiotici, rispetto ai ceppi sensibili (Figura 13).

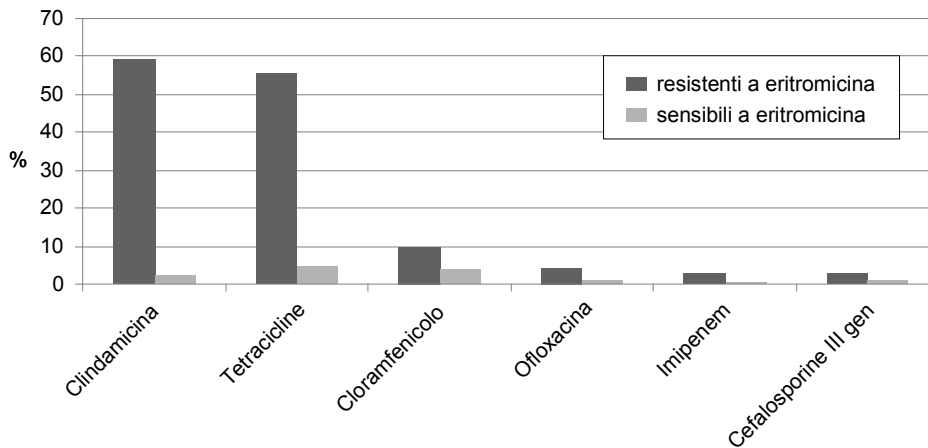


Figura 13. AR-ISS 2006-2008: percentuale di ceppi resistenti agli antibiotici tra gli isolati di *S. pneumoniae* sensibili e resistenti alla eritromicina

Fra gli isolati testati sia per la penicillina che per la eritromicina (718, 85,7% del totale dei ceppi di *S. pneumoniae* segnalati al progetto), il 6,1% risulta non sensibile ad entrambi questi antibiotici.

Enterococcus faecalis/faecium

Gli enterococchi sono cocchi Gram-positivi, organismi commensali comuni nell'intestino umano. Negli ultimi decenni sono emersi come importanti patogeni nosocomiali e in particolare due specie, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*, sono responsabili della maggior parte delle infezioni umane dovute a questi batteri, quali infezioni del tratto urinario, endocarditi, sepsi e raramente meningiti. La caratteristica principale di questo genere è l'elevato livello di resistenza agli antibiotici. Alcuni enterococchi sono intrinsecamente resistenti agli antibiotici beta-lattamici, penicilline e cefalosporine e a basse concentrazioni di aminoglicosidi.

Nonostante che la vancomicina sia in uso dal 1950, enterococchi vancomicina-resistenti (*Vancomycin-Resistant Enterococci*, VRE) sono stati osservati dalla metà degli anni '80. Dal 1990, tuttavia, un aumento drammatico dei VRE si è verificato soprattutto nei reparti di terapia intensiva, e quindi in tutto il contesto ospedaliero. Studi americani indicano che quasi il 30% di tutti gli enterococchi isolati da pazienti in terapia intensiva sono resistenti alla vancomicina.

Analisi dei dati

Durante il triennio considerato sono stati segnalati ad AR-ISS 2.162 ceppi di *E. faecalis/faecium*, per la maggior parte isolati da sangue (98,3%); i ceppi isolati da liquor sono solo una piccola percentuale (1,7%).

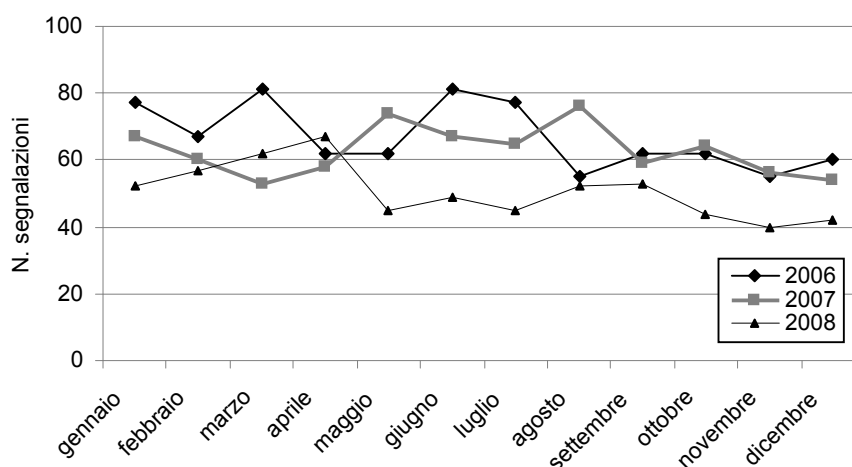
Per la maggior parte si tratta di *E. faecalis* (1.415, 65,4%; rispetto a *E. faecium*: 747, 34,6%). Nell'arco dei tre anni, il rapporto fra le due specie, è cresciuto debolmente a favore di *E. faecium* rispetto a *E. faecalis* (Tabella 29).

Tabella 29. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *E. faecalis* e di *E. faecium* per anno

Specie	2006 n.	2007 n.	2008 n.	Totale n. (%)
<i>E. faecalis</i>	576	468	371	1.415 (65)
<i>E. faecium</i>	225	285	237	747 (35)
Totale	801	753	608	2.162

Il numero delle segnalazioni è di poco diminuito nei tre anni, passando da 801 nel 2006, a 753 nel 2007 e a 608 nel 2008.

Non si evidenziano variazioni significative nella distribuzione mensile delle segnalazioni in nessuno dei tre anni in studio (Figura 14). Mediamente sono stati riportati 60 *E. faecalis/faecium* (39 *E. faecalis*, 21 *E. faecium*) per mese (range 40-81).

Figura 14. AR-ISS 2006-2008: distribuzione mensile delle segnalazioni degli isolati di *E. faecalis/faecium*

Più della metà delle segnalazioni, proviene dal Nord per entrambe le specie (Tabella 30).

Tabella 30. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *E. faecalis/faecium* per area geografica

Area geografica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
<i>E. faecalis</i>								
Nord	381	66,1	281	60,0	209	56,3	871	61,5
Centro	72	12,5	80	17,1	49	13,2	201	14,2
Sud e Isole	123	21,4	107	22,9	113	30,5	343	24,3
<i>E. faecium</i>								
Nord	152	67,5	189	66,3	162	68,4	503	67,3
Centro	26	11,6	33	11,6	23	9,7	82	11,0
Sud e Isole	47	20,9	63	22,1	52	21,9	162	21,7

La Tabella 31 mostra la distribuzione per Regione delle segnalazioni degli isolamenti di *E. faecalis/faecium* da parte dei laboratori afferenti alla rete di sorveglianza, nel totale dei tre anni.

Tabella 31. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *E. faecalis/faecium* per Regione partecipante

Regioni	n. laboratori	n. segnalazioni	
		<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
Abruzzo	1	9	14
Bolzano (PA)	1	55	31
Calabria	2	24	28
Campania	1	52	28
Emilia Romagna	6	353	179
Friuli-Venezia Giulia	1	36	14
Lazio	4	106	32
Liguria	1	15	1
Lombardia	5	158	67
Marche	1	85	50
Piemonte	7	178	171
Puglia	2	61	17
Sardegna	3	115	32
Sicilia	2	82	43
Toscana	1	10	0
Trento (PA)	2	33	14
Veneto	3	43	26
Totale	43	1415	747

* L'Umbria non ha inviato dati

L'età media dei soggetti in cui viene isolato tale microrganismo nella sorveglianza AR-ISS, è di 65 anni (range 0-98). Più del 60% delle segnalazioni di questi microrganismi, hanno riguardato soggetti di sesso maschile. Il 98% dei soggetti con infezione da *E. faecalis/faecium* al momento della segnalazione risultava ricoverato (Tabella 32). Dall'analisi dei dati per le variabili sesso, classe d'età, regime e reparto di ricovero, ripartiti per area geografica non sono emerse differenze sostanziali con i dati presentati aggregati a livello nazionale.

Tabella 32. AR-ISS 2006-2008: caratteristiche dei pazienti con infezione da *E. faecalis/faecium*

Caratteristica	2006		2007		2008		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Sesso								
F	256	36,8	263	40,6	201	41,9	720	39,5
M	439	63,2	384	59,4	279	58,1	1102	60,5
Classe di età								
0-15	23	3,4	22	3,7	21	5,2	66	4,0
16-64	225	33,0	198	33,7	122	30,3	545	32,6
≥65	433	63,6	367	62,4	259	64,5	1059	63,4
Regime di ricovero								
paziente ricoverato	693	97,7	527	98,1	314	98,4	1534	98,0
paziente ambul./esterno	16	2,3	10	1,9	5	1,6	31	2,0

Gli stessi dati, disaggregati per specie, non mostrano differenze sostanziali.

I reparti di medicina contribuiscono per più del 40% delle segnalazioni di *E. faecalis/faecium*; i reparti di terapia intensiva per il 24,8% e quelli di chirurgia per il 12,5% (Tabella 33).

Tabella 33. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni di *E. faecalis/faecium* per reparto di ricovero

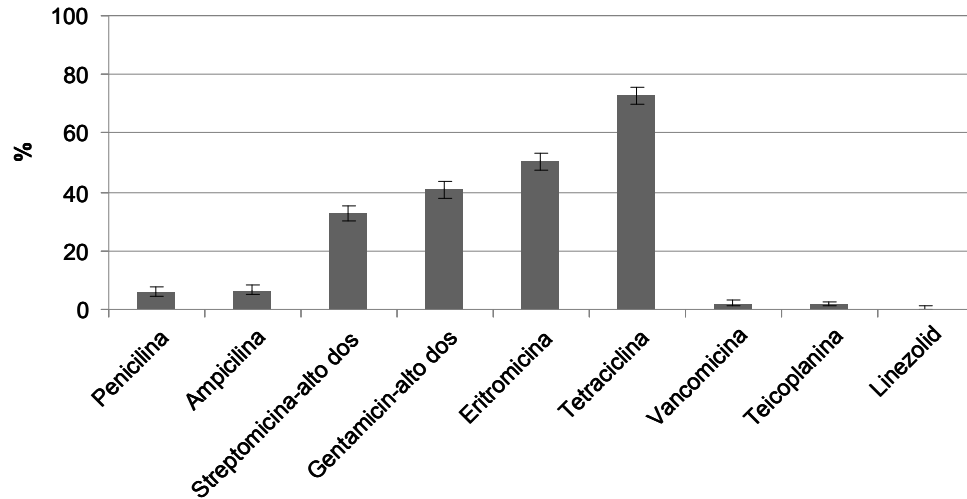
Reparto di ricovero	n.	%
Medicina	655	41,3
Terapia intensiva	394	24,8
Chirurgia	199	12,5
Malattie infettive	80	5,0
Ematologia/oncologia	50	3,2
Pronto soccorso/dea	30	1,9
Dialisi	26	1,6
Pediatria	21	1,3
Ostetricia/ginecologia	2	0,1
Altro	129	8,3
Totale	1586	

Per ciò che riguarda i ceppi di *E. faecalis* segnalati ad AR-ISS, risulta molto rilevante la resistenza alle tetracicline (di poco superiore al 70%), e alla eritromicina (intorno al 50%) (Tabella 34 e Figura 15). Risulta che il 17,1% degli *E. faecalis* è resistente ad almeno 2 antibiotici, il 16% almeno a 3, il 13,9% ad almeno 4, 6,4% ad almeno 5 tra i seguenti antibiotici (penicillina, ampicillina, streptomina, gentamicina, eritromicina, tetracicline, vancomicina, teicoplanina, linezolid).

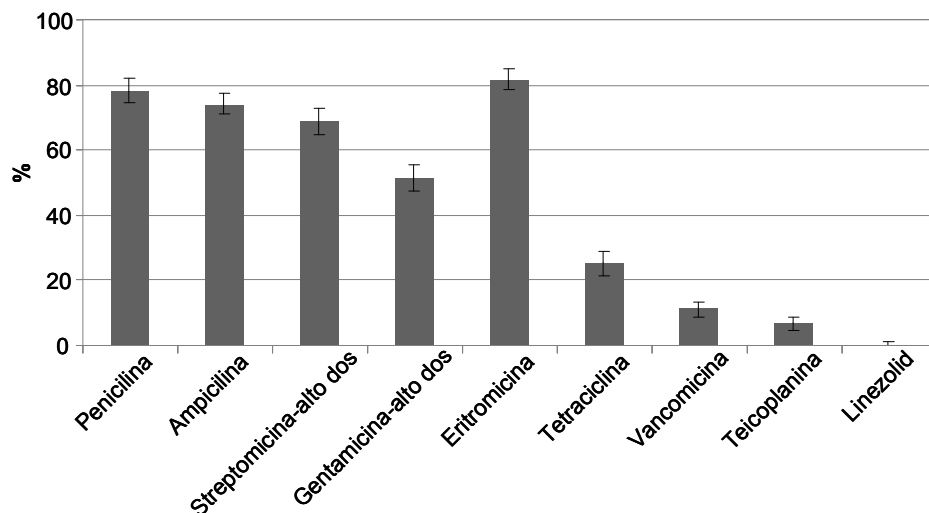
Per ciò che riguarda *E. faecium*, lo studio del profilo di antibiotico-resistenza mostra elevate percentuali di resistenza all'ampicillina, alla penicillina, e alla eritromicina (intorno all'80%); alla streptomina ad alto dosaggio (intorno al 70%) e alla gentamicina ad alto dosaggio (superiore al 50%) (Tabella 35 e Figura 16). L'80% di *E. faecium* risulta resistente ad almeno 2 antibiotici, il 67% ad almeno 3, il 50,3% ad almeno 4, 26,6% ad almeno 5 tra i seguenti antibiotici: penicillina, ampicillina, streptomina, gentamicina, eritromicina, tetracicline, vancomicina, teicoplanina, quinupristin/dalfopristin, linezolid.

Tabella 34. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza in *E. faecalis* con corrispondenti IC 95%

Antibiotico	n. ceppi testati	S n. (%)	I n. (%)	R n. (%)	IC 95% %R
Penicillina	961	902 (93,9)	1 (0,1)	58 (6,0)	4,5-7,6
Ampicillina	1328	1239 (93,3)	0 (0)	89 (6,7)	5,4-8,2
Streptomina (<i>alto dosaggio</i>)	1100	741 (67,4)	0 (0)	359 (32,6)	29,9-35,5
Gentamicina (<i>alto dosaggio</i>)	1163	686 (59,0)	0 (0)	477 (41,0)	38,1-43,8
Eritromicina	1219	302 (24,8)	302 (24,8)	615 (50,4)	47,6-53,2
Tetracicline	998	269 (27,0)	0 (0)	729 (73,0)	70,1-75,7
Vancomicina	1415	1331 (94,1)	11 (0,8)	30 (2,2)	1,5-3,2
Teicoplanina	1346	1318 (97,9)	3 (0,2)	25 (1,9)	1,3-2,8
Linezolid	761	724 (95,1)	35 (4,6)	2 (0,3)	0,1-1,1

Figura 15. AR-ISS 2006-2008: antibiotico-resistenza in ceppi *E. faecalis* con corrispondenti IC 95%Tabella 35. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza in *E. faecium* con corrispondenti IC 95%

Antibiotico	n. ceppi testati	S n. (%)	I n. (%)	R n. (%)	IC 95% %R
Penicillina	419	74 (17,7)	1 (0,2)	344 (82,1)	73,8-81,7
Ampicillina	702	182 (25,9)	0 (0)	520 (74,1)	70,7-77,3
Streptomicina (alto dosaggio)	543	170 (31,3)	1 (0,2)	372 (68,5)	64,4-72,4
Gentamicina (alto dosaggio)	586	284 (48,5)	0 (0)	302 (51,5)	47,3-55,5
Eritromicina	638	37 (5,8)	80 (12,5)	521 (81,7)	78,2-84,4
Tetraciclina	550	409 (74,4)	1 (0,2)	140 (25,4)	21,9-29,4
Vancomicina	747	632 (84,6)	9 (1,2)	82 (11,0)	8,9-13,5
Teicoplanina	697	639 (91,7)	9 (1,3)	49 (7,0)	5,3-9,2
Quinupristin/Dalfopristin	506	392 (77,5)	23 (4,5)	91 (18,0)	14,6-21,5
Linezolid	399	382 (95,7)	17 (4,3)	0 (0)	0,0-1,2

Figura 16. AR-ISS 2006-2008: antibiotico-resistenza in ceppi *E. faecium* con corrispondenti IC 95%

VRE

Sono stati segnalati 41 ceppi di *E. faecalis* e 91 ceppi di *E. faecium*, vancomicina-resistenti in questi tre anni di sorveglianza.

La frequenza di *E. faecalis* vancomicina-resistenti, non ha subito importanti oscillazioni nei tre anni (3,2%, 2,5%, 3,3%, rispettivamente per 2006, 2007 e 2008); mentre per ciò che riguarda *E. faecium*, la vancomicina-resistenza è diminuita significativamente ($p < 0,05$) nei tre anni (19,5% nel 2006; 10,8% nel 2007; 7,9% nel 2008) (Figura 17).

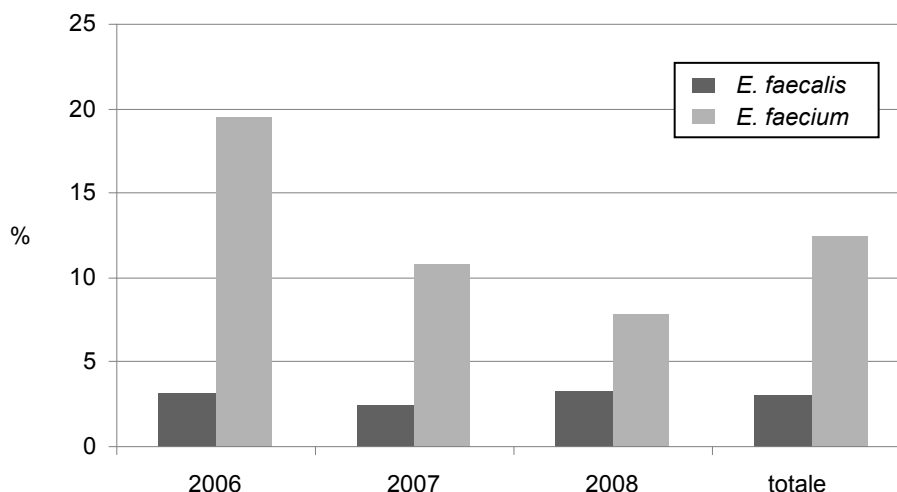


Figura 17. AR-ISS 2006-2008: percentuale di VRE in isolati di *E. faecalis* e *E. faecium*

La frequenza di VRE non risulta significativamente associata al sesso né all'età per entrambe le specie (Tabelle 36 e 37).

Tabella 36. AR-ISS 2006-2008: Numero di ceppi di *E. faecalis* resistenti a vancomicina (n.) e frequenza di resistenza (%), per caratteristiche dei pazienti

Caratteristica	n.	%
Sesso		
F	11	2,5
M	29	3,8
Classe di età		
0-15	1	2,2
16-64	13	3,5
≥65	18	2,6
Area geografica		
Nord	26	3
Centro	2	1
Sud e Isole	13	3,8

Tabella 37. AR-ISS 2006-2008: numero di ceppi di *E. faecium* resistenti a vancomicina (n.) e frequenza di resistenza (%), per caratteristiche dei pazienti

Caratteristica	n.	%
Sesso		
F	32	11,5
M	52	14,9
Classe di età		
0-15	1	5,9
16-64	29	16,8
≥65	40	11,1
Area geografica		
Nord	54	10,7
Centro	13	15,9
Sud e Isole	24	14,8

La frequenza di VRE in *E. faecium* è molto più elevata nei reparti di terapia intensiva; per *E. faecalis* la scarsa numerosità del campione non permette l'analisi per reparto di ricovero (Tabella 38).

Tabella 38. AR-ISS 2006-2008: numero di ceppi di *E. faecium* e *E. faecalis* resistenti a vancomicina (n.) e frequenza di resistenza (%), per reparto di ricovero

Reparto di ricovero	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
	n. (%)	n. (%)
Chirurgia	6 (3,9)	7 (9,0)
Dialisi	1 (5,0)	1 (14,3)
Ematologia/oncologia	0 (0)	3 (12,0)
Malattie infettive	0 (0)	1 (5,0)
Medicina	15 (3,2)	29 (11,7)
Pronto soccorso/DEA	1 (4,5)	1 (6,7)
Terapia intensiva	9 (3,3)	20 (14,5)
Altro	7 (5,2)	19 (17,4)

I VRE sono frequentemente multi-resistenti, ovvero la resistenza alla vancomicina è associata a quella di altri antibiotici: il 22,0% di VRE *faecalis* è resistente ad almeno altri 4 antibiotici, il 7,5% ad almeno 5. Il 50,2% di VRE *faecium* è resistente ad almeno 4 antibiotici, il 25,4% ad almeno 5 (considerando penicillina, ampicillina, streptomina, gentamicina, eritromicina, tetraciline, teicoplanina, quinupristin/dalfopristin, linezolid).

Batteri Gram-negativi: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae/oxytoca* e *Pseudomonas aeruginosa*

L'aumento della resistenza agli antibiotici nei batteri Gram-negativi, negli ultimi anni, è divenuto un problema clinico a livello mondiale. L'assenza di antibiotici nuovi ed efficaci contro questi patogeni, fa della sorveglianza e del controllo le più importanti misure di intervento per contrastarne la diffusione sia in ambito ospedaliero che comunitario (19). Alcuni

di questi patogeni resistenti possono non essere riconosciuti perché falsamente suscettibili ai test identificativi di routine; test supplementari e specifici sono necessari al fine di individuare i meccanismi di resistenza implicati (19). Tali meccanismi comprendono le beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL), le *AmpC* beta-lattamasi e le carbapenemasi.

Le ESBL sono codificate da geni mobili e sono responsabili dell'idrolisi di penicilline, cefalosporine di prima, seconda e terza generazione e aztreonam (ma non delle cefamicine e dei carbapenemi) e sono inibite da inibitori delle beta-lattamasi come l'acido clavulanico. Le ESBL incontrate più frequentemente appartengono alle famiglie CTX-M, SHV e TEM. Molti ceppi produttori di ESBL presentano il fenomeno della resistenza a farmaci appartenenti a classi diverse come i fluorochinoloni, e aminoglicosidi (20)

I batteri iperproduttori di beta-lattamasi *AmpC* rappresentano anch'essi un problema clinico poiché generalmente mostrano resistenza verso tutti i beta-lattamici, le cefalosporine di prima, seconda e terza generazione e non sono inibiti dagli inibitori comuni delle beta-lattamasi. Ceppi produttori di *AmpC* mostrano resistenza verso le cefamicine e sensibilità verso le cefalosporine di quarta generazione come cefepime e verso i carbapenemi. La produzione costitutiva di beta-lattamasi *AmpC* ad elevati livelli nei Gram negativi avviene o per deregolazione del gene cromosomico *AmpC* o per acquisizione di un gene trasferibile *AmpC* su un plasmide o su altri elementi mobili. I prodotti del gene trasferibile *AmpC* sono comunemente chiamati beta-lattamasi *AmpC* plasmide-mediate. Questi enzimi sono tipicamente associati alla multi-resistenza con scarse alternative terapeutiche (19). Un altro importante problema è rappresentato dagli organismi produttori di carbapenemasi, enzimi in grado di idrolizzare i carbapenemi. Un numero consistente di carbapenemasi identificato negli ultimi anni, appartiene alla classe B (metallo-beta-lattamasi, che esplicano la loro azione idrolitica in presenza di zinco), A e D (enzimi caratterizzati dalla presenza di serina nel sito attivo). In un primo momento, sono stati rilevati in *Pseudomonas* spp e *Acinetobacter* spp; di recente la loro presenza è stata segnalata anche in altre specie di Enterobacteriaceae (21). La produzione di questi enzimi causa resistenza a: penicilline, cefalosporine (cefepime e ceftriaxone), carbapenemi e aztreonam. Da un punto di vista clinico quindi, ciò può creare difficoltà nella scelta della corretta terapia (21).

La sorveglianza AR-ISS raccoglie dati di sensibilità agli antibiotici più frequentemente testati ma non scende nel dettaglio dei meccanismi di resistenza implicati. Vengono presentati pertanto soltanto i profili di antibiotico-resistenza delle specie batteriche sotto sorveglianza, per monitorarne i trend temporali. Inoltre per queste specie, non è prevista la raccolta di ceppi con determinati profili di resistenza o peculiarità, al fine di approfondire con studi di caratterizzazione mediante sierotipizzazione e/o genotipizzazione.

Sono inclusi nella sorveglianza AR-ISS *E. coli*, *K. oxytoca/pneumoniae* e dal 2006 anche *P. aeruginosa*. Data la numerosità degli isolati di *E. coli* e *P. aeruginosa*, la raccolta dei dati è prevista soltanto per i laboratori in grado di inviare file di esportazione da sistemi automatizzati.

Analisi dei dati

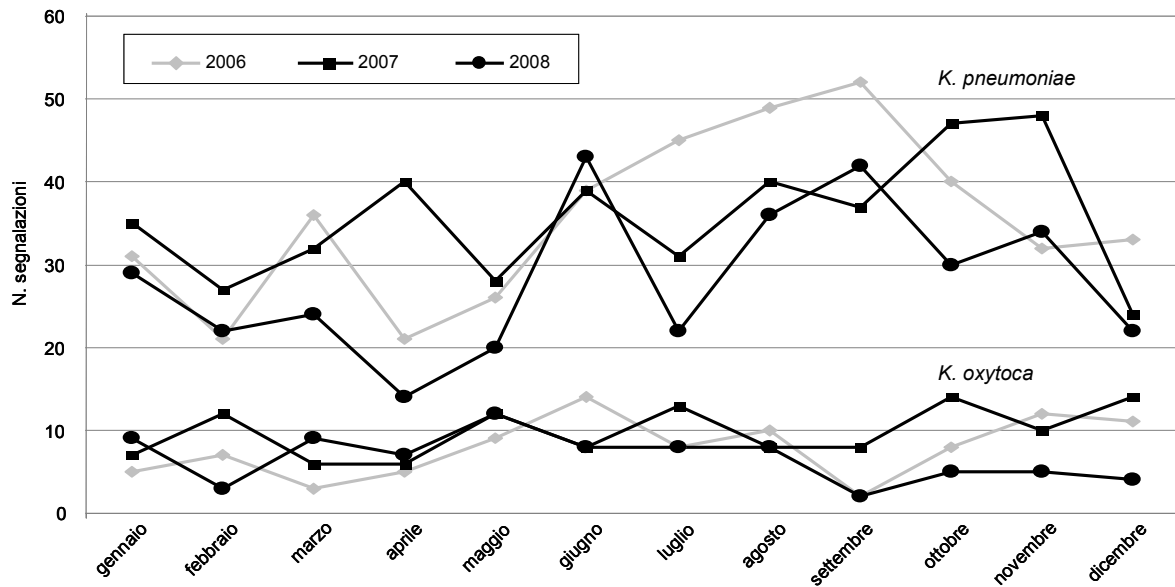
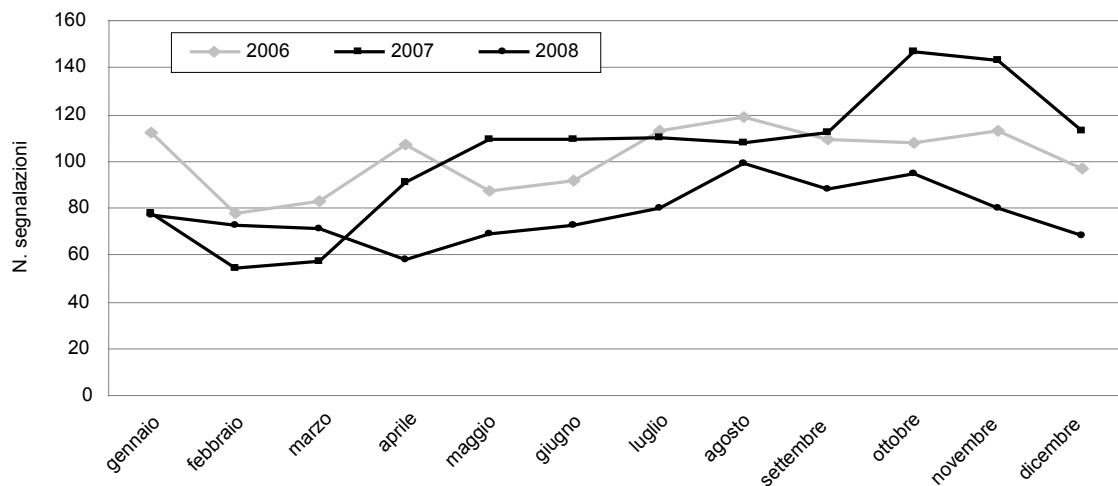
Sono stati segnalati ad AR-ISS, negli anni 2006-2008, 1.483 ceppi di *K. pneumoniae/oxytoca*, di cui 1.191 (80,3%) *K. pneumoniae*, 292 (19,7%) *K. oxytoca*; 3.380 di *E. coli* e 589 di *P. aeruginosa*.

Il numero di isolati segnalati si è mantenuto stabile negli anni, nel totale e per singola specie (Tabella 39).

La distribuzione mensile delle segnalazioni *K. pneumoniae/oxytoca*, *E. coli* e *P. aeruginosa* è mostrata nelle Figure 18, 19 e 20.

Tabella 39. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni per anno

Specie	2006 n. (%)	2007 n. (%)	2008 n. (%)	Totale n. (%)
<i>Klebsiella</i> spp.	519	546	418	1.483
<i>K. pneumoniae</i>	425 (82)	428 (78)	338 (81)	1.191 (80)
<i>K. oxytoca</i>	94 (18)	118 (22)	80 (19)	292 (20)
<i>E. coli</i>	1.218	1.231	931	3.380
<i>P. aeruginosa</i>	221	196	172	589

Figura 18. AR-ISS 2006-2008: distribuzione mensile delle segnalazioni di *K. pneumoniae/oxytoca*Figura 19. AR-ISS 2006-2008: distribuzione mensile delle segnalazioni di *E. coli*

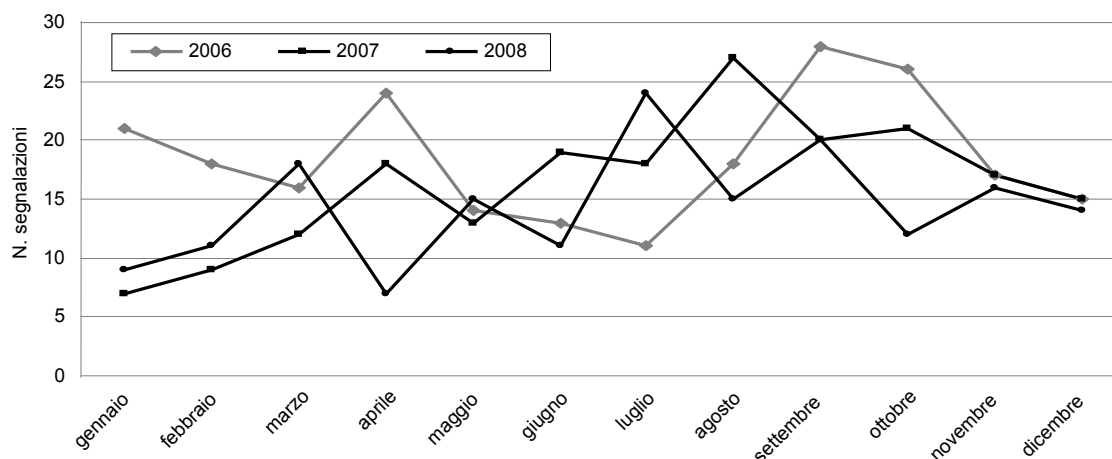


Figura 20. AR-ISS 2006-2008: distribuzione mensile delle segnalazioni di *P. aeruginosa*

Quasi la totalità delle segnalazioni di batteri Gram-negativi proviene dal Nord (77,4%), il Centro ha contribuito con il 4% e il Sud e le Isole con il 18,6% (Tabella 40). La Tabella 41 mostra la distribuzione per Regione degli isolati di batteri Gram-negativi segnalati alla rete AR-ISS e il numero di laboratori che hanno contribuito a queste segnalazioni.

Tabella 40. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni per area geografica

Area geografica	<i>Klebsiella spp.</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		Totale	
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%
Nord	982	66,2	2.777	82,2	459	77,9	4.218	77,4
Centro	172	11,6	46	1,4	0	0,0	218	4,0
Sud e Isole	329	22,2	557	16,5	130	22,1	1.016	18,6

Tabella 41. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni per Regione partecipante*

Regione	Laboratori	Segnalazioni		
		<i>Klebsiella spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Abruzzo	1	28	49	14
Bolzano (PA)	1	45	225	55
Calabria	2	31	0	0
Campania	1	16	0	0
Emilia-Romagna	6	392	1.466	163
Friuli-Venezia Giulia	1	24	0	29
Lazio	3	66	46	0
Liguria	1	14	0	0
Lombardia	6	147	558	114
Marche	1	104	0	0
Piemonte	6	209	511	46
Puglia	2	88	174	42
Sardegna	3	101	243	29
Sicilia	2	65	91	45
Toscana	1	2	0	0
Trento (PA)	2	110	0	48
Veneto	3	41	17	4
Totale	42	1.483	3.380	589

* L'Umbria non ha inviato dati.

Più del 60% dei pazienti con infezione da *K. pneumoniae/oxytoca* e *P. aeruginosa* era di sesso maschile mentre per *E. coli* la maggior parte delle segnalazioni riguardavano pazienti di sesso femminile. Per tutto il periodo considerato, la frequenza delle segnalazioni di tutti i microrganismi Gram-negativi, aumenta con l'aumentare dell'età, passando dal 6,9% nella classe 0-15 anni, al 57,7% nella classe di età ≥ 65 per le Klebsielle, dal 1,9% al 63,9% per *E. coli*, dal 2,4% al 57,2% per *P. aeruginosa*. La quasi totalità delle segnalazioni riguardava soggetti ricoverati (Tabella 42).

Tabella 42. AR-ISS 2006-2008: Caratteristiche dei pazienti con infezione da Gram-negativi

Caratteristica	<i>Klebsiella spp.</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	n.	%	n.	%	n.	%
Sesso						
F	430	39,0	1.194	51,0	125	35,0
M	677	61,0	1.145	49,0	232	65,0
Classe di età						
0-15	77	6,9	34	1,9	10	2,4
16-64	393	35,4	620	34,2	167	40,4
≥ 65	642	57,7	1.159	63,9	237	57,2
Regime di ricovero						
paziente ricoverato	940	96,9	1.978	96,8	307	98,4
paziente ambul./esterno	30	3,1	65	3,2	5	1,6

Il 42% delle segnalazioni pervenute di *K. pneumoniae/oxytoca*, il 54% di segnalazioni di *E. coli* e il 36% di segnalazioni di *P. aeruginosa*, proviene dai reparti di medicina. I reparti di terapia intensiva hanno contribuito per il 12,2%, 10,7% e 13,6% di segnalazioni, rispettivamente, per le tre specie batteriche; la chirurgia per il 16,7%, 5,5% e 25,8% rispettivamente (Tabella 43).

Tabella 43. AR-ISS 2006-2008: segnalazioni per reparto di ricovero

Reparto di ricovero	<i>Klebsiella spp.</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
	n.	%	n.	%	n.	%
Medicina	510	41,6	1421	53,9	159	36,0
Terapia intensiva	150	12,2	281	10,7	60	13,6
Chirurgia	205	16,7	146	5,5	114	25,8
Malattie infettive	60	4,9	182	6,9	22	5,0
Ematologia/oncologia	27	2,2	64	2,4	14	3,2
Pronto soccorso/dea	23	1,9	121	4,6	6	1,4
Dialisi	18	1,5	19	0,7	2	0,5
Pediatria	57	4,6	36	1,4	6	1,4
Ostetricia/ginecologia	10	0,9	29	1,1	0	0,0
Altro	166	13,5	336	12,8	59	13,3
Totale	1226		2635		442	

Per quanto riguarda *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, la resistenza più elevata in entrambe le specie risulta quella nei confronti delle cefalosporine di III generazione (rispettivamente 33,7% e 5,2%) se si eccettua la resistenza alle aminopenicilline alle quali i ceppi di *Klebsiella spp.*

sono intrinsecamente resistenti per la presenza di un gene cromosomale che codifica per una beta-lattamasi (Tabella 44).

Tabella 44. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza in *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*

Antibiotico	n. ceppi testati	% S	% I	% R	IC 95% R
<i>K. pneumoniae</i>					
Aminopenicilline	1.129	1,2	7,9	90,9	88,9-92,4
Cefalosporine III gen	963	66,3	0	33,7	30,7-36,8
Carbapenemici	906	97,8	0,9	1,3	0,6-2,1
Ciprofloxacina	1.125	73,9	1,0	25,1	22,6-27,8
Gentamicina	1.121	74,7	2,0	23,4	21,0-26,0
<i>K. oxytoca</i>					
Aminopenicilline	274	1,5	10,2	88,3	83,4-91,5
Cefalosporine III gen	210	94,8	0	5,2	2,8-9,4
Carbapenemici	231	100	0	0	0,0-2,0
Ciprofloxacina	279	96,1	0,4	3,6	1,8-6,7
Gentamicina	278	97,8	0,4	1,8	0,7-4,4

Per ciò che riguarda gli isolati di *E. coli*, si osservano valori elevati (di poco inferiori al 60%) di resistenza alle aminopenicilline; la percentuale di resistenza alla ciprofloxacina, è di poco superiore al 30% (Tabella 45).

Tabella 45. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza in *E. coli*

Antibiotico	n. ceppi testati	% S	% I	% R	IC 95% R
Aminopenicilline	3.347	39,6	1,3	59,0	57,3-60,7
Cefalosporine III gen.	2.388	87,0	0	12,9	11,6-14,3
Carbapenemici	2.530	99,9	0	0,1	0-0,3
Ciprofloxacina	3.153	67,0	0,4	32,6	31,0-34,3
Gentamicina	3.153	89,3	0,9	9,8	8,8-10,9

Per quanto riguarda infine il profilo di antibiotico-resistenza in *P. aeruginosa*, la resistenza più elevata, dopo quella alle aminopenicilline risulta quella nei confronti delle cefalosporine di III generazione (61%) (Tabella 46).

Tabella 46. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza in *P. aeruginosa*

Antibiotico	n. ceppi testati	% S	% I	% R	IC 95% R
Aminopenicilline	365	1,4	0,8	97,8	95,5-99,0
Cefalosporine III gen.	305	2,3	36,1	61,0	55,3-66,5
Carbapenemici	559	68,9	5,4	25,8	22,3-29,7
Ciprofloxacina	581	61,6	4,0	34,3	30,5-38,3
Gentamicina	576	67,0	4,0	29,0	25,4-32,9

ESBL

I dati relativi alla produzione di ESBL non sono stati raccolti per tutto il periodo considerato e inoltre sono disponibili per un modesto campione di ceppi, troppo piccolo per essere considerato rappresentativo. È stato pertanto deciso di non inserire tali dati nel rapporto.

Conclusioni

Fin dalla loro scoperta, gli antibiotici hanno completamente trasformato l'approccio alle malattie infettive. L'uso di antibiotici, insieme al miglioramento delle condizioni igieniche, dell'edilizia, e della nutrizione, a fianco di programmi di vaccinazione di massa, ha contribuito alla massiccia riduzione delle malattie infettive più comuni che una volta abbattevano intere popolazioni (22). Ad oggi l'umanità si trova di fronte ad un'altra crisi, quella legata al fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Si tratta di un problema profondo e complesso, accelerato dall'uso eccessivo e non sempre razionale, di antibiotici nei Paesi sviluppati e dal paradossale sottoutilizzo di antibiotici di qualità nei Paesi in via di sviluppo a causa delle poche risorse. Gli agenti antimicrobici, considerati in passato "farmaci miracolosi" sono le principali armi che abbiamo per il trattamento delle malattie infettive. Ma il loro ruolo e uso deve essere riconsiderato. La resistenza antibiotica è la capacità di certi microrganismi di resistere agli attacchi da parte degli antibiotici e l'aumento incontrollato di agenti patogeni resistenti, minaccia la vita e fa dissipare le già limitate risorse sanitarie. Le malattie infettive erano la prima causa di mortalità nell'uomo prima della scoperta degli antibiotici. In gran parte dei Paesi in via di sviluppo, l'accesso a farmaci di comprovata qualità è molto limitato, e le malattie infettive continuano ad essere una delle principali cause di morte, e in tutto il mondo le infezioni associate all'assistenza sanitaria sostenute da microrganismi resistenti, sono fra le prime cause di mortalità (22).

La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza segue i cambiamenti delle popolazioni microbiche, permette l'individuazione precoce di ceppi resistenti rilevanti in sanità pubblica, e supporta la notifica rapida e le indagini di epidemie. I risultati della sorveglianza sono necessari per guidare le decisioni in terapia clinica e le raccomandazioni di policy, per valutare l'impatto degli interventi di controllo e contenimento.

In Italia, la rilevazione di dati di antibiotico-resistenza in maniera continua e sistemica, è iniziata nell'aprile 1999, con la partecipazione del nostro Paese al progetto EARSS. Questa collaborazione è nata dall'esigenza di predisporre un sistema di sorveglianza nazionale strutturato e continuativo dell'antibiotico-resistenza, che permettesse la disponibilità di dati a livello nazionale e il confronto con altri Paesi europei. Nel 2001 il sistema ha avuto un'evoluzione nel progetto AR-ISS, una rete di sorveglianza nazionale per la raccolta dei dati di sensibilità agli antibiotici, coordinata dall'Istituto Superiore di Sanità.

I dati di antibiotico-resistenza prodotti dalla sorveglianza AR-ISS, per alcuni limiti riguardanti la loro rappresentatività (sono raccolti solo dati su ceppi isolati da emocolture o liquor; la distribuzione sul territorio dei laboratori partecipanti non è omogenea e il campione degli ospedali cui i laboratori fanno capo, non è rappresentativo della realtà nazionale in quanto vi è una prevalenza dei laboratori del Nord; poiché si hanno informazioni solo sul numero di posti letto degli ospedali, ma non si tiene conto della grandezza e del numero dei reparti "a rischio" di infezioni ospedaliere, eventuali differenze di distribuzione delle segnalazioni dei ceppi batterici considerati, potrebbero dipendere dal tipo e dalla specializzazione dell'ospedale; è molto difficile stabilire il bacino di utenza dei laboratori e degli ospedali, pertanto non è possibile calcolare l'incidenza delle infezioni causate dai patogeni considerati; la presenza di un

focolaio epidemico potrebbe falsare la proporzione dei batteri antibiotico-resistenti senza che ci sia un reale aumento globale dell'antibiotico-resistenza), possono essere utilizzati esclusivamente per una descrizione basata sulla numerosità assoluta e non per analisi di incidenza né di inferenza epidemiologica. Sono tuttavia utili per monitorare trend temporali e offrono un riferimento per studi ad hoc su microrganismi o su problematiche specifiche a livello nazionale e grazie alla collaborazione con EARSS, permettono un confronto dei dati italiani con quelli di altri Paesi europei.

Nessuna specie batterica è mai stata segnata da un'antibiotico-resistenza quanto lo *S. aureus* dalla meticillino-resistenza e, da più di un quarto di secolo, MRSA è il patogeno nosocomiale per eccellenza. Dalla sorveglianza AR-ISS risulta che in Italia oltre l'85% dei ceppi di *S. aureus* sono resistenti alla penicillina, e che anche la percentuale di MRSA è tuttora elevata, nonostante si stia assistendo ad un significativo decremento: da frequenze superiori al 40% registrate negli anni 2000-2002, al 36,5% del 2006 al 31,3 % del 2008. In Europa nel 2008 viene rilevata una bassissima frequenza, inferiore all'1%, di MRSA nel nord ma superiore al 50% nei Paesi dell'Europa meridionale; fortunatamente per la prima volta in molti Paesi si registra un trend in diminuzione negli ultimi anni. La frequenza aumenta notevolmente se vengono considerati MRSA isolati dai reparti di terapia intensiva: in Italia la sorveglianza AR-ISS registra il 51,7%. Gli MRSA sono di frequente resistenti ad altri antibiotici: dai dati AR-ISS risulta che più del 20% è resistente ad almeno 4 classi di antibiotici oltre alla meticillina. Ceppi con resistenza intermedia ai glicopeptidi cominciano ad emergere anche nel nostro Paese (nei tre anni considerati, sono stati segnalati ad AR-ISS ceppi di *S. aureus* con ridotta sensibilità e resistenti alla vancomicina) e, ciò potrebbe in un prossimo futuro ridimensionare le opzioni terapeutiche.

Per quanto riguarda *S. pneumoniae* la prevalenza di ceppi non sensibili alla penicillina si mantiene stabile intorno al 10% fin dal 2003: nel 2008 si è registrata una prevalenza del 9,5% e non si evidenziano variazioni significative rispetto al 2006 e 2007 e al periodo analizzato nel precedente rapporto. In linea con i risultati ottenuti negli anni precedenti, anche i dati sulla resistenza alla eritromicina, che si mantiene stabile intorno al 30% da ormai 6 anni.

Uno degli aspetti più drammatici riscontrati, riguarda la comparsa di resistenza o ridotta sensibilità ai glicopeptidi tra i ceppi d'isolamento nosocomiale di Enterococcus (*Vancomycin-Resistant Enterococci*, VRE) e di Staphylococcus (*Vancomycin-Resistant S. aureus*, VISA). Per i primi, in particolare quando è coinvolta la specie *E. faecium*, si registrano frequenze intorno al 10%, anche se AR-ISS registra un significativo decremento negli ultimi tre anni. Per quanto riguarda i secondi, ancora non si registrano numeri degni di nota, ma sicuramente la situazione merita di essere monitorata con estrema attenzione.

Tra i Gram-negativi vengono segnalati sempre più frequentemente sia ceppi multiresistenti nell'ambito delle varie specie, sia singole specie intrinsecamente resistenti a vari antibiotici ad ampio spettro. Teatro dell'emergenza di questi microrganismi multiresistenti non sono solamente le corsie ospedaliere, ma soprattutto le unità di Terapia Intensiva.

I risultati dei test di sensibilità raccolti dalla sorveglianza AR-ISS e qui presentati, sono quelli riportati dai laboratori, applicando metodi diversi (manuali od automatici). Le caratteristiche fenotipiche non vengono riconfermate dal laboratorio del centro di riferimento (presso il Dipartimento MIPI dell'ISS). Per ovviare a questa mancanza e allo scopo di approfondire studi di caratterizzazione di ceppi antibiotico-resistenti mediante sierotipizzazione e/o genotipizzazione, dal 2006, grazie a un progetto del Ministero della Salute/CCM (Centro Nazionale per il Controllo delle Malattie) è stato possibile implementare la raccolta dei ceppi con profili di antibiotico-resistenza selezionati. Di seguito vengono presentati i risultati di tali studi.

RISULTATI DELLA SORVEGLIANZA MICROBIOLOGICA: CARATTERIZZAZIONI FENOTIPICHE E GENOTIPICHE

Staphylococcus aureus

Dalla sua comparsa, negli anni '60, a tutt'oggi, lo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) rappresenta la maggiore causa di morbilità e mortalità in ambito nosocomiale in tutto il mondo (23;24) causando il 50% o più di infezioni acquisite in ospedale (HA-MRSA) in molti Paesi (25). Negli ultimi cinque anni la percentuale di MRSA in Italia si è ridotta, passando dal 40% nel 2004 al 34% nel 2008 (26). Negli ultimi anni, l'aumentato utilizzo della vancomicina nel trattamento delle infezioni sostenute dagli MRSA ha portato alla comparsa di ceppi con diminuita sensibilità ai glicopeptidi e in particolare alla vancomicina. Diverse segnalazioni di ceppi che mostrano resistenza intermedia o completa alla vancomicina sono state descritte in varie parti del mondo (27). Utilizzando i *breakpoint* suggeriti dal CLSI, i ceppi di *S. aureus* che mostrano valori di MIC >2 e <16 µg/mL sono definiti *vancomycin intermediate S. aureus* (VISA); quelli con MIC ≥16 µg/mL *vancomycin resistant S. aureus* (VRSA) (28). Recentemente (dicembre 2009) il Comitato europeo per i saggi di sensibilità antimicrobica (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* EUCAST) ha pubblicato i nuovi *breakpoint* per la vancomicina secondo i quali tutti gli *S. aureus* con MIC alla vancomicina >2 µg/mL devono essere considerati resistenti. Inoltre, ci sono ceppi che mostrano una resistenza eterogenea alla vancomicina e per questo definiti h-VISA (*heterogeneous VISA*). Questi ultimi hanno valori di MIC alla vancomicina nel range della sensibilità ma contengono sottopopolazioni che mostrano valori corrispondenti alla categoria intermedia. Oltre ai VISA e VRSA ci sono ceppi che sono inibiti da alte concentrazioni di vancomicina vicine al *breakpoint* ma ancora nel range della sensibilità (29). In Italia il problema della diminuita sensibilità alla vancomicina è ancora sottostimato e necessita di ulteriori studi.

Il protocollo della sorveglianza AR-ISS prevedeva la raccolta da parte dei laboratori di ceppi di MRSA, isolati da infezioni invasive (sangue e liquor), con valori di MIC alla vancomicina ≥ 4 µg/mL (*breakpoint* CLSI). Nel periodo considerato (2006-2008) non sono stati isolati e inviati all'ISS ceppi con le caratteristiche richieste. Nello stesso periodo è stato condotto uno studio, denominato Progetto *Staph*, coordinato dall'EARSS, la rete europea dell'antibiotico-resistenza e dal *Seq.Net.org*, un network europeo d'eccellenza per la tipizzazione molecolare dei principali batteri patogeni. A questo studio sono stati invitati a partecipare i laboratori ospedalieri italiani che facevano parte della rete AR-ISS e che isolavano numerosi ceppi di *S. aureus* da infezioni invasive. Il progetto aveva lo scopo di studiare l'epidemiologia molecolare di *S. aureus* a livello europeo, mediante la caratterizzazione molecolare di ceppi isolati da infezioni invasive in pazienti ricoverati in ospedale.

Il progetto *Staph* si prefiggeva i seguenti obiettivi:

1. identificare i cloni predominanti di *S. aureus* responsabili di infezioni invasive in Europa;
2. raccogliere dati e creare una collezione di ceppi contenente tutti i principali cloni di *S. aureus* circolanti in Europa;
3. contribuire ad una migliore comprensione dell'epidemiologia di *S. aureus* in termini di diffusione clonale.

Il progetto *Staph* prevedeva la caratterizzazione molecolare dei ceppi utilizzando la metodica nota come *spa typing*, che identifica, attraverso sequenziamento genico di una regione, il gene della proteina A (*spa*) di *S. aureus*.

La Figura 21 mostra il segmento X che rappresenta il terminale COOH includendo le regioni SSRs (X_r) e la sequenza di ancoraggio alla parete cellulare (X_c): gli oligonucleotidi 1095F e 1517R sono indicati dalle frecce nere; i segmenti da S a C rappresentano le regioni geniche codificanti la sequenza segnale (S) il legame per le Immunoglobuline G (A-D) e una regione omologa ad A-D (E) (30).

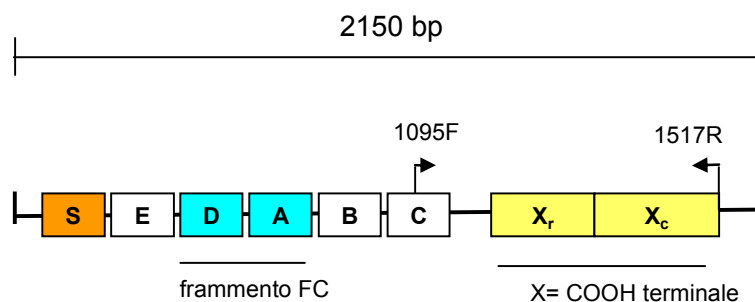


Figura 21. Struttura del gene della proteina A di *Staphylococcus aureus*

Questa regione consiste di sequenze ripetute (*repeat*) che hanno una lunghezza di 24 paia di basi (*base pair*, bp); la presenza di mutazioni puntiformi, delezioni e duplicazioni all'interno di queste sequenze causano diversità del gene *spa* all'interno della specie. Lo *spa typing* ha un potere discriminante che si pone tra quello della *Pulsed Gel Field Electrophoresis* (PFGE) e quello della *Multilocus sequence typing* (MLST) e può essere utilizzato per studi di epidemiologia ospedaliera degli MRSA. Lo *spa typing* è utilizzato su scala internazionale per le sue caratteristiche di semplicità, accuratezza e riproducibilità del risultato.

L'analisi del prodotto del sequenziamento del gene *spa* si effettua velocemente attraverso un software (RIDOM STAPH TYPE) consultabile online al sito web <http://www.ridom.de>. Il Seq.Net.org (www.seqnet.org) coordina il database dello *spa typing* assicurando il libero accesso in ogni momento da qualsiasi parte del mondo. Il database, a tutt'oggi, contiene più di 6.368 tipi *spa* risultanti dalla combinazione di circa 371 diversi repeats provenienti da oltre 60.000 isolati di *S. aureus* tipizzati in 68 Paesi distribuiti in tutto il mondo.

Metodi

Al progetto *Staph* hanno partecipato 26 Paesi distribuiti in tutta Europa per un totale di 346 laboratori ospedalieri reclutati.

Ogni Paese ha reclutato circa 20 laboratori; ogni laboratorio ha raccolto e inviato al laboratorio di riferimento (per l'Italia l'ISS) i primi 5 MSSA e 5 MRSA consecutivi, isolati da infezioni invasive nell'arco di tempo compreso tra il 1 settembre 2006 e il 28 febbraio 2007.

In Italia sono stati arruolati 19 laboratori ospedalieri; di questi 12 erano localizzati al Nord, 6 al Centro e 1 al Sud. I ceppi raccolti e inviati sono riportati in Tabella 47.

Tabella 47. Numero di ceppi inviati dai 19 laboratori AR-ISS partecipanti al progetto Staph

Codice laboratorio	n. MSSA	n. MRSA	Totale
IT005	4	5	9
IT008	5	5	10
IT009	4	4	8
IT014	3	5	8
IT016	5	1	6
IT019	5	5	10
IT024	4	2	6
IT025	4	5	9
IT031	5	5	10
IT042	3	4	7
IT045	3	0	3
IT059	5	5	10
IT060	5	3	8
IT061	5	4	9
IT062	5	4	9
IT069	4	4	8
IT070	5	2	7
IT072	2	1	3
IT075	6	2	8
Totale	82	66	148

Caratteristiche degli isolati

Di 148 ceppi, 143 sono stati isolati dal sangue (80 MSSA e 63 MRSA), 4 da liquor (2 MSSA e 2 MRSA) ed 1 (MRSA) da liquido pleurico (Tabella 48).

Tabella 48. Origine dei campioni inviati in ISS

Materiale	MSSA	MRSA	Totale
Sangue	80	63	143
Liquor	2	2	4
Liquido pleurico	-	1	1
Totale	82	66	148

Utilizzando criteri esclusivamente epidemiologici, 71 ceppi sono stati definiti come provenienti da infezioni acquisite in ospedale (*Hospital Acquired*, HA) (HA-MRSA) e 54 da infezioni acquisite in comunità (*Community Acquired*, CA) (CA-MRSA). Per 22 ceppi (12 MRSA e 10 MSSA) non è stato possibile risalire al dato epidemiologico (Tabella 49).

Tabella 49. Ceppi HA-MRSA e CA-MRSA raccolti

Ceppo	MSSA	MRSA	Totale
HA-MRSA	32	39	71
CA-MRSA	38	16	54
totale	70	55	125

Metodi per la caratterizzazione fenotipica presso i laboratori ospedalieri partecipanti

La caratterizzazione fenotipica dei ceppi è stata effettuata mediante metodiche convenzionali (identificazione morfologica delle colonie, colorazione di Gram, test della coagulasi e identificazione biochimica mediante sistemi automatizzati). I saggi di sensibilità *in vitro* agli antibiotici sono stati effettuati dalla maggior parte dei laboratori attraverso l'utilizzo di sistemi automatizzati Vitek2 (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France), Phoenix (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, MD) or MicroScan (Dade Behring Inc., West Sacramento, CA). Pochi laboratori hanno utilizzato il Disk Diffusion test (DD).

Analisi fenotipiche e genotipiche di approfondimento presso il laboratorio di riferimento (ISS)

In Italia, poiché il problema della diminuita sensibilità alla vancomicina e dei ceppi VISA/VRSA è ancora largamente sconosciuto (31, 32) si è deciso di analizzare i ceppi del progetto *Staph* studiando la sensibilità *in vitro* ai glicopeptidi, utilizzando metodiche standard e approfondendo l'analisi mediante saggi specifici. La sensibilità *in vitro* ai glicopeptidi è stata confermata mediante Etest utilizzando un inoculum di torbidità pari a 0,5 Mc Farland, piastre di Mueller-Hinton agar addizionate di cationi e lettura dei risultati dopo incubazione *overnight*. I criteri interpretativi sono stati quelli suggeriti dal CLSI (28). Inoltre, i ceppi sono stati sottoposti ad uno screening finalizzato all'individuazione dei ceppi con resistenza eterogenea alla vancomicina (h-VISA). Il test di screening è stato eseguito mediante Macro Etest (MET) utilizzando un inoculum di torbidità pari a 2 Mc Farland, distribuito su piastre di Brain Heart Infusion (BHI) agar, e, successiva lettura dei risultati dopo incubazione di 48 ore a 37°C. Tutti i ceppi positivi al test di screening sono stati sottoposti all'analisi dei profili di popolazione (PAP) utilizzando il protocollo di Hiramatsu *et al.* (33). Questa metodica prevede il piastramento di diluizioni seriali di una coltura batterica cresciuta in BHI su piastre contenenti concentrazioni crescenti di vancomicina (range 0,5-32 µg/mL). Dopo 48 ore di incubazione a 37°C si contano le colonie che crescono sulle piastre alle diverse concentrazioni di vancomicina. Il numero di cellule batteriche contenute in 1 mL della brodocoltura cresciute a differenti concentrazioni di vancomicina è utilizzato per disegnare un grafico con il profilo della popolazione.

La caratterizzazione molecolare dei ceppi prevedeva:

- l'identificazione della specie (*S. aureus*) e lo status di meticillino-resistenza confermati mediante saggio di PCR per la ricerca dei geni *nuc* (nucleasi) e *mec* (meticillina) rispettivamente (34);
- la ricerca dei geni codificanti per la tossina di Panton-Valentine (PVL), *lukS-PV-lukF-PV*, responsabile della lisi dei polimorfonucleati e della necrosi dei tessuti, mediante PCR (34);
- il sequenziamento della regione polimorfica della proteina A di *S. aureus* (*spa*) mediante la metodica dello *spa typing* (35);
- la determinazione della cassetta cromosomale dell'elemento *mec* (SCC*mec*), contenente il gene di resistenza alla meticillina, e il locus *agr*, che controlla numerose vie metaboliche critiche per la virulenza di *S. aureus*, mediante PCR multipla (36-39);
- l'individuazione del *Sequence Type* (ST), che definisce l'appartenenza del microorganismo ad un clone specifico, mediante *Multilocus Sequence Typing* (MLST) per alcuni ceppi rappresentativi (40).

Risultati

Di 148 ceppi di *S. aureus*, confermati sia dal punto di vista fenotipo che genotipico, 82 erano sensibili alla meticillina (MSSA) e 66 resistenti (MRSA).

Le percentuali di resistenza agli antibiotici sono riportati in Tabella 50.

Tabella 50. Percentuali di resistenza dei ceppi di *S. aureus* alle diverse classi di antibiotici

Antibiotico	MSSA	MRSA
Rifampicina	2	18
Ciprofloxacina	4	95
Eritromicina	6	77
Clindamicina	4	70
Gentamicina	1	71
Tetraciclina	5	3
Trimetoprim/sulfametossazolo	0	1
Vancomicina	0	0
Teicoplanina	0	0
Linezolid	0	0

I risultati del saggio di sensibilità ai glicopeptidi, ottenuto mediante Etest, nei ceppi MSSA e MRSA sono riportati in Tabella 51.

Tabella 51. Sensibilità *in vitro* ai glicopeptidi in MSSA e MRSA mediante Etest

Ceppi (n.)	Vancomicina				Teicoplanina			
	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (µg/mL)	MIC range (µg/mL)	R %	I %	MIC ₅₀ /MIC ₉₀ (µg/mL)	MIC range (µg/mL)	R %	I %
MSSA (82)	1,5/1,5	0,5-2	0	0	1/1,5	0,25-2	0	0
MRSA (66)	1,5/2	0,75-3	0	3*	1,5/3	0,38-4	0	0

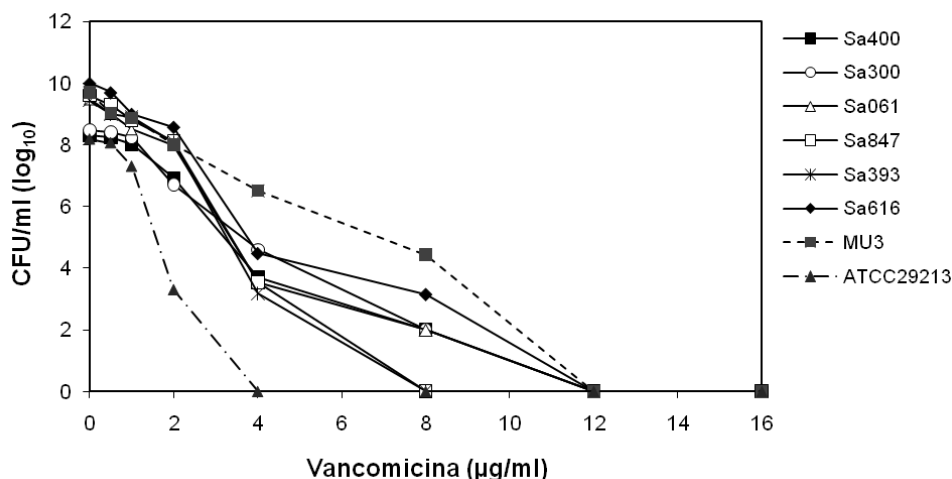
* due ceppi con MIC=3 µg/mL

Le MIC alla vancomicina per MSSA e MRSA erano vicine al valore del *breakpoint*. Nessun ceppo MSSA mostrava resistenza intermedia alla vancomicina (VISA) mentre tra gli MRSA 2 ceppi sono risultati VISA con valori di MIC = 3 µg/mL. Riguardo alla teicoplanina, tutti i ceppi, sia MSSA che MRSA, erano sensibili e mostravano valori di MIC al di sotto del *breakpoint*.

Il test di screening per l'identificazione dei ceppi h-VISA non ha evidenziato alcun ceppo h-VISA tra gli MSSA; tra gli MRSA 12 ceppi sono risultati h-VISA. Questi 12 ceppi sono stati sottoposti a PAP e 9 sono stati confermati h-VISA. I ceppi confermati h-VISA contenevano sottopopolazioni che crescevano in presenza di 4 µg/mL di vancomicina ad una frequenza di 10⁵-10⁶ (Tabella 52). La Figura 22 mostra che i ceppi Sa400, Sa300, Sa061 e Sa616 sono stati confermati h-VISA; i ceppi Sa847 e Sa393 non hanno mostrato sottopopolazioni con resistenza eterogenea alla vancomicina. I ceppi Mu3 (h-VISA) e ATCC29213 sono stati utilizzati come controllo. Gli altri tre ceppi testati mostravano una frequenza di sottopopolazioni eteroresistenti al di sotto del valore per la positività mediante PAP e pertanto non sono stati considerati h-VISA.

Tabella 52. Caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei ceppi risultati h-VISA mediante test di screening (Macro Etest) e sottoposti ad analisi di popolazione (PAP)

Ceppo	Tipo <i>spa</i>	ST	CC	<i>agr</i>	Vancomicina MIC ($\mu\text{g/mL}$)	Frequenza di sottopopolazioni [4 $\mu\text{g/mL}$ di vancomicina]	Fenotipo mediante PAP
Sa591	t001	228	5	2	2	$1,7 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa300	t041	-	-	2	1.5	$1,3 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa400	t041	228	5	2	1.5	$2,5 \times 10^{-5}$	h-VISA
Sa691	t041	-	-	2	1.5	$2,0 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa607	t041	-	-	2	2	$3,7 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa007	t041	-	-	2	1.5	$5,0 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa616	t041	-	-	2	1.5	$3,0 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa609	t041	-	-	2	2	$1,0 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa061	t041	-	-	2	1.5	$1,1 \times 10^{-6}$	h-VISA
Sa847	t041	-	-	2	2	$8,7 \times 10^{-7}$	-
Sa300	t041	-	-	2	2	$6,2 \times 10^{-7}$	-
Sa393	t041	-	-	2	2	$5,5 \times 10^{-7}$	-
Mu3 ^a	t002	5	5	2	2	$6,8 \times 10^{-4}$	h-VISA

**Figura 22. Analisi di Popolazione dei ceppi MRSA che erano positivi al Macro Etest (MET)**

Di tutti gli isolati, soltanto 1 MSSA caratterizzato dal tipo *spa* 1445 isolato da un'infezione purulenta del tratto respiratorio ed 1 MRSA assegnato al tipo *spa* 008 isolato da liquor sono risultati PVL positivi.

La caratterizzazione genotipica dell'elemento *mec* (*SCCmec*) ha fornito i seguenti risultati: di 66 ceppi MRSA, 36 contenevano l'elemento *mec* di tipo I ed 1 ceppo il tipo IA; 10 e 14 isolati contenevano l'elemento *mec* di tipo IV e IVA, rispettivamente; 3 ceppi contenevano l'elemento di tipo II; 1 ceppo è risultato variante del tipo III ed per 1 ceppo non è stato possibile definire l'elemento *mec* di appartenenza.

Mediante tipizzazione *spa*, tra gli MSSA sono stati individuati 54 tipi *spa*, di cui 9 nuovi; i più frequenti tipi *spa* fra gli MSSA erano: t012 (6 ceppi), t084 (8 ceppi) and t094 (8 ceppi). Tra gli MRSA sono stati identificati 14 tipi *spa*, di cui 2 nuovi. Tra gli MRSA, 3 erano i tipi *spa* principali: t041(24 ceppi), t008 (19 ceppi) and t001 (9 ceppi) (Tabella 53).

Tabella 53. Principali tipi *spa* tra gli MSSA e gli MRSA

Tipo <i>spa</i>	MSSA	MRSA	Totale
t001	0	9	9
t008	0	19	19
t012	6	0	6
t015	4	0	4
t024	1	1	2
t030	0	1	1
t032	1	1	2
t041	0	23	23
t068	0	1	1
t084	8	0	8
t091	8	0	8
t744	0	1	1
t242	0	3	3
t303	0	1	1
t515	0	3	3
t1882	0	1	1
t2250	0	1	1
t2776	0	1	1
altri	54	0	54
Totale	82	66	148

Ventidue isolati assegnati al tipo *spa* 041 contenevano l'elemento *mec* di tipo I ed erano caratterizzati dal locus *agr* di gruppo II. Per un ceppo non è stato possibile individuare l'elemento *mec* così come per un altro ceppo il gruppo *agr*. All'interno del gruppo t041 erano presenti 8 di 9 ceppi h-VISA e 1 ceppo VISA (Tabella 54). Un ceppo VISA e uno h-VISA sono stati sottomessi a MLST e sono risultati appartenere al ST 228 e 273, rispettivamente, entrambi appartenenti al clonal complex (CC)5. Tutti i ceppi assegnati al tipo *spa* 001 contenevano SCC*mec* tipo I ed erano caratterizzati dall'*agr* tipo II. All'interno del t001 nessun ceppo VISA è stato identificato ma un ceppo h-VISA, assegnato al ST 228, è stato identificato e confermato mediante PAP. Tutti gli isolati assegnati al tipo *spa* 008 contenevano SCC*mec* tipo IV o IVA; tutti i ceppi, tranne 1 a cui non è stato possibile attribuire il gruppo appartenevano all'*agr* gruppo I. Nessun ceppo VISA o h-VISA è stato identificato all'interno del t008. Tre ceppi sono stati sottomessi a MLST e assegnati al ST8 appartenente al CC8. Il secondo ceppo VISA è stato assegnato al tipo *spa* 2250 ed era caratterizzato da SCC*mec* tipo I, *agr* I e ST247(CC8).

Tabella 54. Caratteristiche fenotipiche e genotipiche dei principali tipi *spa* tra gli MRSA

Tipo <i>spa</i> (n. ceppi)	SCC <i>mec</i>	<i>agr</i>	VISA (%)	h-VISA (%)	MLST	CC
041 (24)	I	2	1 (4)	11 (46)	ST228, T273	5
008 (18)	IV (6), IVA (13)	1	0 (0)	0 (0)	ST8	8
001 (9)	I	2	0 (0)	1 (11)	ST228	5

Conclusioni

Lo studio *Staph*, condotto con la collaborazione di 19 laboratori ospedalieri italiani, ha contribuito alla comprensione dell'epidemiologia di *S. aureus* in Europa e in Italia. I dati di genotipizzazione dello studio *Staph* insieme a quelli provenienti da tutti gli altri Paesi partecipanti al progetto europeo sono stati recentemente pubblicati (41). Gli autori, grazie al contributo di 357 laboratori che servono 450 ospedali dislocati in 26 Paesi europei, hanno

descritto la distribuzione geografica dei principali cloni di *S. aureus*, responsabili di infezioni invasive in ambito ospedaliero, in tutta Europa. Grazie alla tipizzazione molecolare mediante *spa* typing è stato possibile creare una mappa di tipi *spa* che ha permesso di comprendere quali e quanti cloni di *S. aureus* segnalati in ospedale circolassero in Europa.

In Italia, dal punto di vista fenotipico, abbiamo approfondito la sensibilità *in vitro* ai glicopeptidi e in particolare alla vancomicina. Abbiamo osservato che la maggioranza dei ceppi di *S. aureus* isolati da infezioni invasive ha valori di MIC per la vancomicina vicino al *breakpoint*. I sistemi automatizzati, utilizzati da parte dei laboratori partecipanti, non hanno individuato ceppi VISA; soltanto mediante Etest, utilizzato sia per le MIC che per lo screening dei ceppi con resistenza eterogenea alla vancomicina, è stato possibile identificare ceppi VISA ed h-VISA e soltanto tra gli MRSA.

Attraverso la tecnica di tipizzazione molecolare dello *spa* typing è stata dimostrata un'ampia variabilità di tipi *spa* tra gli MSSA; di contro, i ceppi MRSA appartengono ad un numero limitato di tipi *spa*. I tipi *spa* più frequenti fra gli MRSA nel nostro Paese sono: t041, t008 e t001 che comprendono circa l'80% degli isolati. Al t041, caratterizzato dall'elemento *mec* di tipo I e dal locus *agr* di gruppo II, sono stati assegnati uno dei due ceppi VISA e 8 ceppi h-VISA. Nessun isolato assegnato al t008 mostrava resistenza intermedia o eterogenea alla vancomicina. All'interno di questo gruppo, un solo ceppo è risultato positivo per la presenza dei geni della tossina di *Panton-Valentine* ed è stato definito CA-MRSA (42). Gli altri isolati caratterizzati dal t008 differiscono dal bel noto prototipo CA-MRSA USA300 per la mancanza dei geni che codificano per la tossina PVL e per essere multi-antibiotico resistenti. Il t008 somiglia al clone Lione, un clone recentemente descritto in Francia che è ben adattato all'ambiente ospedaliero.

Il t001 è il terzo tipo *spa* più frequente tra gli MRSA; confrontando la successione delle sequenze ripetute, il t001 è molto simile al t041. Infatti, come il t041, il t001 contiene l'elemento *mec* di tipo I, il gruppo II del locus *agr* e appartiene al clone ST228 e al CC5.

In conclusione, lo studio di tipizzazione ha permesso di identificare un tipo *spa* predominante di *S. aureus* (t041) che è ampiamente diffuso negli ospedali italiani ed è associato ad una ridotta sensibilità alla vancomicina, dimostrata dalla presenza di ceppi VISA ed h-VISA. L'utilizzo dello *spa* typing, così come delle altre tecniche di tipizzazione molecolare è molto utile per identificare ceppi di *S. aureus* di particolare rilevanza clinica e limitarne la loro diffusione in ospedale dove il paziente già debilitato potrebbe essere esposto ad un rischio più elevato.

Streptococcus pneumoniae

La penicillina è stata considerata, fin dalla sua scoperta, l'antibiotico di scelta nella terapia delle infezioni da *S. pneumoniae*, di cui ha cambiato drammaticamente la storia naturale. Negli ultimi anni però, si è assistito ad un aumento della resistenza dello *S. pneumoniae* verso la penicillina, e in certa misura anche verso le cefalosporine di III generazione, più moderni sostituti della penicillina, rendendo più problematica la scelta della terapia empirica delle meningiti e delle altre infezioni invasive a probabile eziologia pneumococcica. D'altra parte, con l'allargarsi del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, lo *S. pneumoniae* ha acquisito resistenza anche ad altre classi di antibiotici, soprattutto ai macrolidi, molto utilizzati nella terapia delle infezioni del tratto respiratorio. In Italia, la resistenza alla penicillina dello *S. pneumoniae* si è mantenuta sempre su valori moderati oscillando tra il 10% e il 15%. Al contrario, la resistenza ai macrolidi ha raggiunto valori intorno al 30%, tra i più alti in Europa.

Dal 1970 è disponibile un vaccino diretto a soggetti adulti e anziani, contenente i polisaccaridi di 23 diversi sierotipi (23PS), la cui efficacia protettiva è ancora oggetto di discussioni e appare limitata alle infezioni invasive. A causa della scarsa immunogenicità dei

polisaccaridi nei bambini di età inferiore a 5 anni, anche per lo pneumococco è stato sviluppato un vaccino glico-coniugato (PCV-7), in cui i polisaccaridi sono legati ad una proteina carrier che ne modifica le proprietà immunologiche.

Benché il vaccino PCV-7 sia stato introdotto in Italia nel 2001, il suo uso è stato implementato solo negli ultimi anni con modalità diverse nelle diverse regioni d'Italia. In molte regioni, la vaccinazione è stata offerta a tutti i nuovi nati. Secondo lo studio ICONA 2008, la copertura vaccinale nel 2008 nei bambini sotto i 2 anni variava grandemente da Regione a Regione, da un minimo del 10% a valori superiori all'85% (43). L'impatto del PCV-7 in Italia è difficile da stimare in termini di variazioni di incidenza, mentre sono stati già documentate variazioni nei sierotipi circolanti più comuni (44). A differenza del Nord America, in Italia la resistenza agli antibiotici non è diminuita in modo significativo in seguito all'uso del vaccino PCV-7, in quanto la resistenza alla penicillina e alla eritromicina è presente sia nei ceppi di sierotipo vaccinale che non vaccinale che circolano nel nostro Paese (45).

Nell'ambito della sorveglianza AR-ISS, nel triennio 2006-2008, 24 laboratori hanno inviato da 1 a 69 ceppi di *S. pneumoniae* per un totale di 330 ceppi (Tabella 4). Tra tutti i ceppi di *S. pneumoniae* pervenuti, 234 (70,9%) sono stati isolati da sangue, 78 (23,6%) da liquor, 4 (1,2%) da altro sito; per 14 (4,2%) non è stato segnalato il materiale di isolamento.

Resistenza agli antibiotici

Per determinare la sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *S. pneumoniae* è stato usato il saggio dell'Etest (AB BIODISK, Solna, Sweden) (46). Per l'inoculo della coltura batterica è stata utilizzata una torbidità di McFarland 0,5, esclusi i ceppi mucoidi per i quali è stato usato un inoculo pari a McFarland 1. Dopo un'incubazione di 20-24 ore in termostato a 35°C con 5% di CO₂, gli aloni di inibizione della crescita batterica sono stati osservati per la determinazione della MIC. Per quanto riguarda i criteri interpretativi delle MIC ci si è riferiti a quelli fissati dal CLSI nel 2005 (47), e modificati nell'anno 2008 (28).

I test di sensibilità sono stati effettuati sui seguenti antibiotici: penicillina, ceftriaxone, eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloramfenicolo.

Resistenza alla penicillina

Per valutare la sensibilità alla penicillina dello *S. pneumoniae* sono stati utilizzati i criteri più restrittivi, cioè quelli riferiti alle meningiti, secondo il CLSI del 2005 (47). Questi criteri sono stati modificati nel 2008, in modo da comprendere due sole categorie per i ceppi da meningite: ceppi sensibili e ceppi resistenti. I criteri del CLSI 2008 sono essenzialmente sovrapponibili a quelli dello *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (Tabella 55).

Benché questa nuova categorizzazione abbia più rilevanza per la clinica, a fini epidemiologici abbiamo preferito continuare nella classificazione utilizzata in passato e cioè a distinguere i ceppi di pneumococco tra sensibili (*Penicillin susceptible Streptococcus pneumoniae*, PSSP) e non sensibili alla penicillina (*Penicillin nonsusceptible Streptococcus pneumoniae*, PNSSP) e all'interno dei PNSSP a distinguere i ceppi intermedi da quelli resistenti, in modo da avere indicazioni sul livello di resistenza e ottenere un più immediato confronto con i dati del passato.

Dei 330 ceppi, 277 (83,9%) sono risultati PSSP e 53 (16,1%) PNSSP. La percentuale di PNSSP pervenuti nel periodo dello studio è aumentata negli anni, dal 12,9% del 2006, al 15,9% del 2007 e a 16,1% del 2008 con un incremento sia dei ceppi intermedi sia di quelli con resistenza piena (Tabella 56).

Tabella 55. Confronto tra i criteri interpretativi per la penicillina nei diversi quadri clinici

Quadro clinico	Sensibile	Intermedio	Resistente
Meningite			
CLSI 2005	≤0,06	0,12-1	≥2
CLSI 2008	≤0,06	-	≥0,012
EUCAST	≤0,06	-	≥0,012
Non Meningite			
CLSI 2005	≤0,06	0,12-1	≥2
CLSI 2008	≤2	4	≥8
EUCAST	≤0,06	-	2

Tabella 56. AR-ISS 2006-2008: andamento del profilo di antibiotico-resistenza alla penicillina nei ceppi di *S. pneumoniae*

Anno isolamento	n. ceppi	PNSSP		PSSP
		I n. (%)	R n. (%)	S n. (%)
2006	101	11 (10,9)	2 (2)	88 (87,1)
2007	132	14 (10,6)	7 (5,3)	111 (84,1)
2008	97	14 (14,4)	5 (5,2)	78 (80,4)
Totale	330	39 (11,9)	14 (4,2)	277 (83,9)

In Figura 23 è riportata la distribuzione dei valori di MIC rilevati nei ceppi pervenuti. I valori della MIC₅₀ e della MIC₉₀ sono rispettivamente 0,032 µg/mL e 0,25 µg/mL.

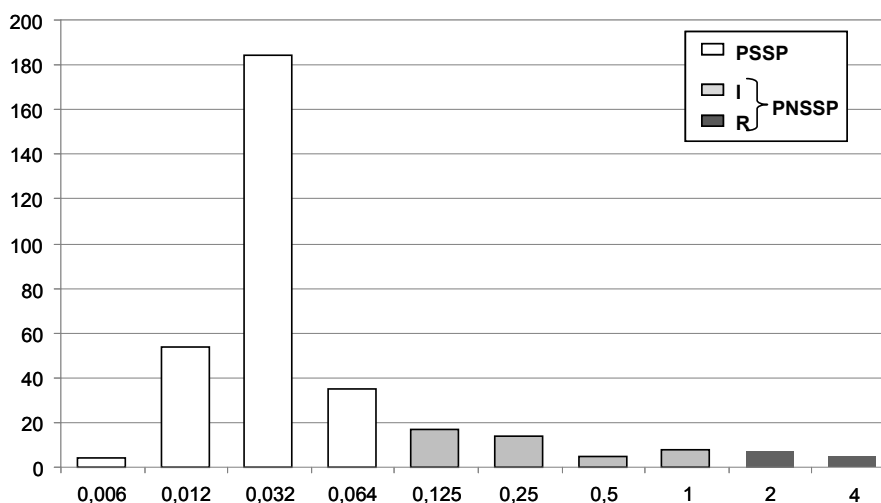


Figura 23. AR-ISS 2006-2008: distribuzione dei valori di MIC della penicillina nei ceppi di *S. pneumoniae*

Dei 53 ceppi PNSSP, 19 erano stati isolati da liquor, 27 da sangue, 2 da altri siti; di 5 non era nota la provenienza. I 21 ceppi PNSSP isolati da liquor avevano MIC comprese tra 0,094 e 4 µg/mL.

La penicillino-resistenza è risultata maggiore nei soggetti di età compresa tra 0 e 4 anni (30,3%) rispetto alle altre classi di età (14,1% nei soggetti di età compresa tra di 5 e 65 anni; 13% nei soggetti di età superiore a 65 anni) (Tabella 57).

Tabella 57. AR-ISS 2006-2008: numero di ceppi di PSSP e PNSSP, e frequenza di resistenza, per classe di età

Anno	0-4 anni		5-65 anni		>65 anni	
	PSSP	PNSSP	PSSP	PNSSP	PSSP	PNSSP
2006	10	3	44	5	28	3
2007	8	6	40	6	53	7
2008	5	1	32	8	40	8
Totale	23	10 (30,3%)	116	19 (14,1%)	121	18 (13,7%)

Studi sulle *Penicillin Binding Proteins*

Le *Penicillin Binding Proteins* (PBP) sono un gruppo di proteine con alta affinità per la penicillina e coinvolte nella sintesi e nel modellamento del peptidoglicano, principale componente della parete batterica. Tutti gli antibiotici beta-lattamici si legano alle PBP per esercitare la loro azione inibitoria sulla sintesi della parete batterica; in particolare in pneumococco i principali bersagli della penicillina sono le PBP 2b e 2x e la resistenza alla penicillina è legata principalmente a mutazioni (mosaicismo) dei geni codificanti queste PBP.

Per mettere in evidenza i fenomeni di mosaicismo su 30 ceppi PNSSP, è stata effettuata la *Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR/RFLP) per lo studio dei geni *pbp2b* e *pbp2x*. I geni, amplificati mediante PCR sono stati poi digeriti con gli enzimi di restrizione *HaeIII* e *RsaI* e analizzati con elettroforesi su gel di agarosio (48). Otto ceppi con MIC per la penicillina compresa tra 0,25 e 4 µg/mL avevano il profilo PBP 2b-6 e 2x-2 caratteristico dei ceppi appartenenti al clone internazionale Spain^{9V}-3, un gruppo clonale frequente nel nostro Paese tra i ceppi resistenti alla penicillina. Gli altri 22 ceppi presentavano diversi profili sempre ascrivibili a mosaicismo delle PBP.

Resistenza alla eritromicina

I ceppi pervenuti in questi tre anni di studio, sono stati sottoposti al saggio di resistenza alla eritromicina mediante Etest: 216 ceppi (65,5%) sono risultati sensibili e 114 (34,5%) resistenti. Nel 2006 i ceppi resistenti erano il 29,7%, nel 2007 il 39,3% e nel 2008 erano il 33%. La resistenza è stata riscontrata nel 48,6% dei ceppi isolati in bambini di età compresa tra 0 e 4 anni, nel 27,5% dei ceppi isolati in soggetti di età compresa tra 5 e 65 anni e nel 36% dei ceppi isolati da pazienti di età superiore a 65 anni (Tabella 58).

Tabella 58. AR-ISS 2006-2008: numero di ceppi sensibili e resistenti, con frequenza di resistenza, alla eritromicina, per classe d'età

Anno	0-4 anni		5-65 anni		>65 anni	
	S	R	S	R	S	R
2006	14	3	34	11	18	13
2007	2	12	32	14	39	21
2008	3	3	29	11	32	16
Totale	19	18 (48,6%)	95	36 (27,5%)	89	50 (36%)

Determinazione dei geni di resistenza alla eritromicina

La resistenza alla eritromicina e agli altri macrolidi in *S. pneumoniae* è associata a due meccanismi principali: la modificazione del ribosoma e l'efflusso attivo. Il primo meccanismo conferisce il fenotipo MLS_B (*Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B*), cioè resistenza a macrolidi, lincosamidi e streptogramina_B; la resistenza ai macrolidi è generalmente di alto livello, con una MIC dell'eritromicina che tipicamente varia da 32 µg/mL a >512 µg/mL.

Il fenotipo MLS_B è legato alla presenza di una metilasi, codificata dal gene *erm*(B), che modifica il sito di legame dei macrolidi nel ribosoma batterico. Il secondo meccanismo conferisce il fenotipo M, cioè resistenza di livello basso o moderato solamente verso i macrolidi, con una MIC per l'eritromicina che può variare da 0,5 µg/mL a 32 µg/mL.

Il fenotipo M è dovuto all'efflusso attivo dell'antibiotico mediato da una pompa codificata dal gene *mef* (A), che a sua volta può essere diviso in due sottoclassi: *mef*(A) propriamente detto, e *mef*(E) con una sequenza poco divergente (49).

Tutti i ceppi, sia sensibili che resistenti, sono stati sottoposti a PCR per la rivelazione dei geni *erm* e *mef* (50). Tra i 114 ceppi resistenti alla eritromicina 84 ceppi (73,7%) sono risultati portatori del gene *erm*(B); 16 (14%) avevano il gene *mef*(A) sottoclasse *mef*(A) e 9 (7,9%) il gene *mef*(A) sottoclasse *mef*(E). Due ceppi (1,75%) presentavano il gene *erm*(B) associato al gene *mef*(E) e 3 ceppi (2,6%) pur essendo resistenti alla eritromicina non presentavano nessuno dei geni sopra indicati. È probabile che in questi ceppi mutazioni nei geni ribosomali o nelle proteine ribosomali siano responsabili della resistenza (51). Nessuno dei ceppi sensibili è risultato portatore di uno dei geni ricercati.

Discrepanze con i dati forniti dai laboratori

La concordanza con i risultati degli antibiogrammi che i laboratori hanno inviato alla sorveglianza AR-ISS è stata valutata su 304 segnalazioni.

Per quanto riguarda la resistenza alla penicillina la divergenza tra i dati non è di elevata entità, a differenza di ciò che riguarda i dati relativi alla eritromicina. Bisogna notare però che per l'eritromicina ci sono numerosi dati mancanti (Tabelle 59 e 60).

Tabella 59. AR-ISS 2006-2008: confronto tra i risultati ottenuti in ISS e i dati forniti dai laboratori sulla resistenza alla penicillina

Ceppi	ISS n. (%)	Laboratori n. (%)
PNSSP	51 (16,9)	45 (14,9)
PSSP	251 (83,1)	257 (85,1)

Tabella 60. AR-ISS 2006-2008: confronto tra i risultati ottenuti in ISS e i dati forniti dai laboratori sulla resistenza alla eritromicina

Ceppi	ISS n. (%)	Laboratori n. (%)
Eri/R	86 (34,2)	73 (29,1)
Eri/S	165 (65,8)	178 (70,9)

Per la penicillina si sono potuti confrontare i dati con quelli riportati su 302 schede, poiché in 2 non sono stati riportati dati relativi alla resistenza. Per l'eritromicina si sono potuti confrontare i dati ottenuti con quelli riportati su solo 251 schede in quanto in 53 schede non erano riportati i dati relativi a questo antibiotico.

Nella maggior parte dei casi le discrepanze relative ai ceppi PNSSP erano dovute ad una erronea categorizzazione in presenza di una MIC corretta, e riguardavano errori minori (da intermedio a resistente o viceversa e da sensibile a intermedio o viceversa). Solo in un caso si è riscontrata una divergenza maggiore: un ceppo sensibile era stato indicato come resistente dal laboratorio di provenienza.

Per quanto riguarda il profilo di resistenza alla eritromicina, la discrepanza tra i dati di resistenza ottenuti, è dovuto al fatto che 19 ceppi (7,5%) sono risultati resistenti nei test eseguiti in ISS (e confermati dai saggi genotipici), ma sensibili nei laboratori di provenienza.

Altri antibiotici

La sensibilità ad altri antibiotici è stata testata su un largo campione dei ceppi (Tabella 61). È stata evidenziata un'elevata percentuale di resistenza a clindamicina e tetraciclina, in entrambi i casi superiore al 26%.

Tabella 61. AR-ISS 2006-2008: profilo di antibiotico-resistenza in *S. pneumoniae* per altri antibiotici

Antibiotico	Ceppi testati n.	S n. (%)	I n. (%)	R n. (%)
Ceftriaxone	305	289 (94,7)	5 (1,6)	11 (3,6)
Clindamicina	299	221 (73,9)	0 (0)	78 (26,1)
Tetraciclina	280	204 (72,8)	2 (0,8)	74 (26,4)
Cloramfenicolo	292	277 (94,8)	0 (0)	15 (5,2)

I ceppi PNSSP risultano più resistenti alla eritromicina, alla clindamicina, al ceftriaxone e alla tetraciclina rispetto ai PSSP.

Lo stesso può essere evidenziato se si confronta la sensibilità agli antibiotici di ceppi resistenti alla eritromicina rispetto ai ceppi sensibili (Tabella 62).

Tabella 62. AR-ISS 2006-2008: numero di ceppi resistenti e frequenza di resistenza ad altri antibiotici fra i ceppi di *S. pneumoniae* resistenti alla penicillina e alla eritromicina

Antibiotico	PSSP (n. 277) n. (%)	PNSSP (n. 53) n. (%)	Eri/R (n. 114) n. (%)	Eri/S (n. 216) n. (%)
Penicillina	-	-	36 (31,6)	17 (7,9)
Ceftriaxone	0 (0)	16 (30,2)	13 (11,4)	3 (1,4)
Eritromicina	78 (28,1)	36 (31,6)	-	-
Clindamicina	55 (19,8)	28 (52,8)	78 (68,4)	0 (0)
Tetraciclina	48 (17,3)	28 (52,8)	68 (59,6)	8 (3,7)
Cloramfenicolo	11 (4)	4 (7,3)	13 (11,4)	2 (0,9)

Sierotipizzazione

La capsula polisaccaridica di *S. pneumoniae* presenta differenze strutturali e antigeniche che caratterizzano 91 diversi sierotipi, in base ai quali classificare i diversi ceppi di *S. pneumoniae*. La sierotipizzazione si esegue mediante la reazione di *Quellung* o rigonfiamento capsulare, oppure mediante agglutinazione con lattice, utilizzando antisieri specifici prodotti dallo Statens Serum Institut di Copenhagen (52). Quando necessario, vengono usati antisieri cosiddetti fattoriali per identificare i sierotipi all'interno dei sierogruppi.

Tutti i ceppi di *S. pneumoniae* inviati dai laboratori partecipanti sono stati sierotipizzati ed è stata verificata la loro appartenenza ai sierogruppi compresi nel vaccino antipneumococcico glicoconiugato 7-valente (PCV7) e/o nel vaccino polisaccaridico 23-valente (23 PS) (Tabella 63).

Tabella 63. AR-ISS 2006-2008: sierotipi compresi nel vaccino antipneumococcico glicoconiugato 7-valente (PCV7) e nel vaccino polisaccaridico 23-valente (23 PS)

Tipo vaccino	Sierotipi
7-valente (PCV7) (pediatrico)	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
23-valente (23 PS) (per adulti)	1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F

Per il PCV7, oltre alla definizione di sierotipo vaccinale (*Vaccine Serotypes*, VS), viene utilizzata anche quella di sierotipi correlati a quelli vaccinali (*Vaccine Related Serotypes*, VRS) quei sierotipi che appartengono agli stessi sierogruppi di quelli contenuti nel vaccino, (ad esempio sierotipo 6A, 9L, 19A, ecc.) verso i quali è stata ipotizzata una relativa protezione.

Fra i bambini con età compresa tra 0 e 4 anni, i sierotipi più comunemente isolati sono stati il 14 (18,2%), l'1, il 19A e il 23F (12,1%), il 19F e il 7F (9,1%). Il 42,4% dei ceppi apparteneva ad un VS, il 15,1% ad un VRS e il 42,4% a sierotipi non vaccinali (*Non-Vaccine Serotypes*, NVS).

Nei ceppi isolati in pazienti di età compresa tra 5 anni e 65 anni, i sierotipi più frequenti sono stati: 19A (12,2%), 1 (11,4%), 3 (7,6%), 23F (6,1%), 7F (6,1%), 14 (4,6%), 6A (4,6%) e 4 (3,8%). Per quanto riguarda il vaccino PCV7, il 23,7% dei ceppi era VS, il 17,5% era VRS e il 58,8% era NVS; per il 23 PS, il 77,8% dei ceppi apparteneva a sierotipi vaccinali.

Nei ceppi isolati in pazienti di età superiore a 65 anni i sierotipi più frequenti sono stati: 19A (12,2%), 1 (11,4%), 3 (7,6%), 23F e 7F (6,1%), 14 e 6A (4,6%), 4 (3,8%). L'87,8% dei ceppi apparteneva a sierotipi contenuti nel vaccino 23 PS (Tabella 64).

Rispetto ai risultati di studi precedentemente pubblicati, che si riferiscono agli anni antecedenti l'utilizzo del vaccino (53), la percentuale dei casi dovuti a *S. pneumoniae* di sierotipo 19A ha subito un incremento, che lo ha portato ad essere il secondo sierotipo isolato; mentre fra i ceppi PNSSP diviene il primo per frequenza di isolamento (18,8%). Verso questo sierotipo, che pure è un VRS, il PCV7 non sembra svolgere attività protettiva.

Tabella 64. AR-ISS 2006-2008: ranking sierotipi dei ceppi di *S. pneumoniae*

Ranking	0-4 anni (n. 37)		>65 anni (n. 139)		Popolazione totale (n. 330)	
	Sierotipo	n. (%)	Sierotipo	n. (%)	Sierotipo	n. (%)
1	14*	6 (16,2)	3*	27 (19,4)	3	38 (11,5)
2	1	4 (10,8)	14*	14 (10,1)	19A	36 (10,9)
3	19A	4 (10,8)	19A	14 (10,1)	1	30 (9,1)
4	23F*	4 (10,8)	7F	10 (7,2)	14*	27 (8,2)
5	7F	3 (8,1)	1	8 (5,7)	7F	24 (7,3)
6	19F*	3 (8,1)	4*	6 (4,3)	19F*	17 (5,1)
7	6A	2 (5,4)	19F*	6 (4,3)	23F*	16 (4,8)
8	10A	2 (5,4)	22F	6 (4,3)	4*	12 (3,6)
9	15B	2 (5,4)	6B*	5 (3,6)	22F	12 (3,6)
10	3	1 (2,7)	9V*	4 (2,9)	6A	10 (3)
11	6B*	1 (2,7)	11A	4 (2,9)	15B	10 (3)
12	24F	1 (2,7)	18C*	4 (2,9)	6B*	8 (2,4)
13	NT	1 (2,7)	23F*	4 (2,9)	9V*	7 (2,1)
14			NT	4 (2,9)	11A	7 (2,1)
15			15A	3 (2,2)	18C*	7 (2,1)
16			33F	3 (2,2)	24F	7 (2,1)
17			6A	2 (1,4)	NT	7 (2,1)
18			12B	2 (1,4)	8	5 (1,5)
19			15B	2 (1,4)	10A	5 (1,5)
20			24F	2 (1,4)	12B	4 (1,2)
21			Altri**	15 (10,8)	Altri***	41 (12,4)

*sierotipi compresi nel vaccino PCV-7 pediatrico

** sierotipi 8,9N,12F,15C,17,18A,20,23A, 29,31,34,35B,35F

*** sierotipi 9A/L,9N, 12A, 12F, 15A,15C,17,18A,20,21,23A,23B,29,31,33F,34,35B,35F,38

Genotipizzazione

La tipizzazione molecolare dei ceppi di pneumococco è stata eseguita su un campione degli isolati, comprendente sia PNSSP che PSSP resistenti ad altri antibiotici (eritromicina, clindamicina, tetraciclina e cloramfenicolo), quindi considerati multi-resistenti (*Multi Drug Resistant*, MDR). Le tecniche utilizzate sono state la elettroforesi su gel a campo pulsato (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*, PFGE) e una tecnica di genotipizzazione tramite sequenziamento chiamata *MultiLocus Sequence Typing-MLST*. La PFGE è una tecnica di separazione di frammenti di DNA che si avvale di un campo elettrico la cui direzione viene variata periodicamente. In questo modo si possono separare frammenti di grandi dimensioni fino a 10 Mb. Nel caso dello pneumococco i frammenti sono stati ottenuti digerendo il cromosoma di *S. pneumoniae* con l'enzima di restrizione *SmaI* (54). Agli isolati con profilo elettroforetico identico è stato assegnato lo stesso tipo e sottotipo PFGE; agli isolati con profili simili (differenza da una a sei bande) all'interno dello stesso tipo PFGE è stato assegnato un sottotipo differente (55). I profili identici o simili a quelli trovati in studi precedenti sono stati identificati con la designazione usata precedentemente. I tipi PFGE sono stati analizzati con il software Bionumerics per Windows (v. 2.5; Applied Maths, Ghent, Belgium)¹. Successivamente su ceppi rappresentativi per ogni profilo elettroforetico ottenuto è stata eseguito MLST in accordo con i metodi raccomandati (56). MLST misura direttamente le variazioni nelle sequenze di DNA in un set di

¹ Si ringrazia il Dott. Giovanni Gherardi, Dipartimento di Scienze Biomediche, Università Campus Bio-Medico, Roma, per la sua collaborazione nello studio della clonalità dei ceppi di *S. pneumoniae* mediante la PFGE.

sette geni costitutivi e caratterizza i ceppi batterici mediante i loro profili allelici unici. Vengono amplificati frammenti di circa 450-500 bp per ogni gene che vengono poi sequenziati. Per ogni gene sono assegnati alleli distinti per sequenze differenti e per ogni isolato gli alleli definiscono il profilo allelico (*sequence type*, ST). Gli ST ottenuti sono stati comparati con quelli disponibili nel database MLST (<http://www.mlst.net>)², e poi con quelli PMEN (*Pneumococcal Molecular Epidemiology Network*) (57). Quest'ultimo è stato istituito nel 1997 per una sorveglianza globale di *S. pneumoniae* antibiotico-resistenti e per la standardizzazione della nomenclatura e della classificazione dei cloni resistenti. Il PMEN ha ultimamente deciso di includere anche i cloni antibiotico-suscettibili che hanno una larga diffusione geografica.

In questo studio sono stati esaminati 65 ceppi, di cui 35 PNSSP e 30 ceppi PSSP, per la maggior parte MDR. Come riportato in Tabella 65, la maggior parte dei ceppi esaminati (64,6%) è risultata appartenere a cloni internazionali (58). Tra i ceppi PNSSP i cloni più comuni sono quelli definiti: Sweden^{15A}-25, Spain^{9V}-3, Spain^{23F}-1 e Denmark¹⁴-32 (dal nome del Paese in cui il clone è stato descritto per la prima volta e dal primo sierotipo individuato nel clone). Un unico ceppo PNSSP è risultato appartenere al clone England¹⁴-9, un clone composto in genere da ceppi PSSP.

Tabella 65. AR-ISS 2006-2008: numero di ceppi e sierotipo appartenenti ai cloni internazionali di ceppi PNSSP e/o MDR

Clone	Sierotipo	Isolati	PNSSP	MDR
Sweden ^{15A} -25	19A	7	7	6
	19F	2	2	2
	15A	2	2	2
	23F	1	1	1
Spain ^{9V} -3	9V	1	1	1
	14	6	4	3
	24F	1	0	0
Greece ²¹ -30	19A	1	0	1
	15C	2	0	2
	NT	1	0	0
England ¹⁴ -9	14	4	1	3
Spain ^{23F} -1	23F	2	2	2
	19F	1	1	1
Denmark ¹⁴ -32	24F	3	3	3
Netherlands ³ -31	3	2	0	2
Poland ^{6B} -20	6B	1	0	1
CC72	24F	4	0	0
	10A	1	0	0

Tra i ceppi PSSP ma MDR la maggior parte dei ceppi è risultata appartenere ai cloni Greece²¹-30, Netherlands³-31 e Poland^{6B}-20. Cinque ceppi PSSP appartenevano allo stesso gruppo clonale (CC72) non inserito tra i cloni internazionali.

È interessante notare come alcuni cloni, soprattutto Sweden^{15A}-25, Spain^{9V}-3 e Greece²¹-30, comprendano ceppi appartenenti a sierotipi diversi. Questo è dovuto presumibilmente al fenomeno del cosiddetto “switch” o scambio capsulare (59).

² Si ringrazia l'Imperial College di Londra per l'uso del database MLST finanziato dal Wellcome Trust.

Conclusioni

I dati più salienti ottenuti dall'esame dei ceppi di pneumococco inviati dai laboratori partecipanti alla sorveglianza AR-ISS, sono stati:

- un'elevata resistenza alla penicillina e alla eritromicina nei ceppi isolati in bambini di età compresa tra 0 e 4 anni, rispetto a quella riscontrata nei ceppi isolati da pazienti di altra età.
- un aumento della resistenza alla penicillina nei ceppi isolati dai bambini di età compresa tra 0 e 4 anni rispetto a quella osservata nel triennio precedente; si è passati infatti, dal 12,8% nel periodo 2003-2005 (45) al 30,3% del triennio 2006-2008.
- una diminuzione della resistenza alla eritromicina nella stessa classe di età, che pur mantenendosi su livelli molto elevati è passata dal 66% del triennio 2003-2005 al 48,6% del triennio 2006-2008.
- un aumento della circolazione dei sierotipi non vaccinali, soprattutto per quanto riguarda i sierotipi 1, 3 e 19A. Nei bambini di età compresa tra 0 e 4 anni, la percentuale di sierotipi non vaccinali è pari al 54%. La presenza di molti sierotipi non vaccinali si è evidenziata anche all'interno dei cloni internazionali circolanti nel nostro Paese.

Enterococcus faecalis/faecium **resistenti alla vancomicina**

Gli enterococchi sono costituenti comuni della flora intestinale dell'uomo. In individui sani sono commensali innocui ma, in ambito ospedaliero, soprattutto le specie *Enterococcus faecalis* (ca. 90%) ed *Enterococcus faecium* (ca. 10%), sono responsabili di infezioni del tratto urinario, di endocarditi, di sepsi, raramente di meningiti (60). Gli enterococchi sono intrinsecamente resistenti ad un ampio spettro di antibiotici, quali penicilline, cefalosporine, sulfonammidi, a basse concentrazioni di aminoglicosidi. Inoltre è in aumento il numero di isolati con resistenza acquisita a penicilline/ampicillina, ad alti livelli di aminoglicosidi, ai glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina) (60). I glicopeptidi, da soli o in combinazione con altri antibiotici, spesso rappresentano l'unica terapia disponibile nel trattamento di infezioni dovute a ceppi multiresistenti non solo di enterococchi ma anche di streptococchi e soprattutto di stafilococchi meticillino-resistenti (MRSA).

Gli enterococchi resistenti alla vancomicina (*Vancomycin-Resistant Enterococci*, VRE), isolati per la prima volta nel 1988 in Europa e nel 1989 negli Stati Uniti, si sono diffusi rapidamente in tutto il mondo. L'emergenza di VRE è da attribuire prevalentemente alla specie *E. faecium* e in minor misura a *E. faecalis*.

Negli Stati Uniti, le infezioni da VRE in reparti di terapia intensiva sono più del 28%, di cui circa il 75% dei casi dovuto a *E. faecium* vancomicino-resistenti (VR *E. faecium*) (61).

Nei Paesi europei i dati del rapporto annuale 2008 dell'EARSS, relativi alle infezioni invasive, indicano una proporzione variabile dei VR *E. faecium*, tendenzialmente bassa ad eccezione di tre Paesi, la Grecia, il Regno Unito, e l'Irlanda che hanno riportato tra il 28% e il 35% di VR *E. faecium* isolati. In Italia, i VR *E. faecium* sono aumentati dal 15% del 2001 al 24% del 2003, e poi diminuiti fino all'11% nel 2007, e al 6% nel 2008 (26).

La diffusione di VR *E. faecium* in ambito ospedaliero all'inizio degli anni 2000, sembrerebbe dovuta principalmente alla circolazione di un clone particolarmente adattato a quell'ambiente: il clone appartenente al complesso clonale (CC) 17 è stato individuato come

responsabile della maggior parte di infezioni e di piccole epidemie nosocomiali non solo negli Stati Uniti ma in diversi Paesi del mondo, inclusa l'Italia (62).

Sono stati descritti sei tipi di resistenza ai glicopeptidi, ma due sono i tipi di resistenza clinicamente rilevanti: il tipo VanA e il tipo VanB. In entrambi i casi la resistenza è dovuta alla presenza di un gruppo di geni che codificano enzimi la cui azione coordinata determina una modificazione del precursore del peptidoglicano, bersaglio della vancomicina. I due tipi di resistenza prendono il nome da uno dei geni presenti, rispettivamente *vanA* e *vanB*, codificanti una ligasi (63).

In enterococchi portatori del gene *vanA* si osservano alti livelli di resistenza sia alla vancomicina che alla teicoplanina; nei portatori del gene *vanB* si osservano livelli variabili di resistenza alla vancomicina ma sensibilità alla teicoplanina (63). Sia *vanA* che *vanB* e i rispettivi geni associati sono portati da trasposoni e possono essere trasferiti ad altri enterococchi e ad altri batteri, determinando la diffusione della resistenza. In ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) si è osservato questo trasferimento, inizialmente solo temuto. Dal 2002 sono stati isolati 11 ceppi di MRSA resistenti alla vancomicina. In uno dei casi è stato dimostrato *in vivo* il trasferimento di un trasposone che porta *vanA* da un ceppo di VR *E. faecalis* a un ceppo di *S. aureus* (60).

La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza AR-ISS relativamente a *E. faecalis* e *E. faecium*, per il periodo 2006-2008, prevedeva che i laboratori ospedalieri, segnalassero tutti gli isolati clinici invasivi e inviassero all'ISS tutti gli isolati non sensibili alla vancomicina, VRE con resistenza intermedia o con resistenza piena.

Rispetto alla precedente sorveglianza realizzata nel periodo 2001-2003, in quest'ultima è stato richiesto anche l'invio di ceppi con resistenza intermedia alla vancomicina, allo scopo di studiare e caratterizzare anche gli isolati con livelli più bassi di resistenza.

Fenotipo VRE

Durante il triennio 2006-2008, 27 laboratori hanno notificato l'isolamento di 132 VRE: 112 con resistenza piena alla vancomicina ($MIC \geq 32 \mu\text{g/mL}$) e 20 con resistenza intermedia ($MIC = 8-16 \mu\text{g/mL}$). Complessivamente, 41 ceppi sono stati identificati come appartenenti alla specie *E. faecalis* e 91 alla specie *E. faecium*.

Per la caratterizzazione molecolare, 61 VRE, 56 ceppi con resistenza piena alla vancomicina e 5 con resistenza intermedia, sono stati inviati in ISS da 11 laboratori. La maggior parte dei ceppi inviati è stata isolata in reparti di terapia intensiva, medicina, ematologia e chirurgia; 34 sono stati isolati nel 2006, 11 nel 2007 e 16 nel 2008.

Genotipo VRE

Tutti i ceppi inviati alla sorveglianza AR-ISS sono stati analizzati mediante PCR multipla (64). Lo scopo era di identificare e confermare anche a livello genotipico la specie di appartenenza definita nei laboratori (*E. faecalis* o *E. faecium*) mediante amplificazione dei gene *ddl_{E. faecalis}* e *ddl_{E. faecium}*, codificanti ligasi specie-specifiche, e di identificare i geni *vanA* e *vanB*, associati rispettivamente ai tipi di resistenza VanA o VanB.

Dei 12 ceppi *E. faecalis* inviati, 11 sono risultati positivi al gene *ddl_{E. faecalis}* e quindi sono stati confermati anche genotipicamente appartenenti a questa specie. Un ceppo risultato negativo, dopo ulteriore analisi è risultato appartenente alla specie *E. gallinarum* (64), e quindi escluso dallo studio.

Degli 11 *E. faecalis*, 9 sono risultati portatori del gene *vanA* e 2 sono risultati privi dei geni di resistenza. In questi ultimi, il test fenotipico di conferma ha riportato sensibilità alla vancomicina, in accordo con il risultato molecolare, e di conseguenza i due ceppi sono stati esclusi da ulteriori analisi.

I 48 ceppi *E. faecium* inviati sono risultati tutti positivi al gene *ddl*_{*E. faecium*} e quindi confermati genotipicamente appartenenti a questa specie. Per la presenza del gene *ddl*_{*E. faecium*}, anche un ceppo identificato come *E. durans* è risultato appartenente alla specie *E. faecium*.

Dei 49 ceppi confermati *E. faecium*, 43 sono risultati portatori del gene *vanA*, 5 del gene *vanB* e 1 di entrambi i geni di resistenza, *vanA* e *vanB* (Tabella 66).

Tabella 66. AR-ISS 2006-2008: specie di appartenenza e geni di resistenza di 58 VRE

VRE	n. isolati
<i>E. faecalis</i> - <i>vanA</i>	9
<i>E. faecium</i> - <i>vanA</i>	43
<i>E. faecium</i> - <i>vanB</i>	5
<i>E. faecium</i> - <i>vanA/vanB</i>	1

Sulla base della corrispondenza tra genotipo e fenotipo di resistenza (63), in tutti i casi di discrepanza dei dati genotipici con quelli fenotipici riportati dai laboratori, è stato effettuato un test fenotipico di conferma.

Complessivamente dei 56 ceppi inviati come resistenti alla vancomicina è stata riscontrata una sola discrepanza dovuta a un *E. faecalis* genotipicamente privo di gene *van* che al test fenotipico di conferma è risultato sensibile. Dei 5 ceppi con resistenza intermedia alla vancomicina, escludendo 1 *E. gallinarum* non oggetto dello studio, 1 *E. faecium* portatore del gene *vanB* è stato confermato intermedio; 2 *E. faecium* portatori rispettivamente di *vanA* e di *vanB*, sono risultati resistenti; 1 *E. faecalis* privo di gene *van* è risultato sensibile.

Dei 45 ceppi inviati come resistenti alla teicoplanina, 1 *E. faecalis* privo di gene *van*, al test fenotipico di conferma è risultato sensibile. I 3 ceppi ritenuti con resistenza intermedia alla teicoplanina sono risultati resistenti. Di 13 ceppi ritenuti sensibili, 2 sono stati confermati sensibili alla teicoplanina e quindi, pur essendo portatori del gene *vanA*, invece del fenotipo di resistenza VanA esprimevano resistenza di tipo VanB; di 4 ceppi con genotipo *vanA*, 3 sono risultati resistenti e 1 ha riportato un livello di resistenza intermedio alla teicoplanina, confermando la concordanza tra genotipo e fenotipo VanA (63).

Questi dati confermano alcuni dei problemi legati ai test di sensibilità ai glicopeptidi, in particolare alla teicoplanina.

Sulla base della definizione della resistenza, tipo VanA o tipo VanB, rispetto al corrispondente genotipo associato ai geni *vanA* o *vanB* (63), 2 ceppi si sono discostati dall'atteso. Questi ceppi pur essendo genotipicamente *E. faecium-vanA*, esprimevano un fenotipo di resistenza VanB, resistenza alla vancomicina e sensibilità alla teicoplanina, presumibilmente dovuto a mutazioni in uno dei geni portati dal trasposone che porta *vanA* (65, 66).

L'aver incluso nella sorveglianza i ceppi con resistenza intermedia alla vancomicina ha permesso di analizzare 3 ceppi, che altrimenti non sarebbero stati considerati, consentendo di avere un quadro più preciso dei VRE circolanti in Italia.

Multiresistenza nei VRE

I risultati di sensibilità agli antibiotici ottenuti nei laboratori, relativamente ai ceppi VRE inviati in ISS che presentavano le caratteristiche richieste dalla sorveglianza, hanno evidenziato prevalentemente multiresistenza, intesa come resistenza a tre o più classi di antibiotici.

Come riportato in Tabella 67, i VR *E. faecalis* sono risultati prevalentemente resistenti a quattro classi di antibiotici.

Tabella 67. AR-ISS 2006-2008: profilo di sensibilità agli antibiotici in VR *E. faecalis*

Antibiotico	Ceppi esaminati	Sensibili n. (%)	Intermedi n. (%)	Resistenti n. (%)
Penicillina	6	3 (50,0)	0 (0,0)	3 (50,0)
Ampicillina	8	8 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Streptomicina (<i>alto dosaggio</i>)	5	4 (80,0)	0 (0,0)	1 (20,0)
Gentamicina (<i>alto dosaggio</i>)	6	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (100)
Eritromicina	9	0 (0,0)	5 (55,6)	4 (44,4)
Tetracicline	7	0 (0,0)	0 (0,0)	7 (100,0)
Vancomicina	9	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (100,0)
Teicoplanina	9	0 (0,0)	0 (0,0)	9 (100,0)
Linezolid	7	7 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

Nei VR *E. faecium* 100% dei ceppi esaminati era resistente a penicillina e ampicillina, 82% a streptomicina ad alto dosaggio, 75% a gentamicina ad alto dosaggio, 97,8% a eritromicina, e solo 15,4% alle tetracicline (Tabella 68).

Tabella 68. AR-ISS 2006-2008: profilo di sensibilità agli antibiotici in VR *E. faecium*

Antibiotico	Ceppi esaminati	Sensibili n. (%)	Intermedi n. (%)	Resistenti n. (%)
Penicillina	35	0 (0,0)	0 (0,0)	35 (100,0)
Ampicillina	48	0 (0,0)	0 (0,0)	48 (100,0)
Streptomicina (<i>alto dosaggio</i>)	39	7 (18,0)	0 (0,0)	32 (82,0)
Gentamicina (<i>alto dosaggio</i>)	44	11 (25,0)	0 (0,0)	33 (75,0)
Eritromicina	46	1 (2,2)	3 (6,5)	42 (91,3)
Tetracicline	39	33 (84,6)	1 (2,6)	5 (12,8)
Vancomicina	49	0 (0,0)	1 (2,0)*	48 (98,0)**
Teicoplanina	49	7 (14,3)***	1 (2,0)****	41 (83,7)
Quinupristin/Dalfopristin	39	31 (79,5)	6 (15,4)	2 (5,1)
Linezolid	43	43 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

* ceppo portatore di *vanB*

** ceppi portatori di *vanA* (43), *vanB* (4), e *vanA/vanB* (1)

*** ceppi portatori di *vanB* (5) e di *vanA* (2).

**** ceppo portatore di *vanA*

Caratteristiche clonali

Allo scopo di confrontare i ceppi per definire le correlazioni clonali, 52 VRE sono stati sottoposti a tipizzazione molecolare mediante elettroforesi in campo pulsato (PFGE) del DNA totale digerito con enzima di restrizione *Sma*I. I profili di restrizione ottenuti sono stati confrontati sulla base delle indicazioni di Tenover *et al* (55): gli isolati con profili identici o simili, che differivano da una a sei bande sono stati assegnati allo stesso pulsotipo e considerati

correlati; isolati che differivano per più di sei bande sono stati assegnati a pulsotipi diversi e considerati non correlati.

Dei 9 VR *E. faecalis-vanA* esaminati, 6 ceppi hanno presentato profili elettroforetici molto simili (pulsotipo a) indicando una correlazione clonale tra gli isolati; i rimanenti 3 ceppi hanno presentato profili elettroforetici eterogenei (pulsotipi b-d), risultando non correlati (Tabella 69).

Tabella 69. AR-ISS 2006-2008: caratteristiche e correlazioni clonali di 9 VR *E. faecalis*

Pulsotipo	n. isolati	Gene di resistenza	n. laboratori	Anno isolamento
a	6	<i>vanA</i>	4	2006, 2007, 2008
b	1	<i>vanA</i>	1	2006
c	1	<i>vanA</i>	1	2007
d	1	<i>vanA</i>	1	2006

I ceppi correlati sono stati isolati in 4 diversi laboratori ospedalieri, dislocati al centro e al nord dell'Italia. Sebbene il numero di VR *E. faecalis-vanA* sia molto basso, la circolazione in ospedali diversi di ceppi correlati potrebbe indicare la tendenza alla diffusione di un clone prevalente. Questa maggiore omogeneità si differenzia dalla eterogeneità dei ceppi osservata durante la sorveglianza condotta nel periodo 2001-2003 (62).

Dei 49 VR *E. faecium*, 43 sono stati analizzati mediante PFGE (Figura 24).

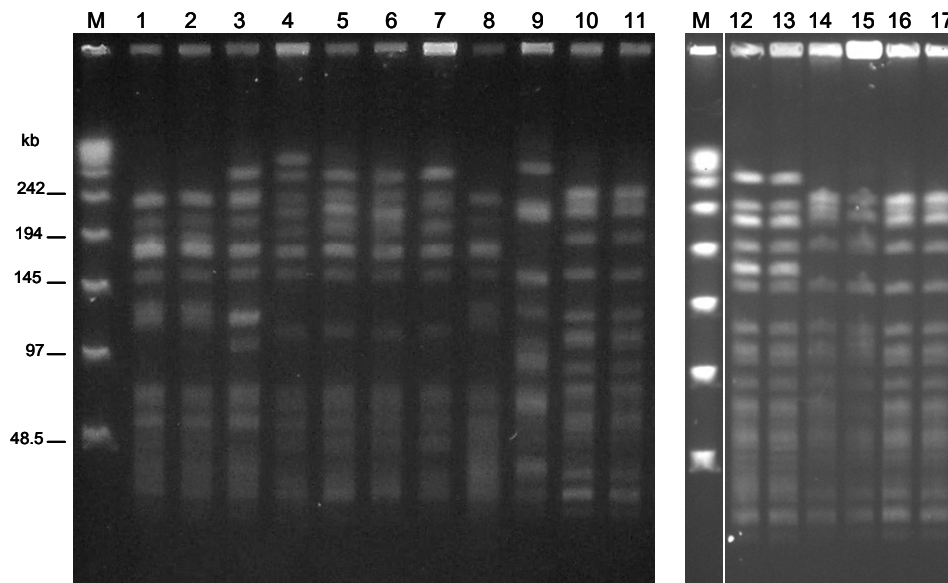


Figura 24. AR-ISS 2006-2008: profili elettroforetici di 17 ceppi VR *E. faecium*
(da 1 a 8, ceppi VR *E. faecium* con profili simili appartenenti al pulsotipo A; 9, ceppo con pulsotipo C;
da 10 a 17, ceppi appartenenti al pulsotipo F. M, marcatore di peso molecolare)

L'analisi dei profili elettroforetici dei VR *E. faecium*, ha evidenziato la presenza di 8 diversi pulsotipi (A-H), con un pulsotipo che include la maggior parte dei ceppi (Tabella 70).

Tabella 70. AR-ISS 2006-2008: caratteristiche e correlazioni clonali di 43 VR *E. faecium*

Pulsotipo	n. isolati	Gene di resistenza	n. laboratori	Anno isolamento
A	26	<i>vanA</i>	5	2006, 2007
B	2	<i>vanA</i>	1	2006
C	2	<i>vanA, vanB</i>	1	2007
D	1	<i>vanA</i>	1	2006
E	1	<i>vanA</i>	1	2006
F	7	<i>vanA</i>	1	2007, 2008
G	1	<i>vanB</i>	1	2007
H	3*	<i>vanB, vanA/vanB*</i>	1	2006, 2007

*di cui: 2 *vanB* e 1 *vanA/vanB*

Il pulsotipo A è nettamente prevalente in quanto include più del 60% dei VR *E. faecium* esaminati, tutti portatori del gene *vanA*, isolati nel 2006 e nel 2007 in 5 laboratori italiani dislocati nel nord e nel centro. Gli altri 7 pulsotipi includono 17 ceppi isolati in 4 diversi laboratori: i ceppi che condividono il pulsotipo sono stati isolati nello stesso laboratorio, suggerendo la possibilità di piccole epidemie locali. Il pulsotipo F, il secondo pulsotipo più rappresentato, include ceppi isolati nella stessa struttura ospedaliera circolanti sia nel 2007 che nel 2008. Il pulsotipo C è caratteristico di due isolati VR *E. faecium* portatori rispettivamente del gene *vanA* e del gene *vanB*. In questo caso si potrebbe ipotizzare una comune origine clonale dovuta all'acquisizione, in un caso di *vanA* e nell'altro di *vanB*, da parte di un progenitore comune sensibile alla vancomicina. Il pulsotipo H include 2 ceppi, *E. faecium-vanB* e il ceppo *E. faecium-vanA/vanB* portatore di entrambi i geni di resistenza. Si potrebbe ipotizzare che un ceppo già portatore del gene *vanB* possa aver acquisito il gene *vanA* con il vantaggio di aver acquisito la resistenza anche alla teicoplanina.

L'analisi dei profili elettroforetici mette in evidenza la circolazione su tutto il territorio italiano di un clone prevalente di VR *E. faecium-vanA* e la diffusione sporadica di cloni locali. Il confronto dei profili elettroforetici dei ceppi più recenti con quelli ottenuti con i VRE isolati nel periodo 2001-2003, ha evidenziato l'ampia diffusione e la persistenza nel periodo 2006-2008 dello stesso clone già circolante in Italia durante la precedente sorveglianza (62).

Per confermare il rapporto clonale tra i ceppi circolanti in Italia nel periodo 2006-2008 e quelli circolanti nel periodo 2001-2003, e per un confronto con ceppi isolati in altre parti del mondo, 2 ceppi rappresentativi del pulsotipo A sono stati tipizzati mediante *Multi Locus Sequence Typing* (MLST) (<http://efaecium.mlst.net>). Per ciascun isolato, le sequenze di 7 geni *housekeeping* sono state confrontate con quelle di alleli presenti nella banca dati disponibile nel sito: <http://efaecium.mlst.net>. Dai profili allelici ottenuti, i ceppi sono risultati appartenere a due *Sequence Type* (ST): ST78 e ST202, aventi in comune 5 alleli su 7. L'ST78 corrisponde al ST del clone circolante in Italia nel periodo 2001-2003 (62).

Mediante analisi eBURST (<http://eburst.mlst.net/>), un algoritmo che consente di esaminare le correlazioni clonali sulla base dei diversi ST e di definire l'ST fondatore per ciascun clone, è risultato che sia l'ST78 che l'ST202, entrambi varianti dell'ST17 per un solo allele, appartengono al complesso clonale CC17 (Figura 25).

Il CC17 include isolati epidemici a diffusione mondiale particolarmente adattati all'ambiente ospedaliero.

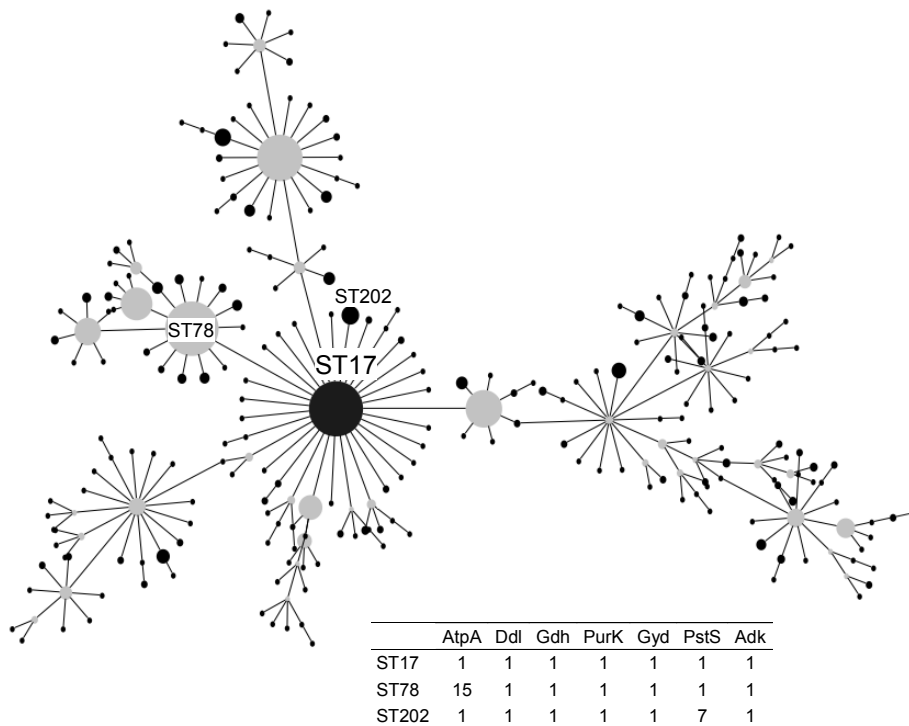


Figura 25. AR-ISS 2006-2008: diagramma eBURST relativo al complesso clonale CC17 e tabella con i profili allelici relativi ai tre ST

Conclusioni

I risultati di questa sorveglianza evidenziano nei VRE una netta prevalenza del tipo di resistenza VanA, con alti livelli di resistenza a entrambi gli antibiotici glicopeptidici. Si conferma inoltre una tendenza alla multiresistenza dei VRE, in cui la maggior parte dei ceppi è resistente ad almeno quattro classi di antibiotici.

La circolazione nosocomiale dei VRE in Italia, come in altri Paesi europei e non, è da attribuire prevalentemente al clone CC17, già identificato in passato, che conferma la elevata diffusibilità che lo caratterizza. Questo comportamento deve indurre in ambito ospedaliero ad una continua attenzione affinché la diffusione sia contenuta per evitare che la resistenza possa essere trasferita ad altri batteri.

CONSIDERAZIONI FINALI

L'insorgenza e la diffusione della resistenza agli antibiotici è associata al largo uso di questi farmaci, spesso eccessivo o inappropriato. Gli antibiotici rappresentano, infatti, una delle classi di farmaci più utilizzate e costituiscono uno dei principali capitoli di spesa farmaceutica. Il controllo dell'antibiotico-resistenza richiede innanzitutto una conoscenza del fenomeno, che può essere ottenuta solo attraverso la messa in opera di adeguati programmi di sorveglianza, a livello locale, nazionale e sovranazionale. La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza è necessaria per verificare le tendenze nel tempo e per valutare l'efficacia di eventuali misure correttive, quali campagne d'informazione al pubblico e ai professionisti, per modificare abitudini e atteggiamenti prescrittivi. A livello ospedaliero la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza è associata alla sorveglianza e al controllo delle infezioni ospedaliere e deve essere considerata una parte importante della valutazione del rischio clinico.

L'Istituto Superiore di Sanità si impegna ormai da dieci anni a coordinare a livello nazionale la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza e a trasferirla poi a livello europeo.

Benché la sorveglianza AR-ISS presenti dei limiti metodologici, legati soprattutto alla limitata rappresentatività geografica e al limitato numero di patogeni sotto sorveglianza, la disponibilità di questi dati rappresenta un riferimento per la Sanità Pubblica e la contestualizzazione della situazione italiana nel panorama europeo. È la sorveglianza AR-ISS che ha reso possibile di definire l'Italia con un preciso colore, relativo alla frequenza di resistenza, nelle carte geografiche europee prodotte dall'EARSS.

Questo Rapporto ISTISAN, frutto della preziosa collaborazione dei laboratori partecipanti alla rete AR-ISS, ambisce ad essere un utile strumento a disposizione di tutte le figure professionali che operano nel campo della sanità pubblica e del controllo delle infezioni nelle organizzazioni sanitarie. La sorveglianza ha rilevato come la resistenza agli antibiotici si è evoluta e modificata in pochi anni: nel triennio 2006-2008 i livelli di resistenza si sono stabilizzati, o in qualche caso sono lievemente diminuiti, nelle specie Gram-positive mentre nelle specie Gram-negative si è osservato un trend in aumento relativo soprattutto ai fluorochinoloni, aminopenicilline e aminoglicosidi in *E. coli* e *K. pneumoniae/oxytoca*, e ai carbapenemici in *P. aeruginosa*, specie che è stata introdotta nella sorveglianza solo a partire dal 2007. La sorveglianza ha confermato, inoltre, che i livelli di resistenza sono più alti al Centro e al Sud rispetto al Nord Italia, dato che si correla al maggior consumo di antibiotici in queste aree geografiche.

Questo rapporto, rispetto al precedente pubblicato nel 2007, si è arricchito della sezione inerente le caratterizzazioni microbiologiche effettuate sulle specie Gram-positive incluse nel protocollo AR-ISS, in particolare *S. aureus*, *S. pneumoniae*, ed *Enterococcus* spp. Il lavoro di caratterizzazione di questi ceppi ha permesso di migliorare la comprensione dell'epidemiologia molecolare di queste specie a livello nazionale e di confrontarla in ambito europeo in termini di diffusione clonale.

Questo rapporto segna anche una fase di passaggio della sorveglianza europea dell'antibiotico-resistenza.

Dal suo inizio la rete EARSS è stata coordinata dall'Istituto di Sanità Pubblica olandese RIVM (Bilthoven) e finanziata dalla DG-Sanco. Dal 1° gennaio 2010 è avvenuta la transizione al Centro Europeo per la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) di Stoccolma, agenzia della Commissione Europea. La rete ha cambiato nome in EARS-Net (*European Antimicrobial Resistance Surveillance Network*) e i dati di antibiotico-resistenza sono raccolti

da un sistema automatizzato, denominato TESSy, che raccoglie anche i dati delle altre sorveglianze delle malattie infettive.

Questo passaggio ad un organismo europeo istituzionale, rappresenta una sfida alla quale siamo chiamati a rispondere, per garantire la continuità e la sostenibilità della sorveglianza e migliorare la sua rappresentatività nazionale. Un'altra novità è la richiesta europea di utilizzare i nuovi criteri europei per l'interpretazione dell'antibiogramma, che sono stati elaborati dall'EUCAST (*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing*) con lo scopo di armonizzare e razionalizzare su basi aggiornate i diversi criteri nazionali (dove presenti) o comunque quelli utilizzati nei diversi Paesi. In Italia, nei laboratori afferenti alla sorveglianza AR-ISS, vengono al momento utilizzate le linee guida CLSI alle quali ci si è riferiti anche in questo rapporto. L'utilizzo di un unico standard europeo permetterà una più precisa comparabilità dei dati e una maggiore qualità della sorveglianza europea.

È nostro proposito continuare nella via intrapresa e con l'aiuto e il coinvolgimento dei laboratori partecipanti migliorare la rappresentatività e la qualità della sorveglianza nazionale.

BIBLIOGRAFIA

1. Consiglio dell'Unione Europea. Una strategia contro la minaccia microbica. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* C 195/1 del 13/7/1999. Disponibile all'indirizzo: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/it/oj/1999/c_195/c_19519990713it00010003.pdf; ultima consultazione 13/10/2010.
2. Moro ML, Pantosti A, Boccia D. Antibiotic microbial resistance surveillance in invasive infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*: the EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) project in Italy (April 1999-April 2000). *Ann Ig* 2002;14(5):361-71.
3. Boccia D, D'Ancona F, Salmaso S, Monaco M, Del Grosso M, D'Ambrosio F, et al. Antibiotic-resistance in Italy: activity of the first year of the surveillance project AR-ISS. *Ann Ig* 2005;17(2):95-110.
4. Bronzwaer SL, Goettsch W, Olsson-Liljequist B, Wale MC, Vatopoulos AC, Sprenger MJ. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS): objectives and organisation. *Euro Surveill* 1999;4(4):41-4.
5. Alfonsi V, Monaco M, D'Ancona F, Ciofi Degli Atti ML, Pantosti A, e il gruppo di lavoro AR-ISS. *AR-ISS: sistema di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza basato su laboratori sentinella (2003-2005)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/53).
6. Pantosti A, Del Grosso M, (Ed.). *Giornata europea degli antibiotici: uso responsabile per il controllo dell'antibiotico-resistenza*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009 (Rapporti ISTISAN 09/32).
7. Salmaso S, Mastrantonio P, Stefanelli P, Sofia T, Caporali MG. Meningiti batteriche in Italia (sorveglianze nazionali). *Ben-Notiziario ISS* 2001;14(2):2-4.
8. World Health Organization. WHONET Software. WHO 2008. Disponibile all'indirizzo: <http://www.who.int/drugresistance/whonetsoftware/en/>; ultimo consultazione 13/10/2010.
9. Kirby WMM. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. *Science* 1999; 452-453.
10. Feng Y, Chen CJ, Su LH, Hu S, Yu J, Chiu CH. Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32(1):23-37.
11. Chambers HF. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Mechanisms of resistance and implications for treatment. *Postgrad Med* 2001;109(2 Suppl):43-50.
12. Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerg Infect Dis* 2003;9(8):978-84.
13. Zetola N, Francis JS, Nuermberger EL, Bishai WR. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2005;5(5):275-86.
14. Monaco M, Sanchini A, Grundmann H, Pantosti A. Vancomycin-heteroresistant phenotype in invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates belonging to spa type 041. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29(7):771-7.
15. Bogaert D, Engelen MN, Timmers-Reker AJ, Elzenaar KP, Peerbooms PG, Coutinho RA, et al. Pneumococcal carriage in children in The Netherlands: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3316-20.

16. Yeh SH, Zangwill KM, Lee H, Chang SJ, Wong VI, Greenberg DP, *et al.* Heptavalent pneumococcal vaccine conjugated to outer membrane protein of *Neisseria meningitidis* serogroup b and nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants. *Vaccine* 2003;21(19-20):2627-31.
17. ISS. Sorveglianza nazionale sulle malattie batteriche invasive- Sistema Informatizzato Malattie Infettive (SIMI). Istituto Superiore di Sanità 2009. Disponibile all'indirizzo: http://www.simi.iss.it/meningite_batterica.htm; ultima consultazione 13/10/2010.
18. Hausdorff WP, Dagan R, Beckers F, Schuerman L. Estimating the direct impact of new conjugate vaccines against invasive pneumococcal disease. *Vaccine* 2009;27(52):7257-69.
19. Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. *J Clin Microbiol* 2010;48(4):1019-25.
20. Rossolini GM, Mantengoli E, Docquier JD, Musmanno RA, Coratza G. Epidemiology of infections caused by multiresistant gram-negatives: ESBLs, MBLs, panresistant strains. *New Microbiol* 2007;30(3):332-9.
21. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, *et al.* Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(2):112-22.
22. World Health Organization. *Antimicrobial resistance*. Fact sheet n. 194; 2002.
23. Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999;29(2):239-44.
24. Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev* 1993;6(4):428-42.
25. Aires de Sousa M, De Lencastre H. Bridges from hospitals to the laboratory: genetic portraits of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004;40(2):101-11.
26. European Antimicrobial Resistance Surveillance System. *EARSS Annual report 2008*. Bilthoven: EARSS; 2009. Disponibile all'indirizzo: http://www.rivm.nl/earss/Images/EARSS%202008_final_tcm61-65020.pdf; ultima consultazione 13/10/2010.
27. Perichon B, Courvalin P. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(11):4580-7.
28. Clinical and Laboratory Standard Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteen informational supplement*. Wayne, PA: CLSI; 2008. (CLSI Document M 100-S18).
29. Bozdogan B, Ednie L, Credito K, Kosowska K, Appelbaum PC. Derivatives of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at Hershey Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(12):4762-5.
30. Shopsis B, Gomez M, Montgomery SO, Smith DH, Waddington M, Dodge DE, *et al.* Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J Clin Microbiol* 1999;37(11):3556-63.
31. Cassone M, Campanile F, Pantosti A, Venditti M, Stefani S. Identification of a variant "Rome clone" of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with decreased susceptibility to vancomycin, responsible for an outbreak in an intensive care unit. *Microb Drug Resist* 2004;10(1):43-9.
32. Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. *J Clin Microbiol* 2000;38(2):866-9.
33. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, *et al.* Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997;350(9092):1670-3.

34. Tinelli M, Monaco M, Vimercati M, Ceraminiello A, Pantosti A. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in skin and soft tissue infections, Northern Italy. *Emerg Infect Dis* 2009;15(2):250-7.
35. Lina G, Boutite F, Tristan A, Bes M, Etienne J, Vandenesch F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal *agr* alleles. *Appl Environ Microbiol* 2003;69(1):18-23.
36. Oliveira DC, de LH. Multiplex PCR strategy for rapid identification of structural types and variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(7):2155-61.
37. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2005;43(10):5026-33.
38. Oliveira DC, Milheirico C, Vinga S, de LH. Assessment of allelic variation in the *ccrAB* locus in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones. *J Antimicrob Chemother* 2006;58(1):23-30.
39. Harmsen D, Claus H, Witte W, Rothganger J, Claus H, Turnwald D, *et al.* Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for *spa* repeat determination and database management. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5442-8.
40. Enright MC, Day NP, Davies CE, Peacock SJ, Spratt BG. Multilocus sequence typing for characterization of methicillin-resistant and methicillin-susceptible clones of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1008-15.
41. Grundmann H, Aanensen DM, van den Wijngaard CC, Spratt BG, Harmsen D, Friedrich AW. Geographic distribution of *Staphylococcus aureus* causing invasive infections in Europe: a molecular-epidemiological analysis. *PLoS Med* 2010;7(1):e1000215.
42. Valentini P, Parisi G, Monaco M, Crea F, Spanu T, Ranno O, *et al.* An uncommon presentation for a severe invasive infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone USA300 in Italy: a case report. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008;7:11.
43. Gruppo di lavoro ICONA. *ICONA 2008: Indagine di COpertura vaccinale NAzionale nei bambini e negli adolescenti*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2009. (Rapporti ISTISAN 09/29).
44. Camilli R, D'Ambrosio F, Pantosti A. *Come è cambiata l'epidemiologia delle infezioni da pneumococco con l'introduzione del vaccino pediatrico?* Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica RIAP 18-24. 2009.
45. Gherardi G, Fallico L, Del Grosso M, Bonanni F, D'Ambrosio F, Manganelli R, *et al.* Antibiotic-resistant invasive pneumococcal clones in Italy. *J Clin Microbiol* 2007;45(2):306-12.
46. Tenover FC, Baker CN, Swenson JM. Evaluation of commercial methods for determining antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 1996;34(1):10-4.
47. Clinical and Laboratory Standard Institute. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eighteen informational supplement*. Wayne, PA: CLSI; 2005. (CLSI Document M 100-S15).
48. Gherardi G, Whitney CG, Facklam RR, Beall B. Major related sets of antibiotic-resistant pneumococci in the United States as determined by pulsed-field gel electrophoresis and *pbp1a-pbp2b-pbp2x-dhf* restriction profiles. *J Infect Dis* 2000;181(1):216-29.
49. Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, Dib-Hajj F, Wondrack L, Yuan W, *et al.* *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(10):2251-5.
50. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(11):2562-6.
51. Monaco M, Camilli R, D'Ambrosio F, Del Grosso M, Pantosti A. Evolution of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2005;55(2):256-9.

52. Lalitha MK, Thomas K, Kumar RS, Steinhoff MC. Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* by coagglutination with 12 pooled antisera. *J Clin Microbiol* 1999;37(1):263-5.
53. Gherardi G, D'Ambrosio F, Monaco M, Camilli R, De Florio L, D'Ancona F, *et al.* Population structure of invasive *Streptococcus pneumoniae* isolates in Italy prior to the implementation of the 7-valent conjugate vaccine (1999-2003). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28(1):99-103.
54. Dicuonzo G, Gherardi G, Gertz RE, D'Ambrosio F, Goglio A, Lorino G, *et al.* Genotypes of invasive pneumococcal isolates recently recovered from Italian patients. *J Clin Microbiol* 2002;40(10):3660-5.
55. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, *et al.* Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
56. Enright MC, Spratt BG. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. *Microbiology* 1998;144 (Pt 11):3049-60.
57. PMEN. Pneumococcal Molecular Epidemiology Network. Hubert Department of Global Health, Rollins School of Public Health, Emory University 2006. Disponibile all'indirizzo: http://www.sph.emory.edu/PMEN/pmen_clone_collection.html; ultima consultazione 13/10/2010.
58. McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, *et al.* Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001;39(7):2565-71.
59. Brueggemann AB, Pai R, Crook DW, Beall B. Vaccine escape recombinants emerge after pneumococcal vaccination in the United States. *PLoS Pathog* 2007;3(11):e168.
60. Leclercq R. Epidemiological and resistance issues in multidrug-resistant staphylococci and enterococci. *Clin Microbiol Infect* 2009;15(3):224-31.
61. Tenover FC, McDonald LC. Vancomycin-resistant staphylococci and enterococci: epidemiology and control. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18(4):300-5.
62. Stampone L, Del Grosso M, Boccia D, Pantosti A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. *J Clin Microbiol* 2005;43(4):1575-80.
63. Courvalin P. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin Infect Dis* 2006;42 Suppl 1:S25-S34.
64. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 1995;33(5):1434.
65. Arthur M, Depardieu F, Molinas C, Reynolds P, Courvalin P. The *vanZ* gene of *Tn1546* from *Enterococcus faecium* BM4147 confers resistance to teicoplanin. *Gene* 1995;154(1):87-92.
66. Lauderdale TL, McDonald LC, Shiau YR, Chen PC, Wang HY, Lai JF, *et al.* Vancomycin-resistant enterococci from humans and retail chickens in Taiwan with unique VanB phenotype-*vanA* genotype incongruence. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(2):525-7.

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN
deve essere preventivamente autorizzata.
Le richieste possono essere inviate a: pubblicazioni@iss.it.*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

Roma, ottobre-dicembre 2010 (n. 4) 8° Suppl.