

Identificazione e resistenza agli antibiotici di ceppi ben caratterizzati analizzati in laboratori liguri

Marina Casini Lemmi¹, Giovanna Dho³, Graziana Manno², Anna Marchese³, Eugenio A Debbia³ per AMCLI LIGURIA

¹Laboratorio Analisi, Ospedali Galliera

²Laboratorio Ricerca e Diagnostica Infettivologica Dipartimento di Pediatria, Istituto G. Gaslini,

³Sez. Microbiologia DISCAT, Università di Genova.

Identification and resistance to antibiotics of well-characterized strains analyzed in Ligurian laboratories

Key words: Antibiotic-resistance, quality control, well-characterized strains

SUMMARY

During the year 2002, 19 Clinical Microbiology Laboratories including 3 private centres, distributed in Ligurian and 2 in South Piemonte area have studied 26 strains carrying well-characterized antibiotic-resistant traits. Only 7 laboratories analysed the complete collection of 26 isolates and 12 sites studied at least 20 strains. Overall 85.4% of the microorganism identifications and 82.8% of the antibiotic susceptibility tests were correct. Gram-negative bacteria were more easily identified than the Gram-positive counterpart being *E. faecium* the most difficult pathogen to identify. Discrepancies were also observed with the antibiotic susceptibility tests. A significant number of tests, 22.6% of the identifications and 29.9% of the antibiotic susceptibility determinations were not carried out due to local economic and structural problems. Many of the pathogens are rarely encountered by Clinical Microbiology laboratories and sometime are difficult to detect, however, a large number of the centres was able to identify correctly these particular pathogens and their antibiotypes.

INTRODUZIONE

L'insorgenza di microrganismi resistenti agli antibiotici è un fenomeno che ha assunto dimensioni mondiali pur non coinvolgendo in eguale misura tutte le specie batteriche e le diverse classi di agenti antimicrobici (6, 9, 12, 22, 23, 29).

Usualmente l'incidenza con cui vengono isolati germi resistenti è dipendente dalla pressione selettiva esercitata qualitativamente e quantitativamente dagli antibiotici. A causa delle diverse abitudini terapeutiche delle comunità mediche l'impiego dei farmaci antimicrobici è variabile non solo da Paese a Paese ma anche da zona a zona nell'ambito della stessa Nazione. Poiché l'insensibilità *in vitro* ad un antibiotico può correlare con un possibile fallimento terapeutico (1), si promuovono periodicamente indagini multicentriche nazionali e internazionali con lo scopo di acquisire una corretta informazione sulla diffusione delle resistenze agli antibiotici (10, 11, 21, 23, 27, 28, 29). Il laboratorio di Microbiologia Clinica spesso oberato da un pesante lavoro routinario, deve garantire la perfetta esecuzione dell'esame batteriologico attraverso continui aggiornamenti della letteratura referenziata e mediante l'inserimento nei saggi di routine di ceppi per i controlli di qualità (11, 20); infatti l'esame

batteriologico deve prevedere, specie in ambiente nosocomiale, l'accertamento delle resistenze agli antibiotici sui ceppi isolati, con particolare attenzione a quei caratteri di insensibilità non sempre chiaramente evidenti nei saggi routinari, ma spesso più temibili poiché se non identificati potrebbero portare ad un fallimento terapeutico (21, 27, 28).

Questo studio riporta i risultati di una indagine condotta durante il periodo giugno-settembre 2002, dal Gruppo Scientifico della Sezione Ligure dell'AMCLI volta ad accertare la "proficiency" di laboratorio di microbiologia a livello regionale. Lo studio è stato indirizzato ad accertare, in prima istanza la corretta identificazione a livello di specie di patogeni Gram positivi e Gram negativi e, in secondo luogo, la corretta rivelazione dei fenotipi di resistenza in ceppi ben caratterizzati veicolanti vari tipi e livelli di resistenza agli agenti antibatterici. Ad ogni centro che ha aderito all'iniziativa è stata inviata da parte del laboratorio di riferimento una collezione di ceppi con caratteristiche note. Inoltre sono stati forniti una serie di stipti ATCC per il controllo interno di qualità. Ad ogni laboratorio è stato richiesto di identificare i microrganismi ed evidenziare le eventuali resistenze ai farmaci antimicrobici seguendo le metodiche abitualmente in uso presso

il centro. I risultati sono stati inviati al laboratorio di riferimento ove il Gruppo di Studio promotore dell'indagine li ha esaminati.

MATERIALI E METODI

Centri Partecipanti allo studio

24 Laboratori di Microbiologia Clinica hanno aderito all'iniziativa proposta; l'elenco è riportato nella tabella 1. I centri che non hanno inviato i

risultati sono stati esclusi dallo studio.

Microrganismi

In questo studio sono stati utilizzati ceppi appartenenti alla collezione dell'Istituto di Microbiologia dell'Università di Genova, le cui caratteristiche e origine sono riassunte nella tabella 2. I ceppi conservati in glicerolo a -80°C sono stati seminati su agar nutriente, incubati 24-

Tabella 1. Elenco dei centri e dei partecipanti allo studio

LOCALITÀ	LABORATORIO	PARTECIPANTI
Genova- Rivarolo	Ospedale Celesta	Caprifoglio C.
Genova	Istituto G. Gaslini,	Barretta M.A., Pescetto L., Bandettini R.
Ovada (AL)	Ospedale di Ovada ASL 22	Mazzarello M. G., Torriglia A. M., Ferrari M.
Genova	Ospedale Evangelico	Intra E., Serra D.
Genova	DiSCAT, Sezione di Microbiologia	Balistreri M.
Genova	Istituto G. Gaslini Malattie Infettive	Manno G.
Tortona (AL)	Ospedale di Tortona ASL 20	Salerno A.
Genova -Voltri	Ospedale S. Carlo	Illiberi O., Galleano A.
La Spezia	Ospedale di La Spezia	Fregoso F.
Genova	Ospedale Galliera	Casini-Lemmi M., Usiglio D.
Sarzana (SP)	Ospedale S. Bartolomeo	Battola E., Benini G.
Genova-Sampierdarena	Ospedale Villa Scassi	Capuzzo R., Riva R., Carcheri M.
Savona	Ospedale S.Paolo	Bona R.
Imperia	Ospedale di Imperia	Diotto I.
Pietra L. (SV)	Ospedale S.Corona	Santoriello L.
SanRemo (IM)	Ospedale di Sanremo,Asl I Imperiese	Vassallo M., Dusi P.A.
Genova	Lab srl	Aytano P.
Genova	Laboratorio-Albaro Spa	Bonanni R., Clavarezza M.A.
San Remo (IM)	Laboratorio Dini-Scardi	Bertolini C.

Tabella 2. Elenco dei ceppi inviati ai vari centri e caratteristiche di resistenza principali

Ceppo	Caratteristiche	Origine (referenze)
1	<i>S. aureus mecA</i> costitutivo	Chung et al., 2000 (5)
2	<i>S. aureus mecA</i> inducibile	Chung et al., 2000 (5)
3	<i>S. aureus</i> penicillasi+	Marchese et al., 1995 (16)
4	<i>S. haemolyticus</i> teiR	Marchese et al., 1997 (15)
5	<i>E. faecalis</i> VanA	Boisivon et al., 1997 (2)
6	<i>E. faecium</i> VanB	Boisivon et al., 1997 (2)
7	<i>E. gallinarum</i> VanC	Boisivon et al., 1997 (2)
8	<i>E. faecalis</i> amgR	Schito et al., 1990 (24)
9	<i>E. faecium</i> ampR	Marchese et al., 1997 (15)
10	<i>S. pneumoniae</i> penS	Marchese et al., 2000 (18)
11	<i>S. pneumoniae</i> penI	Marchese et al., 2000 (18)
12	<i>S. pneumoniae</i> penR	Marchese et al., 2000 (18)
13	<i>S. pneumoniae</i> eriR costitutivo	Marchese et al., 1999 (19)
14	<i>S. pneumoniae</i> eriR fenotipo M	Marchese et al., 1999 (19)
15	<i>S. pneumoniae</i> eriR inducibile	Marchese et al., 1999 (19)
16	<i>S. pneumoniae</i> eriS	Marchese et al., 1999 (19)
17	<i>S. pyogenes</i> eriS	Chelossi et al., 1997 e 1998 (3,4)
18	<i>S. pyogenes</i> eriR costitutivo	Chelossi et al., 1997 e 1998 (3,4)
19	<i>S. pyogenes</i> eriR fenotipo M	Chelossi et al., 1997 e 1998 (3,4)
20	<i>S. pyogenes</i> eriR inducibile	Chelossi et al., 1997 e 1998 (3,4)
21	<i>E. coli</i> ESBL	Marchese et al., 1996 (17)
22	<i>E. coli</i> cipR	Livermore et al., 2002 (13)
23	<i>E. coli</i> ampR	Questo studio
24	<i>E. coli</i> IRT	Livermore et al., 2002 (13)
25	<i>P. aeruginosa</i> imiR	Questo studio
26	<i>Salmonella</i> spp ESBL	Livermore et al., 2002 (13)

mec, meticillina; *tei*, teicoplanina; *van*, vancomicina; *amg*, aminoglicoside; *amp*, ampicillina; *pen*, penicillina; *eri*, eritromicina; ESBL, *b*-lattamasi a spettro esteso; *cip*, ciprofloxacina; IRT, *b*-lattamasi resistente agli inibitori suicidi; *imi*, imipenem.

48 h a 35°C e quindi inseriti in tamponi con terreno di trasporto e inviati ai singoli centri. Ceppi di QC interno forniti: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, per i saggi includenti un β -lattamico e un inibitore di β -lattamasi, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 per le prove di diffusione da dischetto, *S. aureus* ATCC29213 per la valutazione delle MIC e *S. aureus* ATCC43300 come ceppo oxacillino-resistente (OXA-R), *E. faecalis* ATCC 29212 e *E. faecalis* ATCC 51299, per i saggi che includono il saggio rispettivamente della sensibilità e della resistenza agli aminoglicosidi e alla vancomicina, *S. pneumoniae* ATCC49619, *H. influenzae* ATCC 49247 e *H. influenzae* ATCC49766 per i saggi che includono i β -lattamici (20).

Metodologie di riferimento proposte per la caratterizzazione dei fenotipi di resistenza.

Sono di seguito riportate le metodologie utilizzate per la caratterizzazione dei fenotipi di resistenza. Queste sono state applicate dal Centro di riferimento e proposte ai Centri partecipanti.

Saggi di sensibilità agli antibiotici. Le minime concentrazioni inibenti (MIC) sono state determinate con il metodo della microdiluizione in brodo Mueller Hinton (MH) contenente Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ o mediante sistema E test. Il metodo Kirby-Bauer della diffusione da dischetto è stato utilizzato in alcuni saggi in parallelo alla valutazione della MIC per confermare ulteriormente il fenotipo di resistenza. I saggi sono stati condotti e interpretati seguendo le linee guida suggerite dal National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002 (20).

β -lattamasi in *S. aureus*. La β -lattamasi (penicillinasi) in *S. aureus* è stata individuata mediante saggio della cefalosporina cromogena nitrocefina. È stato inoltre utilizzato il metodo della diffusione su agar impiegando dischetti di penicillina (P) e amoxicillina-clavulanato (AUG), il ceppo evidenzia resistenza al capostipite dei β -lattamici (P) e sensibilità all'associazione con l'inibitore dell'enzima (AUG). Il microrganismo presenta inoltre resistenza alla penicillina (P) e sensibilità all'oxacillina (OXA-S).

Oxacillino-resistenza in *S. aureus*.

L'oxacillino-resistenza (OXA-R) inducibile (I) o costitutiva (C) in *S. aureus* è stata messa in evidenza utilizzando il saggio dell'agar screening su piastre di Mueller-Hinton agar con 6 mg/L di oxacillina in duplicato, con e senza il 4% di NaCl e un inoculo di 5x10⁵ CFU per spot. La lettura è stata eseguita dopo 24 ore di incubazione. I ceppi sono stati mantenuti ad una temperatura non superiore ai 35.5°C. In queste condizioni il ceppo inducibile è risultato sensibile al farmaco sul terreno privo di sale, mentre lo stipite costitutivo ha

manifestato resistenza all'oxacillina su entrambi i terreni. *S. epidermidis* OXA-R, aggiunto come controllo in questi saggi, ma non incluso nello studio, è stato valutato mediante Kirby-Bauer con dischetto di oxacillina (1 μ g) su terreno MH non contenente NaCl. Come è noto gli stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) non si saggiano per questo carattere su terreno contenente sale. I breakpoint per CNS adottati sono stati S \geq 18 mm e R \leq 17 mm. Lo stesso saggio con tecnica di Kirby-Bauer su MH privo di NaCl è stato utilizzato anche per *S. aureus*. In questo caso i breakpoint sono stati S \geq 13 mm e R \leq 10 mm (20).

Teicoplanino-resistenza in *S. haemolyticus*.

S. haemolyticus resistente alla teicoplanina è stato identificato mediante Kirby-Bauer e successiva determinazione della minima concentrazione inibente adottando la tecnica della microdiluizione in brodo (20). Il saggio è stato letto dopo 24 ore di incubazione a 35.5°C.

Resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi. Per l'accertamento della refrattarietà ai glicopeptidi è stato inizialmente utilizzato il metodo Kirby-Bauer o lo screening su agar contenente 6mg/L di vancomicina e un inoculo di 5x10⁵ CFU per spot. I fenotipi *vanA*, *vanB* e *vanC* sono stati distinti e confermati con la valutazione della MIC a teicoplanina e vancomicina mediante la tecnica della microdiluizione o E test (20). *E. faecalis vanA* risulta resistente a teicoplanina e vancomicina. *E. faecalis vanB* mostra sensibilità a teicoplanina e resistenza a vancomicina. *vanC* in *E. gallinarum* è sensibile a teicoplanina e resistente a basso livello (MIC = 8-32 mg/L) a vancomicina. Il test è stato letto dopo 24 ore di incubazione a 35.5°C.

Alto livello di resistenza agli aminoglicosidi negli enterococchi. L'alto livello di resistenza agli aminoglicosidi negli enterococchi è stato valutato in piastre di BHIA contenenti 500 mg/L di gentamicina (gen) o 2000 mg/L di streptomina (str). Per il controllo di qualità di questo test è stato impiegato *E. faecalis* ATCC 29212. Sono stati utilizzati inoculi di 10⁶ CFU per spot. Dopo incubazione per 24 ore in aerobiosi le piastre sono state esaminate, la presenza di una o più colonie o un alone di crescita è stato considerato indice di resistenza. Quando il saggio con la streptomina è risultato negativo la piastra è stata incubata nuovamente per altre 24 ore. In alternativa la resistenza agli aminoglicosidi è stata identificata con le apposite strisce di E test.

Ampicillina-resistenza in *E. faecium*.

L'insensibilità all'ampicillina in *E. faecium* è stata determinata mediante Kirby-Bauer e successiva conferma mediante valutazione della MIC in micrometodo.

Penicillino resistenza in *Streptococcus pneumoniae*. È stato utilizzato il dischetto di

oxacillina 1µg, con i limiti $S \geq 20$ mm e $R \leq 19$ mm, per i microorganismi resistenti R, è stata valutata la MIC con E test o con il metodo della microdiluizione (20). I valori delle MIC indicano Sensibile, $S \leq 0.06$, Intermedio, $I = 0.12-1$, Resistente, $R \geq 1$ mg/L. Per i macrolidi è stato utilizzato il metodo Kirby-Bauer con dischetto di eritromicina 15µg. Quando il ceppo è risultato resistente sono stati valutati i tre principali fenotipi Ery-R di *S. pneumoniae*. La tecnica utilizzata è stata quella del doppio disco. Sulla superficie di una piastra di Mueller-Hinton agar al 5% di sangue di montone sono stati posizionati due dischetti (eritromicina [eri] 15µg e clindamicina [cli] 2µg) ad una distanza di 1.5-2 cm. Dopo incubazione per 24 ore l'assenza di una zona di inibizione la crescita attorno ad entrambi i dischi è stata interpretata come espressione del fenotipo C, mentre un alone di inibizione intorno al dischetto di clindamicina ha indicato il fenotipo M. Infine il fenotipo inducibile è stato rivelato dalla deformazione dell'alone di inibizione intorno al dischetto di clindamicina nella zona adiacente a quello di eritromicina (25, 26).

Eritromicino-resistenza in *Streptococcus pyogenes*. I tre principali fenotipi eriR di *Streptococcus pyogenes* sono stati identificati mediante tecnica del doppio disco come per *S. pneumoniae*.

Produzione di ESBL in *E. coli* e in *Salmonella* spp. La produzione di ESBL in *E. coli* è stata valutata mediante Kirby-Bauer. Quando gli aloni di inibizione sono risultati come segue ceftazidime ≤ 22 , aztreonam ≤ 27 , cefotaxime ≤ 27 e ceftriaxone ≤ 25 , è stato utilizzato E test impiegando le apposite strisce per la valutazione di questo enzima (20). In alternativa l'antibiogramma è stato ripetuto posizionando il dischetto di amoxicillina-clavulanato per 2 ore a temperatura ambiente, quindi il dischetto è stato tolto sostituendolo con quello della cefalosporina. La presenza di ESBL veniva rivelata dall'aumento dell'alone di inibizione in quest'ultimo saggio rispetto a quello eseguito con la cefalosporina da sola.

Fenotipi di ampicillino-resistenza in *E. coli*. Il ceppo di *E. coli* ampR è un isolato clinico caratterizzato fenotipicamente con il metodo Kirby-Bauer sulla base della sola resistenza all'ampicillina e sensibilità all'amoxicillina-clavulanato. Il ceppo IRT, anch'esso valutato fenotipicamente con il metodo della diffusione da dischetto, ha dimostrato resistenza sia all'ampicillina sia all'amoxicillina-clavulanato, tutti gli altri fenotipi di sensibilità o resistenza sono stati valutati sempre mediante antibiogramma.

Resistenza all'imipenem in *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* imiR è un ceppo di isolamento clinico identificato fenotipicamente con il metodo Kirby-Bauer sulla base della resistenza all'imipenem.

Metodiche utilizzate dai centri partecipanti allo studio per l'identificazione delle specie batteriche e dei loro fenotipi di resistenza.

I laboratori che hanno aderito allo studio sono stati invitati ad utilizzare le metodiche e la strumentazione abituale. Ogni centro ha successivamente specificato le metodologie usate contestualmente al risultato del test.

Interpretazione dei risultati ottenuti dai centri partecipanti.

Per i test di sensibilità agli antibiotici sono stati considerati corretti i risultati che concordavano con quelli del centro di riferimento. I risultati non corretti sono stati classificati come segue, sulla base della rilevanza sulla clinica: Errore Maggiore Grave (EMG): ceppo resistente riportato come sensibile; Errore Maggiore (EM): ceppo sensibile riportato come resistente; Errore Minore (EMi): i) ceppo resistente o sensibile riportato come intermedio, ii) ceppo intermedio riportato come sensibile o resistente.

RISULTATI

Nella tabella 3 sono riassunte le varie fasi dello studio intrapreso. I centri reclutati sono stati inizialmente 24, scesi a 19 per il ritiro di cinque laboratori. Non tutti i centri partecipanti hanno analizzato l'intera collezione, infatti una quota di 112 microrganismi (22.6%) risulta esclusa dall'indagine. Per quanto riguarda la valutazione della sensibilità agli antibiotici i saggi sono stati eseguiti sul 56.8% degli stipiti inviati per un totale complessivo di 281; 148 saggi (29.9%) non sono stati eseguiti Metodiche e strumentazioni utilizzate dai centri partecipanti.

Nel considerare le metodiche utilizzate dai vari centri (tabella 4), è stato osservato che il metodo semiautomatico API/ATB è stato adottato da 9 centri (47.4%), Vitek 5 (26.3%), Sceptor 3 (15.8%), e Microscan 2 (10.5%). La sensibilità agli antibiotici è stata saggiata con più metodiche oltre a quelle già segnalate per le prove di identificazione. In particolare, 5 sedi hanno utilizzato il metodo di Kirby-Bauer, 4 hanno condotto le sperimentazioni con Vitek e altrettanti con ATP/API, mentre lo Sceptor è stato impiegato da 3 centri, 2 laboratori hanno preferito il sistema Microscan ed un altro il Sensititre.

Solo 4 centri hanno citato l'uso abituale di Agar screen per l'oxacillina negli stafilococchi, l'agar screen per la vancomicina negli Enterococchi e il test del doppio disco o l'Ettest per la rivelazione delle ESBL nelle *Enterobacteriaceae*.

Tabella 3. Riassunto Centri Partecipanti e Ceppi analizzati

	Numero	%*
Centri reclutati	24	-
Centri partecipanti	19	-
Ceppi inviati ad ogni Centro	26	-
Totale ceppi inviati	494	-
Identificazioni eseguite	382	77.3
Identificazioni corrette	326	65.9
Identificazioni errate	56	11.3
Identificazioni non eseguite	112	22.6
Saggi di sensibilità agli antibiotici eseguiti	346	70.0
Saggi di sensibilità agli antibiotici corretti	284	57.5
Saggi di sensibilità agli antibiotici errati	62	12.55
Saggi di sensibilità agli antibiotici non eseguiti	148	29.9

** Riferita ai 494 ceppi ricevuti in totale dai centri

Identificazione batterica. In generale (tabella 5) è stato osservato che il metodo ATB/API e Microscan manifestano in percentuale d'errore valori molto simili (17.3 e 18.9%), mentre i sistemi Vitek e Sceptor si attestano rispettivamente al 11.9 e 9.4%. Considerando le varie specie la percentuale di identificazione corretta è risultata variabile in funzione dei patogeni considerati, tali valori sono stati calcolati sul numero di saggi effettivamente eseguiti e, precisamente corretti più errati, escludendo dal conteggio le prove non effettuate. In particolare, per quanto riguarda gli stafilococchi, i livelli di identificazione espressi in percentuale sono oscillati tra il 67.7% di *S. aureus mecA* con fenotipo inducibile al 100% registrato con lo stesso microrganismo con fenotipo costitutivo, gli altri due isolati sono stati identificati con un'incidenza di circa 82%. Gli enterococchi sono stati quelli che hanno presentato le maggiori problematiche di identificazione per tutti i centri. *E. faecium*, infatti, è stato ritrovato solo nel 7.1% dei casi, con *E. gallinarum* e *E. faecium vanB* riconosciuti rispettivamente dal 40% e dal 62.5% dei laboratori mentre *E. faecalis* con fenotipo amgR e *vanA* sono stati identificati nell'ordine da 80 e 87.5% delle sedi.

S. pneumoniae, indipendentemente dal fenotipo di resistenza agli antibiotici posseduto, è stato correttamente identificato dall'84 al 100% dei casi. Questi patogeni sono stati tuttavia quelli saggiati in minor misura rispetto agli altri infatti su 133 isolati da esaminare solo 88 (66.1%) sono entrati nello studio. *S. pyogenes* è stato identificato dal 91.6 al 100% delle prove eseguite su tutti i fenotipi di resistenza. *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Salmonella* spp sono stati riconosciuti con incidenze comprese tra 87.5% (*E. coli* ESBL) a 100% *E. coli* (cipR), *P. aeruginosa* (imiR) e *Salmonella* spp delle prove eseguite. Globalmente su 382 identificazioni effettuate 326 (85.4%) sono risultate corrette.

Prove di Sensibilità. La tabella 6 riassume i risultati ottenuti sui diversi microrganismi. Da notare, solo 7 Laboratori (36.8%) hanno esaminato l'intera collezione, 4 centri (21%) hanno eseguito i test sulla metà dei ceppi inviati. Globalmente i saggi non eseguiti variano in percentuale dal 10.5% (*S. aureus mecA* I e penR) al 42% (*S. pneumoniae* penR e eriS). Per quanto riguarda il tipo di errore, il 63% di *E. coli* IRT, 48% di *S. haemolyticus* TeiR, 47% di *E. coli* ESBL sono stati errati completamente (EMG). Rientrano nella stessa categoria di prova non corretta *E. faecium* ampR (42%), *E. faecalis* VanA (37%) e in minor misura gli altri isolati (tabella 6). Errore grave (EM) è stato ritrovato con *S. haemolyticus* teiR(26%), *E. faecalis* amgR (21%); *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* eriS (5%). Saggi non corretti ma di categoria Emi hanno coinvolto *S. pneumoniae* penS e penI (21%), *E. gallinarum* VanC, *S. pneumoniae* penR, e *S. pyogenes* eriR e con minor incidenza gli altri ceppi.

Per quanto concerne la valutazione della sensibilità agli antibiotici riferita al sistema adottato (tabella 7), le percentuali di errore sono oscillate tra 11.9 di ATB/API e 28.1% di Microscan, mentre sulle 346 prove di sensibilità eseguite l'errore è stato 17.9%. Prendendo in esame gli stafilococchi, le maggiori difficoltà sono state registrate con i ceppi produttori di penicillinasi, quelli resistenti alla tecoplanina e i meticillino-resistenti con fenotipo inducibile che hanno dimostrato valori di riconoscimento dell'insensibilità di 47.0, 53.3 e 58.8% rispettivamente. Più alta è stata la frequenza con la quale è stato identificato il fenotipo *mecA* costitutivo fissata a 81.2% delle valutazioni totali. Negli enterococchi l'ampicillino-resistenza è stata ritrovata solo nel 42.8% dei casi, gli altri caratteri di resistenza sono stati accertati con incidenza dal 84.6% (*vanC*) al 100% (*vanB*). I diversi fenotipi di insensibilità alla penicillina e all'eritromicina in *S. pneumoniae* sono stati individuati con frequenze comprese tra 60% di PEN-S al 92.3% di eriR M, anche in questo caso il numero dei ceppi saggiati è stato di 82 (61.6%) un valore piuttosto ridotto rispetto al numero di ceppi inviati (133). Considerando *S. pyogenes* tutti i caratteri di resistenza sono stati trovati con incidenze variabili tra 78.6 (eriR C) e 92.3 (eriR M). Tutti i fenotipi di refrattarietà dei Gram-negativi e cioè ESBL, IRT, ampR, cipR e imiR sono stati tutti accertati correttamente (100%) con l'eccezione di ESBL in *Salmonella* spp. riconosciuta solo nel 69.2% dei saggi. In totale l'accertamento corretto delle resistenze nei ceppi studiati è stato del 82.8%.

Tabella 4. Metodi utilizzati dai Centri per l'identificazione e per i saggi di sensibilità agli antibiotici dei 494 ceppi inviati

Metodo di identificazione	IDENTIFICAZIONE DEI CEPPI (N.)				SAGGI DI SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI (N.)			
	Centri (%)	Corrette	Errate	Non eseguite	Centri (%)	Corretti	Errati	Non eseguiti
ATB/API	9 (47.4)	148	31	69	4 (21.1)	59	8	37
Vitek	5 (26.3)	81	11	17	4 (21.1)	67	14	24
Sceptor	3 (15.8)	67	7	7	3 (15.8)	54	16	7
Microscan	2 (10.5)	30	7	19	2 (10.5)	23	9	20
Kirby-Bauer	-	-	-	-	5 (26.3)	59	11	60
Sensititre	-	-	-	-	1 (5.2)	22	4	0
TOTALE	19	326	56	112	19	284	62	148

Tabella 5. Metodi utilizzati per l'identificazione della specie batterica.

	ATB/API		MICROSCAN		SCEPTOR		VITEK		TOTALE			
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	n.e.	%C
1 <i>S. aureus</i> mecA C	9	-	2	-	3	-	4	-	18	-	1	100.0
2 <i>S. aureus</i> mecA I	5	4	-	1	3	-	3	1	11	6	2	67.7
3 <i>S. aureus</i> Penicillasi+	8	1	-	1	2	1	4	-	14	3	2	82.3
4 <i>S. haemolyticus</i> tei R	9	-	-	1	2	1	2	1	13	3	3	81.2
5 <i>E. faecalis</i> VanA	7	1	1	1	3	-	3	-	14	2	3	87.5
6 <i>E. faecium</i> VanB	4	5	1	-	2	-	3	1	10	6	3	62.5
7 <i>E. gallinarum</i> VanC	2	6	-	1	3	-	1	2	6	9	4	40.0
8 <i>E. faecalis</i> amgR	6	1	1	1	3	-	2	1	12	3	4	80.0
9 <i>E. faecium</i> ampR	-	7	-	1	-	3	1	2	1	13	5	7.1
10 <i>S. pneumoniae</i> penS	5	1	1	-	2	-	3	-	11	1	7	91.6
11 <i>S. pneumoniae</i> penI	5	-	2	-	3	-	3	-	13	-	6	100.0
12 <i>S. pneumoniae</i> penR	4	1	2	-	3	-	3	-	12	1	6	92.3
13 <i>S. pneumoniae</i> eriR C	3	2	2	-	3	-	3	-	11	2	6	84.6
14 <i>S. pneumoniae</i> eriR M	6	-	2	-	3	-	3	-	14	-	5	100.0
15 <i>S. pneumoniae</i> eriR I	5	1	2	-	3	-	3	-	13	1	5	92.8
16 <i>S. pneumoniae</i> eriS	5	-	1	-	1	-	3	-	10	-	9	100.0
17 <i>S. pyogenes</i> eriS	4	1	1	-	3	-	3	-	11	1	7	91.6
18 <i>S. pyogenes</i> eriR C	7	-	2	-	3	-	2	1	14	1	4	93.3
19 <i>S. pyogenes</i> eriR M	6	-	2	-	3	-	2	-	13	-	6	100.0
20 <i>S. pyogenes</i> eriR I	6	-	1	-	3	-	2	1	12	1	6	92.3
21 <i>E. coli</i> ESBL	7	-	1	-	2	1	4	1	14	2	3	87.5
22 <i>E. coli</i> cipR	7	-	1	-	3	-	5	-	16	-	3	100.0
23 <i>E. coli</i> ampR	7	-	1	-	2	1	4	-	14	1	4	93.3
24 <i>E. coli</i> IRT	7	-	1	-	3	-	5	-	16	-	3	100.0
25 <i>P. aeruginosa</i> imiR	7	-	2	-	3	-	5	-	17	-	2	100.0
26 <i>Salmonella</i> spp. TEM25/CTX2	7	-	1	-	3	-	5	-	16	-	3	100.0
Totale parziale	148	31	30	7	67	7	81	11	326	56	112	85.4
Totale complessivo (corr+err)	179		37		74		92		382			
Percentuale		17.3		18.9		9.4		11.9		14.6		

C, corretto; E, errato; n.e., non eseguito.

DISCUSSIONE

I dati raccolti in questo studio possono essere così riassunti: 19 laboratori di Microbiologia clinica, di cui 3 privati, distribuiti sul territorio ligure con l'inclusione di 2 centri del basso Piemonte hanno analizzato tutti i 26 microrganismi veicolanti meccanismi di resistenza agli antibiotici ben caratterizzati. Solo 7 Laboratori hanno esaminato l'intera collezione di 26 isolati inviata, mentre complessivamente 12 sedi operative hanno studiato almeno 20 ceppi. Nel loro insieme i centri hanno valutato correttamente 85.4% delle prove di identificazioni eseguite e 82.8% dei saggi per la sensibilità agli antibiotici effettuati. Il riconoscimento delle specie batteriche ha presentato maggiori difficoltà con gli

enterococchi, in particolare con *E. faecium*, mentre più facile è sembrata l'identificazione delle specie batteriche Gram-negative. In generale salvo qualche eccezione i patogeni inviati hanno creato qualche difficoltà per il loro riconoscimento come specie batterica a molti laboratori. Lo stesso dicasi per l'accertamento delle resistenze agli antibiotici, con problematiche più evidenti per stafilococchi ed enterococchi. Su tutte la statistiche pesa il numero dei ceppi non esaminati che hanno rappresentato il 22.6% delle identificazioni e il 29.9% delle prove di sensibilità agli antibiotici. Alcuni dei ceppi utilizzati per lo studio, infine, presentavano fenotipi di resistenza piuttosto rari: se, tuttavia, non sono identificati correttamente possono dar

Tabella 6. Riassunto risultati prove di sensibilità agli antibiotici

Ceppo	Fenotipo di Resistenza	Test non eseguiti	Test corretti	Test non corretti		
		(%)	(%)	EMG*	EM**	EMi***
<i>S. aureus mecA</i> costitutivo	oxaR	21	68	10		
<i>S. aureus mecA</i> inducibile	oxaR	10.5	53	37		
<i>S. aureus</i> penicillasi+	b-lattamasi	10.5	32	48		
<i>S. haemolyticus</i> teiR	Teicoplanino-R	21	16	37	26	
<i>E. faecalis</i> VanA	Vancomicino-R	26	68	5		
<i>E. faecium</i> VanB	Vancomicino-R	32	68			
<i>E. gallinarum</i> Van C	Vancomicino-R	32	37		21	10
<i>E. faecalis</i> amgR	Aminoglicosidi-R alti livelli	37	63			
<i>E. faecium</i> ampR	Ampicillino-R	21	32	42		
<i>S. pneumoniae</i> penS	Penicillino-S	42	32			21
<i>S. pneumoniae</i> penI	Penicillino-R	42	32			21
<i>S. pneumoniae</i> penR	Penicillino-R	42	42	5		10
<i>S. pneumoniae</i> eriR costitutivo	Eritromicino-R	37	58	5		
<i>S. pneumoniae</i> eriR fenotipo M	Eritromicino-R	32	63	5		
<i>S. pneumoniae</i> eriR inducibile	Eritromicino-R	37	53	10		
<i>S. pneumoniae</i> eriS	Eritromicino-S	42	53		5	
<i>S. pyogenes</i> eriS	Eritromicino-S	5	42		5	
<i>S. pyogenes</i> eriR costitutivo	Eritromicino-R	26	5	16		5
<i>S. pyogenes</i> eriR fenotipo M	Eritromicino-R	26	57	5		10
<i>S. pyogenes</i> eriR inducibile	Eritromicino-R	31	5	10		5
<i>E. coli</i> ESBL	ESBL	21	32	47		
<i>E. coli</i> cipR	Ciprofloxacino-R	21	79			
<i>E. coli</i> ampR	Ampicillino-R	26	74			
<i>E. coli</i> IRT	Amoxicillina-clavulanato-R	21	16	63		
<i>P. aeruginosa</i> imiR	Imipenem-R	26	68	5		
<i>Salmonella</i> spp ESBL	ESBL	26	68	5		

* EMG= Errore Maggiore Grave; **EM= Errore Maggiore; ***EMi =Errore Minore

Tabella 7. Metodi utilizzati per la valutazione della sensibilità agli antibiotici

	ATB/API		Kirby-Bauer		Microscan		Sceptor		Sensititre		Vitek		Totale		n.e.	%
	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E	C	E		
1 <i>S. aureus mecA</i> C	3	-	3	1	2	-	1	1	1	-	3	1	13	3	3	81.2
2 <i>S. aureus mecA</i> I	3	1	2	1	1	1	1	2	-	1	3	1	10	7	2	58.8
3 <i>S. aureus</i> Penicillasi+	2	2	2	1	1	1	1	2	-	1	2	2	8	9	2	47.0
4 <i>S. haemolyticus</i> teiR	4	-	1	2	-	1	2	1	-	1	1	2	8	7	4	53.3
5 <i>E. faecalis</i> Van A	3	-	2	1	1	-	3	-	1	-	3	-	13	1	5	92.8
6 <i>E. faecium</i> Van B	2	-	3	-	1	-	3	-	1	-	3	-	13	-	6	100.0
7 <i>E. gallinarum</i> Van C	2	-	2	-	1	-	1	2	1	-	4	-	11	2	6	84.6
8 <i>E. faecalis</i> amgR	1	1	2	-	1	-	3	-	1	-	4	-	12	1	6	92.3
9 <i>E. faecium</i> ampR	2	1	1	1	1	-	2	1	-	1	-	4	6	8	5	42.8
10 <i>S. pneumoniae</i> penS	1	1	1	-	-	1	1	1	1	-	2	1	6	4	9	60.0
11 <i>S. pneumoniae</i> penI	2	-	1	1	1	-	1	1	1	-	4	-	10	2	7	83.3
12 <i>S. pneumoniae</i> penR	2	-	1	1	1	-	2	-	1	-	3	1	10	2	7	83.3
13 <i>S. pneumoniae</i> eriR C	2	-	2	-	-	1	2	-	1	-	4	-	11	1	7	91.7
14 <i>S. pneumoniae</i> eriR M	2	-	2	-	-	1	3	-	1	-	4	-	12	1	6	92.3
15 <i>S. pneumoniae</i> eriR I	2	-	2	-	-	1	2	1	1	-	3	-	10	2	7	83.3
16 <i>S. pneumoniae</i> eriS	2	1	2	-	1	-	2	-	1	-	1	-	9	1	9	90.0
17 <i>S. pyogenes</i> eriS	2	-	1	1	-	-	2	-	1	-	2	-	8	1	10	88.9
18 <i>S. pyogenes</i> eriR C	3	1	3	-	-	1	3	-	1	-	1	1	11	3	5	78.6
19 <i>S. pyogenes</i> eriR M	4	-	3	-	-	-	2	1	1	-	2	-	12	1	6	92.3
20 <i>S. pyogenes</i> eriR I	3	-	3	-	-	1	1	1	1	-	2	-	10	2	7	83.3
21 <i>E. coli</i> ESBL	2	-	4	-	2	-	3	-	1	-	3	-	15	-	4	100.0
22 <i>E. coli</i> cipR	2	-	3	-	2	-	3	-	1	-	3	-	14	-	5	100.0
23 <i>E. coli</i> ampR	2	-	4	-	1	-	3	-	1	-	3	-	14	-	5	100.0
24 <i>E. coli</i> IRT	2	-	4	-	2	-	3	-	1	-	3	-	15	-	4	100.0
25 <i>P. aeruginosa</i> imiR	2	-	3	-	2	-	3	-	1	-	3	-	14	-	5	100.0
26 <i>Salmonella</i> spp TEM25/CTX2	2	-	2	1	2	-	1	2	1	-	1	1	9	4	6	69.2
Totale	59	8	59	11	23	9	54	16	22	4	67	14	284	62	148	82.8
	67		70		32		70		26		81		346			
%			11.9		15.7		28.1		22.8		15.4		17.3		17.9	

C, corretto; E, errato; n.e., non eseguito.

luogo a problemi non solo dal punto di vista terapeutico ma anche economico (11, 21, 23, 28, 29).

Questi dati consentono alcune considerazioni di carattere più generale. Un primo problema, indipendentemente dalla strumentazione automatica o semiautomatica adottata che ha certo i suoi limiti ben noti all'operatore (7, 8), riguarda la mancanza di uniformità dei metodi di saggio, che assai raramente si rifà a linee guida riconosciute a livello nazionale e internazionale. I metodi di conferma dei risultati prodotti dalla strumentazione sono infatti scarsamente usati.

Il fatto di non poter diversificare i saggi sulla base del tipo di combinazione patogeno/antibiotico, dovute talvolta a carenze di personale qualificato appare come fattore condizionante l'esito dell'esame batteriologico. Un saggio errato ha una ricaduta negativa immediata per il paziente (21, 28) ed in seconda istanza determina decorsi terapeutici più lunghi e perciò più costosi (21, 27, 28). Quando non esistono le condizioni ottimali di esecuzione di un esame microbiologico, sulla base delle attuali conoscenze, sia dal punto di vista dell'identificazione corretta della specie batterica (14), sia da quello dell'accertamento delle resistenze, sarebbe preferibile non eseguire quel tipo di esame di laboratorio deleteria per la terapia (21, 28).

Il collegamento con un Centro di riferimento e la creazione di una rete di scambi collaborativi tra le varie realtà potrebbe risolvere facilmente queste problematiche.

Questo studio ha messo chiaramente in luce come tale esigenza debba essere sentita da una parte dei centri coinvolti in questa indagine. All'entusiasmo dell'adesione non ha fatto seguito una risposta adeguata ma l'analisi dei propri risultati, confrontata con le indicazioni metodologiche fornite dal Centro di riferimento, fa ben pensare a migliori risultati nelle iniziative future.

Questa prima iniziativa ha avuto certamente il suo primo importante successo grazie ai citati scambi di informazione che hanno permesso quasi automaticamente di stilare una sorta di linee guida, qui riassunte in parte nella Sezione Materiali e Metodi, sulla quale cercare di uniformare la diagnostica col fine di renderla aggiornata e tecnicamente corretta. Ogni altra via risulterà estremamente onerosa per il paziente, per le strutture sanitarie e in definitiva per la Società (21, 28).

Un altro aspetto importante riguarda il mancato inserimento, da parte dei centri, dei ceppi ATCC inviati per il controllo di qualità, nei saggi eseguiti (20). Anche questo fattore può essere

preso come indice di una mancanza di un riferimento e di linee guida ben collaudate adottate dal laboratorio per condurre la routine (20).

RINGRAZIAMENTI

Gli autori sono indebitati con Elisabetta Maioli per l'aiuto fornito durante alcune fasi di questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

1. Acar JF. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl. 1): S17-18.
2. Boisivon A, Thibault M, Leclercq R. Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 175-9.
4. Chelossi E, Platè M, DeLeo C, Schito GC. Analisi genotipica di *Streptococcus pyogenes* eritromicina-resistenti isolati recentemente in Italia GIMMOC 1998; 2: 9-20.
5. Chelossi E, Platè M, De Leo C, Schito GC. Attività di alcuni antibiotici su *Streptococcus pyogenes* eritromicina-resistenti isolati recentemente in Italia. GIMMOC 1997; 3: 9-20.
6. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 2000; 6: 189-98.
7. Davies J. Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science* 1994; 264: 375-82.
8. Felmingham D, Brown DFJ. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (suppl S1), 81-5.
9. Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. Murray PR et al.: *Manual of Clinical Microbiology*, Seventh Edition, p. 1593-1600, ASM Press. 1999.
10. Gold HS, Moellering RC. Antimicrobial-drug resistance. *N Engl J Med* 1996; 35: 1445-53.
11. Jones RN, Masterson R. Determining the value of antimicrobial surveillance programs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 41: 171-5.
12. Kahlmeter G, Brown DFJ. Resistance surveillance studies comparability of results and quality assurance methods. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 775-7.
13. Levy SB. Multidrug resistance - A sign of the times. *N Engl J Med* 1998; 338: 1376-8.
14. Livermore D, Struelens M, Amorin J, et al. Multicentre evaluation of the VITEK 2 advanced expert system for interpretative reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 289-300.
15. Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48, Suppl S1: 87-102.
16. Marchese A, Debbia EA, Bacca D, Balistreri G, Musolino B, Schito GC. Multidrug-resistant Gram-positive pathogens: an update on current

- microbiological patterns. *Drugs* 1997; 54: Suppl. 6, 11-20.
17. Marchese A, Saverino D, Debbia EA, Pesce A, Schito GC. Antistaphylococcal activity of cefdinir, a new oral third generation cephalosporin, alone and in combination with other antibiotics, at supra- and sub-MIC levels. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 53-66.
 18. Marchese A, Arlet G, Schito GC, Lagrange PH, Philippon A. Detection of SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15: 245-8.
 19. Marchese A, Tonoli E, Balistreri G, Debbia EA, Schito GC. Antibiotic susceptibility patterns and serotypes of antibiotic resistant and or invasive *Streptococcus pneumoniae* strains circulating in Italy. *Microbial Drug Res* 2000; 6: 163-70.
 20. Marchese A, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Macrolide resistance mechanisms and expression of phenotypes among *Streptococcus pneumoniae* circulating in Italy. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44: 461-4.
 21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement: M100-S12, Vol. 22. NCCLS Wayne, PA. 2002.
 22. Nicolau D. Clinical and economic implications of antimicrobial resistance for the management of community-acquired respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 (Suppl S1): 61-70.
 23. O'Brien TF. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis* 1997; 24 Suppl 1: S2-S8.
 24. O'Brien TF. Emergence, spread and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (Suppl 3) S78-84.
 25. Schito GC, Molinari G, Debbia EA, et al. Mechanisms of aminoglycoside resistance in a large italian hospital. Abstr A-67, 90th Annual Meeting ASM, 1990.
 26. Seppälä H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 885-91.
 27. Sutcliffe J, Tait-kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemoter* 1996; 40: 1817-24.
 28. Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. *Clin Infect Dis* 2001; (Suppl 3): S108-15.
 29. Travers K, Barza M. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clin Infect Dis* 2002, 34: (Suppl 3): S131-34.
 30. Wood MJ and R.C. Moellering. Microbial resistance: bacteria and more. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (suppl 1): S2-3.

Eugenio A. Debbia
 Istituto di Microbiologia,
 Università di Genova
 Facoltà di Medicina e Chirurgia,
 Largo Rosanna Benzi 10, - 16132 Genova
 Tel. +39-10-3537655; Fax +39-10-504837
 E-mail: eugenio.debbia@unige.it