
S1.6

**ESPERIENZE NELLA GESTIONE DI
EPIDEMIE NOSOCOMIALI:
IRCCS SAN MATTEO DI PAVIA**
Marone P., Carretto E.

Laboratorio di Batteriologia, Laboratori Sperimentali di Ricerca, Area Infettivologica, IRCCS Policlinico "San Matteo", Pavia

Gli stafilococchi aurei resistenti alla meticillina (SAMR) sono fra i patogeni più frequentemente isolati nelle Terapie Intensive (TI). Tra il luglio 1998 e il giugno 1999 è stato messo in atto un protocollo di sorveglianza sulle colonizzazioni/infezioni da SAMR presso una delle 3 TI dell'IRCCS Policlinico "San Matteo" di Pavia. Sono stati arruolati nello studio 292 pazienti, 87 dei quali sono risultati colonizzati (29.8%). In 40/87 (13.7%) la colonizzazione era già presente all'ingresso, mentre in 47/87 (18.6%) è avvenuta in TI. Nell'ambito dei pazienti colonizzati, 26/87 (29.8%) hanno sviluppato un'infezione da SAMR. Analisi molecolari (ribotipizzazione con sistema automatico) hanno consentito di stimare dodici differenti cluster di microrganismi, il più numeroso dei quali risultava essere composto da un elevato numero di isolati (146).

Nel periodo compreso fra l'1 gennaio 1997 e il 31 dicembre 2001 è stato condotto uno studio di sorveglianza relativamente agli enterobatteri produttori di beta-lattamasi a spettro allargato (ESBL+) isolati da una TI del nostro ospedale. *P. mirabilis* è risultato il microrganismo che più frequentemente ha mostrato il fenotipo ESBL+ (58%). In 312 casi l'isolamento dell'enterobattere è stato considerato come causa di infezione; nell'ambito dei diversi episodi infettivi, i ceppi ESBL+ sono risultati essere causa di infezioni delle vie urinarie nel 44.9% dei casi, di sepsi nel 30%, di polmoniti nel 25.8%, di infezioni di ferita nel 20.4%. La mortalità complessiva nelle infezioni sostenute da ceppi ESBL+ è risultata essere pari all'1%, contro il 10.6% dei ceppi non produttori. Nel periodo considerato, l'incidenza dei ceppi ESBL+ è andata progressivamente riducendosi, passando dal 38.9% del 1997 al 10.9% del 2001. Questo risultato è stato ottenuto grazie alle misure messe in atto nell'U.O. (precauzioni di barriera, variazioni nella terapia antibiotica empirica ecc.).

Dal giugno 1998, a seguito del primo caso di sepsi da enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) presso il nostro Ospedale, è in atto un protocollo di sorveglianza attiva delle infezioni/colonizzazioni da VRE. Le U.O. coinvolte sono state sinora le 3 TI e l'Oncoematologia Pediatrica, anche se isolamenti sporadici di questo microrganismo sono stati osservati

anche in altri Reparti. Un outbreak di colonizzazioni si è avuto presso una delle TI: a partenza da un caso indice, sei pazienti degli 8 ricoverati sono risultati colonizzati da VRE. Da allora e nei 16 mesi successivi sono stati analizzati i tamponi rettali di 509 pazienti. Di essi 13 (2.5%) sono risultati colonizzati all'ingresso in TI, mentre 43 (8.7%) dei restanti 496 pazienti VRE negativi hanno acquisito il microrganismo durante la degenza in TI. Il fattore di rischio più evidente è risultato essere, nella nostra esperienza, la durata della degenza in TI. Due pazienti hanno sviluppato infezione da VRE; l'indice colonizzazioni/infezioni è quindi risultato essere del 3.6% e la frequenza complessiva delle infezioni da VRE dello 0.4%. Entrambi i pazienti, trattati con oxazolidinoni, sono guariti. Sui diversi ceppi è stata eseguita ribotipizzazione con sistema automatico, utilizzando differenti enzimi di restrizione, che ha consentito di identificare tre differenti cluster: al più numeroso erano ascrivibili 52 pazienti, mentre altri due, uno dei quali causato da ceppi di *E. faecalis* (mentre tutti gli altri erano *E. faecium*), sono risultati essere composti da due pazienti. A seguito del manifestarsi dell'epidemia sono state messe in atto procedure di isolamento e training del personale come indicato nelle procedure dei Centers for Disease Control del 1995. L'incidenza degli isolamenti si è progressivamente ridotta nei mesi successivi, con un caratteristico andamento "a dente di sega" e con mesi liberi da isolamenti a partire dal 16° successivamente all'outbreak iniziale. Peralto il ripresentarsi di nuovi casi sporadici nel reparto di TI sembrerebbe documentare uno stato di endemia a livello del nostro Ospedale, rilevabile più facilmente nelle aree critiche quali le TI che hanno uno scambio continuo di pazienti con altre unità operative.

S1.7

**ESPERIENZE NELLA GESTIONE
DI EPIDEMIE NOSOCOMIALI:
POLICLINICO UNIVERSITARIO DI
PARMA**
**Menzio M.G., Bertocini L., Zerbini L.,
Rossi S., Somenzi P., Chezzi C., Dettori G.**

Sezione di Microbiologia, Dip. di Patologia e Medicina di Laboratorio-Univ. degli Studi di Parma

Clostridium difficile enterotossigenico è responsabile di un ampio spettro di infezioni: una colonizzazione asintomatica, una diarrea autolimitantesi, coliti di varia gravità fino alla colite pseudomembranosa. Rappresenta inoltre la principale causa di diarreie nosocomiali, problema di grande rilevanza socio-economica negli ambienti ospedalieri. La popolazione maggiormente suscettibile alla malattia è rappresentata dai

pazienti anziani; al contrario nei neonati la percentuale di portatori del microrganismo e/o delle sue tossine è alta, con bassa incidenza della malattia. La malattia da infezione associata a *C. difficile* insorge più frequentemente in condizioni di dismicrobismo intestinale a seguito di una terapia antibiotica.

La malattia è causata da ceppi tossinogenici TcdA+B+, generalmente produttori di una enterotossina A, responsabile prevalentemente di una sintomatologia diarroica, e di una citotossina B, che causa danni ai tessuti della mucosa intestinale, inducendo importanti cambiamenti morfologici cellulari. Di recente, studi rivolti a chiarire in particolare le basi molecolari del meccanismo d'azione delle tossine hanno messo in evidenza che nell'ambito di ceppi diversi esiste una eterogeneità nella sequenza dei geni codificanti per le tossine A e B; sono stati inoltre riportati isolamenti di ceppi che producono solamente la citotossina B (TcdA-B+) ed è emerso un nesso eziologico tra questi ceppi e stato di malattia.

Presso la Sezione di Microbiologia-Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio è stato condotto uno studio epidemiologico, che si proponeva di rilevare la effettiva incidenza della malattia intestinale associata a *Clostridium difficile* (CDAD) in una popolazione di pazienti ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Parma: in particolare, di stabilire il numero percentuale dei malati e la frequenza dei portatori asintomatici del batterio (possibile sorgente di una sua circolazione nosocomiale), di sorvegliare la comparsa di particolari stipti tossinogenici (TcdA-B+), mettendoli in relazione con le diverse situazioni cliniche e infine di accertare una eventuale diffusione epidemica nosocomiale di ceppi di *C. difficile* in particolare nella popolazione anziana, considerata più a rischio di malattia. Per raggiungere questi obiettivi è stato rivisto il protocollo diagnostico in uso: la diagnosi rapida diretta sul campione fecale, che ricerca simultaneamente la produzione *in vivo* della glutammato-deidrogenasi (GDH) e della tossina A (ToxA) da parte del ceppo di *C. difficile*, è stata completata con la ricerca della citotossina B su colture di cellule Vero e dall'isolamento del ceppo batterico. Quest'ultimo è stato sempre caratterizzato per la sua capacità di produrre o meno la tossina A *in vitro* mediante un sistema immunoenzimatico o immunocromatografico. Inoltre, il protocollo diagnostico è stato ampliato con l'introduzione di metodiche di biologia molecolare: una Duplex PCR per caratterizzare la enterotossinogenicità dei ceppi isolati, verificando contemporaneamente la presenza dei geni codificanti per la enterotossina A (*tcdA*) e la citotossina B (*tcdB*) con l'obiettivo di rilevare la effettiva circolazione dei ceppi TcdA-B+ e la PCR-ribotyping per la tipizzazione a fini epidemiologici degli stessi.

Nello studio epidemiologico prospettico sono stati arruolati 450 pazienti (357 adulti e 93 bambini), ricoverati presso l'Azienda Ospedaliera di Parma da Novembre 2002 a Novembre 2003, per i quali veniva

posto il quesito diagnostico di confermare attraverso le indagini di laboratorio il sospetto clinico di malattia da infezione associata a *C. difficile*, posto seguendo i criteri stabiliti nel protocollo di studio accettati a livello internazionale. Sono stati pertanto esaminati 513 campioni fecali, dei quali 441 appartenenti ad adulti e 102 a bambini. Contestualmente è stata analizzata una seconda popolazione di 156 pazienti sintomatici, ma il cui caso clinico non era inquadrabile in una CDAD; questa popolazione era costituita da pazienti selezionati in base al Reparto di provenienza ed al periodo del ricovero in modo da coincidere come Degenza e temporalmente con i "casi di sospetta CDAD".

I risultati ottenuti nell'ambito della popolazione complessivamente studiata hanno permesso di affermare che anche nel nostro ambiente la malattia intestinale associata a *C. difficile* rappresenta un problema serio dal punto di vista socio-sanitario in base all'incidenza dei casi di CDAD diagnosticati negli adulti (17,1%) in un confronto con i dati riportati in letteratura. Al contrario, nei bambini si è potuto confermare che lo stato di malattia (6,5%) è meno frequente dello stato di portatore (22,6%). Dall'analisi dettagliata dei dati raccolti, in relazione anche alle patologie di base dei pazienti esaminati ed all'inquadramento degli stessi in base a fasce di età, è stato messo in evidenza che la malattia incide prevalentemente negli anziani (75,4% dei casi positivi). In quest'ambito è stata documentata in alcuni casi clinici la persistenza del ceppo e/o delle sue spore *in vivo* e la sua responsabilità in recidive della malattia diarroica protrattasi anche per alcuni mesi: è stato infatti possibile dimostrare mediante PCR-ribotyping l'isolamento ripetuto dello stesso ceppo di *C. difficile*, appartenente allo stesso ribotipo.

La caratterizzazione molecolare mediante Duplex PCR della enterotossinogenicità di 144 ceppi ha dimostrato che, almeno allo stato attuale, nessuno dei ceppi isolati dai nostri pazienti affetti da CDAD ha mostrato un'alterazione del *locus* di patogenicità: tutti sono risultati possedere entrambi i geni *tcdA*+/*tcdB*+, in particolare anche quei 23 ceppi risultati o non produttori o comunque scarsamente produttori della tossina A al di sotto del limite di sensibilità del saggio immunocromatografico stesso (TcdA-TcdB+). La maggior parte di questi 23 ceppi è stata isolata da campioni GDH+ToxA-; nella nostra esperienza la ricerca della tossina A nel campione risente del momento del prelievo: il risultato nell'ambito di diversi campioni dello stesso paziente è variabile ed è per questo che la diagnosi di laboratorio si deve basare su almeno due campioni consecutivi raccolti a distanza non ravvicinata. Mediante la ribotipizzazione di 193 ceppi, isolati dal 1993 al 2001 e durante lo studio epidemiologico prospettico (2002-2003), è stato infine messo in evidenza che dei 22 diversi ribotipi riscontrati 6 ribotipi (1, 4a, 3, 2a, 21, 6) sono predominanti e che i ribotipi 1 (32% del totale dei ceppi) e 4a (23,8%), in particolare, rappresentano ceppi endemici nel nostro ambiente espe-

daliero. I risultati ottenuti infine sembrano suggerire una possibile diffusione epidemica nosocomiale di ceppi di *C. difficile*, risultati appartenere prevalentemente ai due ribotipi predominanti 1 e 4a, nella popolazione anziana studiata.

Il quadro epidemiologico emerso motiva l'interesse e l'opportunità di intraprendere una più stretta sorveglianza ai fini di una prevenzione di epidemie nosocomiali di *C. difficile* nel nostro ambiente, che è raggiungibile solo attraverso un rigoroso controllo dei portatori del batterio all'atto del ricovero rispetto a quelli che si colonizzano nel corso della ospedalizzazione così come attraverso un attento controllo del personale e dell'ambiente stesso.

Questa sorveglianza non solo è motivata dai risultati ottenuti, ma è resa fattibile dall'approccio diagnostico tradizionale e molecolare, che è stato messo a punto e validato in questo studio epidemiologico prospettico.