

## FULL PAPERS

## “Alert” microrganisms: role of microbiology laboratory

**Barbara Pieretti<sup>1</sup>, Marco Moretti<sup>2</sup>, Maria Grazia Ghiandoni<sup>2</sup>, Gabriele Ciaschini<sup>2</sup>,  
Simonetta Gasperoni<sup>2</sup>, Ernesto Delprete<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche, Ospedale Valduce, Como

<sup>2</sup>Laboratorio Analisi Chimico-cliniche e Microbiologiche, Ospedale S. Croce, Zona Territoriale N° 3, Fano

**Key Words** “Alert” microrganisms, antibiotic resistance, surveillance, hospital infections.

### Il ruolo del laboratorio di microbiologia nella gestione dei microrganismi “sentinella”

#### SUMMARY

The phenomenon of antibiotic resistance represents today an important problem especially in nosocomial settings with a considerable impact in clinical treatment of infections.

We have drafted in collaboration with C.I.O. (Comitato infezioni Ospedaliere) and applied in the routine of microbiology laboratory the “Procedura per la gestione dei microrganismi sentinella” (Protocol for the management of “alert microrganisms”).

In this study we have investigated the isolation of “alert microrganisms” in our hospital in a period of fifteen months and we have evaluated in time a relative antibiotic resistance. The term “alert microrganisms” is referred to microrganisms with particular antibiotic resistance profiles that are responsible of difficult to treat hospital infections.

The study suggests the role of microbiology laboratory in the systematic research of “alert microrganisms” as excellent and economic information source for identify them to level of species and following the antibiotic resistance in time.

Received February 10, 2007

Accepted June 14, 2007

#### INTRODUZIONE

L'intenso uso/abuso degli antibiotici nella pratica clinica è considerato alla base dello sviluppo delle resistenze dei microrganismi verso tali composti (3, 13, 23), tanto da assumere una dimensione globale in seguito alla sempre più frequente segnalazione di ceppi batterici antibiotico resistenti (13, 16, 22).

È necessario tener presente che *in vivo* si instaurano facilmente condizioni che favoriscono la selezione di germi resistenti e questo comporta per il clinico la necessità di utilizzare un farmaco alternativo o in mancanza di scelte, l'uso di una combinazione di antibiotici. Quindi è soprattutto il microbiologo che può dare al clinico indicazioni per un corretto uso degli antibiotici fornendogli informazioni importanti sui fenotipi di resistenza osservati attraverso le prove di laboratorio e sul loro significato. Infatti, non bisogna dimenticare che lo scopo dell'esecuzione dell'antibiogramma è quello di rilevare le resistenze agli antibiotici e di conseguenza di prevedere un eventuale fallimento terapeutico e di essere un mezzo epidemio-

logico per sorvegliare i cambiamenti di sensibilità nel corso del tempo.

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza si ripercuote in ambito ospedaliero sulla rilevazione delle infezioni ospedaliere, cioè di quelle infezioni che insorgono durante il ricovero in ospedale o, in altri casi, dopo che il paziente è stato dimesso e che non erano manifeste clinicamente né in incubazione al momento dell'ammissione.

Le infezioni ospedaliere hanno enormi conseguenze sia sul paziente che le contrae (aumento della degenza, periodo di convalescenza, necessità di successivi controlli ambulatoriali) ed un non trascurabile impatto economico in termini di morbilità e mortalità.

Lo studio SENIC (Study on Efficacy of Nosocomial Infection Control) (20) condotto negli ospedali statunitensi evidenzia che i pazienti infetti hanno un'incidenza pari a 5.2% mentre le infezioni del 6.6%. Molti Paesi Europei, inclusa l'Italia, hanno condotto studi di prevalenza dove i pazienti infetti hanno una prevalenza del 6.8 – 9.3%, mentre le infezioni del 7.6 – 10.3%.

**Corresponding author: Barbara Pieretti**

Laboratorio Analisi Ospedale Valduce - Via Dante Alighieri 11 - 22100 Como (CO)

Tel.: 031 324627 - Fax 031 324183 - E-mail: [barbara.pieretti@libero.it](mailto:barbara.pieretti@libero.it)

Secondo gli studi di incidenza, circa il 5% dei pazienti ospedalizzati contrae un'infezione durante il ricovero, mentre secondo gli studi di prevalenza dal 7% al 9% dei pazienti ricoverati in un dato momento è infetto.

Gli studi condotti in Italia nel corso degli anni '80 (6-8, 10-11, 17) hanno rilevato che il numero di infezioni nosocomiali è inferiore rispetto alla media europea, ciò è probabilmente da attribuire a differenze di popolazione ricoverata e a carenze diagnostiche, piuttosto che ad un minor rischio di contrarre un'infezione ospedaliera.

Il sistema di sorveglianza delle infezioni NNIS (National Nosocomial Infection Surveillance) (9), in corso dagli anni '70 negli Stati Uniti, che descrive la frequenza di infezioni nel tempo e per specifici gruppi di pazienti, ha rilevato negli ultimi quindici anni un cambiamento nella frequenza relativa delle localizzazioni delle infezioni e della loro incidenza. Infatti, all'inizio degli anni '80 le infezioni urinarie rappresentavano il 40% delle infezioni ospedaliere rilevate, le infezioni della ferita chirurgica il 20%, le polmoniti il 16% e le batteriemie il 6%. Mentre nel 1990 la distribuzione di queste infezioni era la seguente: infezioni urinarie 35%, infezioni della ferita chirurgica 18%, polmoniti 16%, batteriemie 11%.

La percentuale di infezioni nosocomiali nei pazienti di una struttura sanitaria rappresenta un indicatore della qualità e dell'adeguatezza dell'assistenza.

In particolare, i centri di terapia intensiva rappresentano in assoluto le aree ospedaliere con la maggior frequenza di infezioni ospedaliere; in media il 5-10% dei pazienti di un ospedale è ricoverato in tali unità e sviluppano un quarto circa delle infezioni acquisite nell'ambito di un determinato presidio ospedaliero, e circa il 90% degli eventi epidemici. Anche la frequenza di infezioni sostenute da ceppi resistenti è molto più elevata rispetto agli altri reparti.

Il Piano Sanitario Nazionale 1998-2000 (18) si poneva l'obiettivo di ridurre l'incidenza di infezioni ospedaliere di almeno il 25%, con particolare riguardo alle infezioni delle vie urinarie, alle infezioni della ferita chirurgica, alle polmoniti post-operatorie associate a ventilazione assistita, alle infezioni associate a cateteri intravascolari. Per realizzare tale obiettivo è necessario che ogni presidio ospedaliero attivi un programma per la sorveglianza, prevenzione e controllo delle infezioni, orientato sia ai pazienti che al personale. Questo tipo di programma rappresenta un criterio di accreditamento per la struttura e deve prevedere: il comitato di controllo, la gestione del programma da parte di personale qualificato e la definizione di politiche di intervento e protocolli scritti.

Nel Piano Sanitario Nazionale 2003-2005 (19), le infezioni ospedaliere fanno parte della sorveglianza delle infezioni, in particolare si fa riferimento all'importanza della sorveglianza delle infezioni nosocomiali ed alla necessità di combattere il crescente problema della resistenza acquisita alla maggior parte degli antibiotici disponibili da parte di microrganismi patogeni, soprattutto batteri, con gravi implicazioni sul trattamento delle malattie infettive.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di osservare nel tempo l'andamento delle sensibilità verso gli antibiotici, dei microrganismi isolati da diversi materiali biologici presso il Laboratorio Analisi della Zona Territoriale N°3 di Fano, al fine della sorveglianza delle infezioni ospedaliere, in seguito all'applicazione nella routine del laboratorio di microbiologia dal 01 aprile 2004 della "Procedura per la gestione dei microrganismi sentinella".

## MATERIALI E METODI

Per poter utilizzare i dati di laboratorio ai fini della sorveglianza delle infezioni ospedaliere, è stato indispensabile standardizzare i protocolli di prelievo, conservazione, trasporto e processazione dei campioni, e quelli relativi all'analisi dei dati.

Inoltre, nel nostro laboratorio è stato messo a punto un sistema per la sorveglianza e la gestione delle infezioni ospedaliere "home made" molto semplice che prevede la segnalazione dei germi "sentinella" secondo quanto stabilito nella "Procedura per la gestione dei microrganismi sentinella" stilata dal Comitato delle Infezioni Ospedaliere (C.I.O.) (4, 5) della Zona Territoriale N°3 di Fano, al fine di garantire la sicurezza dell'utente e degli operatori, e di orientare la pratica clinica e assistenziale verso idonei comportamenti. All'isolamento di un patogeno incluso nella lista dei microrganismi "sentinella" (figura I), concordata tra il laboratorio e il C.I.O. tenendo conto del fatto che i patogeni da includere devono essere caratterizzati da una elevata diffusibilità o patogenicità e che devono essere disponibili e possibili interventi per prevenire la diffusione, il laboratorio procede alla segnalazione dell'evento sentinella al reparto e alla Direzione sanitaria.

I dati che vengono riportati in questo studio si riferiscono al periodo di tempo che va dal 01/04/2004 al 31/07/2005. In tale periodo di tempo, è stata valutata la frequenza di isolamento dei microrganismi, il loro comportamento verso gli antibiotici di uso comune e l'andamento nel tempo dei valori della Minima Concentrazione Inibente (MIC) per i microrganismi più frequentemente isolati appartenenti alla categoria dei germi "sentinella".

In particolare abbiamo focalizzato la nostra attenzione sugli isolati provenienti dai reparti dei 3 Presidi Ospedalieri (P.O.) in cui è suddivisa la Z.T. N°3 (P.O. di Fano, P.O. di Fossombrone, P.O. di Pergola), considerando tra i reparti quelli con pazienti a rischio maggiore di contrarre un'infezione: lungodegenza, cardiologia, rianimazione, dialisi/nefrologia/urologia, chirurgia, medicina.

I materiali biologici indagati sono rappresentati da: urine, feci, broncoaspirati, espettorati, cateteri venosi, emocolture, materiale ferita, liquor, provenienti da pazienti ricoverati in reparti a rischio dei 3 P.O. Ogni materiale ritenuto idoneo per l'esame colturale è stato seminato negli opportuni terreni di crescita secondo quanto stabilito dal Manuale di Microbiologia in uso nel nostro laboratorio (14). I campioni risultati positivi all'esame colturale sono stati indagati attraverso procedure minime per l'identificazione della specie responsabile [colorazione di Gram, test biochimici, test dell'ossidasi, test della coagulasi, gallerie API (bioMérieux), sistema VITEK (bioMérieux)] e l'allestimento dell'antibiogramma (sistema VITEK e/o metodica Kirby-Bauer (1)).

I germi "sentinella" isolati sono stati considerati tali secondo le modalità sotto riportate.

Per esempio, lo *Pseudomonas aeruginosa* è stato segnalato quando è risultato resistente ad almeno 3 classi di antibiotici tra: ureidopenicilline (piperacillina), carbapenemi (imipenem o meropenem), cefalosporine di III° (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone) e IV° generazione (cefepime), chinoloni (ciprofloxacina, acido nalidixico, levofloxacina, ofloxacina). I ceppi multi-drug resistance (MDR) sono stati verificati con metodica Kirby-Bauer su agar Muller-Hinton seguendo i criteri del CLSI (15), ed è stata anche verificata la resistenza naturale del germe al trimetoprim-sulfametazolo.

Lo *Staphylococcus aureus* è stato segnalato quando resistente alla meticillina; tale resistenza rilevata con il sistema Vitek, viene verificata su piastra con la metodica Kirby-Bauer testando l'oxacillina (dischetto da 1 µg) secondo le norme CLSI (15).

Lo *Stenotrophomonas maltophilia* viene saggiato con la metodica Kirby-Bauer su agar Muller-Hinton solo per levofloxacina (dischetto da 5 µg) e trimetoprim-sulfametazolo (dischetto da 1.25/23.75 µg) data la sua multiresistenza ai comuni antibiotici; contemporaneamente viene verificata la resistenza naturale all'imipenem.

Per quanto riguarda gli Enterococchi vancomicina e teicoplanina resistenti (Van-A), l'identificazione di specie viene verificata con la metodica delle gallerie API, mentre la resistenza alla vancomicina e alla teicoplanina con la metodica Kirby-Bauer su agar Muller-Hinton (dischetto vancomicina e teicoplanina da 30 µg) secondo le norme CLSI (15).

La sorveglianza della frequenza di isolamento dei microrganismi resistenti agli antibiotici è stata effettuata sulla base dei soli dati di laboratorio in quanto sono state rispettate due importanti condizioni:

- gli isolati ripetuti dallo stesso paziente sono stati conteggiati una sola volta al fine di non avere una stima distorta da quella vera, perché dipendenti dal numero di controlli ripetuti fatti sullo stesso paziente o dal numero di colture di sorveglianza effettuate in reparto,

- l'analisi dei dati è stata condotta separatamente per i diversi materiali rappresentativi di infezioni invasive e di colonizzazione.

I dati relativi al numero e al tipo di germe sono stati raccolti secondo i criteri di estrapolazione forniti dal sistema Vitek (bioMérieux), e poi elaborati utilizzando il foglio di calcolo Excel.

## RISULTATI e DISCUSSIONE

Il primo passo è stato quello di considerare il numero di richieste per esami microbiologici / anno, il numero di isolati totali e la percentuale di microrganismi "sentinella" segnalati dal 01/04/2004 al 31/07/2005, nei reparti dei 3 P.O., distinti per materiale (tabella 1).

Confrontando tra loro il numero di germi "sentinella" totali isolati nel 2004 (aprile-dicembre) con quelli isolati nel 2005 (gennaio-luglio) è emerso che in valore assoluto non c'è stata variazione significativa (63 nel 2004 e 70 nel 2005), mentre in valore percentuale si è passati da un 3.9% di isolati nel 2004 ad un 7.5% di isolati nel 2005. In particolare il numero di germi "sentinella" segnalati è aumentato nei reparti di dialisi/nefrologia/urologia (0.25% nel 2004 e 1.3% nel 2005) e rianimazione (1.05% nel 2004 e 2.45% nel 2005) del P.O. di Fano, e nelle medicine degli altri 2 P.O. (0.12% nel 2004 e 0.75% nel 2005 nel P.O. di Pergola; 0.4% nel 2004 e 0.75% nel 2005 nel P.O. di Fossombrone).

In figura II sono riportati il numero e il tipo di microrganismi "sentinella" segnalati nei P.O. di Fano, Fossombrone e Pergola, nel periodo in esame, distinti in base al materiale ed al mese dell'anno in cui sono stati isolati. Per ogni mese dell'anno è indicato il numero totale dei microrganismi "sentinella" isolati, e nelle colonne degli istogrammi è stratificato il tipo di microrganismo "sentinella" segnalato. Come si può notare i germi maggiormente isolati sono rappresentati da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente.

Sono stati segnalati anche germi quali: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterococcus faecium* Van-A (vancomicina e teicoplanina resistente), e sotto la dicitura "altro" germi sentinella per i quali non viene eseguito l'antibiogramma (antigene

urinario di *Legionella pneumophila*, Tossina "A" di *Clostridium difficile*, *Aspergillus* spp.).

Nel periodo studiato sono stati isolati dai 3 P.O. complessivamente 137 microrganismi "sentinella" da diversi materiali: urine (30%), broncoaspirati (29%), ferite chirurgiche (12%), espettorati (9%), emocolture (6%), cateteri (4%), feci (7%) e altri materiali (4%). I microrganismi "sentinella" segnalati sono rappresentati per il 54% da *P.aeruginosa*, il 29% da MRSA, il 7% da *S.malthophilia*, l'1% da *E. faecium* VAN-A e il 9% da germi per i quali viene segnalata la presenza ma non viene effettuato l'antibiogramma. Per quanto riguarda quest'ultimo punto, abbiamo riscontrato casi di Legionellosi nel reparto di medicina del P.O. di Fano (4 casi dal marzo al giugno 2005), contratta in ambiente ospedaliero (*Legionella pneumophila* presente nelle condutture dell'acqua, è stata debellata applicando rigorosamente quanto stabilito dal protocollo "Legionellosi: vigilanza in ambiente ospedaliero"), segnalato la presenza della Tossina "A" di *Clostridium difficile* in vari reparti, la presenza di *Aspergillus* spp. e *Mucorales* spp. nel reparto di rianimazione.

I 2 ceppi di *E. faecium* Van-A isolati sono stati inviati per la conferma dell'isolato e delle antibiotiche resistenze con altre metodiche (es. E-test e/o altri test fenotipici e genotipici) al laboratorio di Microbiologia dell'A.O.U. - Ospedali Riuniti, Presidio Umberto I, dell'ospedale di Torrette di Ancona che rappresenta il nostro laboratorio di riferimento.

Abbiamo inoltre considerato il numero e il tipo di microrganismi "sentinella" segnalati nei 3 P.O. nel periodo dal 01/04/2004 al 31/07/2005 (tabella 2), in base al materiale ed al mese dell'anno in cui sono stati isolati, nei reparti di maggior interesse per la sorveglianza delle infezioni ospedaliere. Tali informazioni sono riassunte nei grafici riportati nella figura III, dove per ogni mese dell'anno è indicato in grassetto il numero totale dei microrganismi "sentinella" isolati (numeratore della frazione), il numero dei pazienti coinvolti (denominatore della frazione), e nelle colonne degli istogrammi è stratificato il numero ed il tipo di microrganismo "sentinella" segnalato.

Nel 2004 (aprile-dicembre) sono stati segnalati 53 microrganismi "sentinella" (+4 germi "sentinella" per i quali non viene eseguito l'antibiogramma) in 54 pazienti, mentre nel 2005 (gennaio-luglio) sono stati segnalati 53 (+ 8 germi "sentinella" per i quali non viene eseguito l'antibiogramma) microrganismi "sentinella" in 56 pazienti. Osservando la tabella 2 emerge che sono aumentati gli isolati nel reparto di rianimazione del P.O. di Fano e in quello di medicina del P.O. di Pergola, mentre per gli altri reparti il numero di

isolati è diminuito o rimasto pressochè costante. Ci siamo chiesti che cosa è successo e la prima osservazione è stata quella di valutare in quale periodo di tempo si è verificato l'incremento delle segnalazioni. Dall'osservazione dei dati raccolti, è emerso che nel reparto di rianimazione nel 2004 ci sono state in media 1-2 segnalazioni mensili, mentre nel 2005 ci sono state su 23 segnalazioni totali ben 20 segnalazioni di microrganismi "sentinella" isolati da broncoaspirati. Di queste segnalazioni 6 nel mese di marzo e tutte relative a germi isolati da pazienti diversi, inoltre 13 segnalazioni avevano come protagonista lo *P. aeruginosa*. Per quanto riguarda il reparto di medicina nel 2005 ci sono state 7 segnalazioni totali di cui 5 causate da *P. aeruginosa*.

La seconda osservazione è stata quella di verificare il pattern di antibiotico resistenza degli isolati dai diversi pazienti nei periodi di tempo in cui sono stati segnalati. Da ciò è emerso che nel reparto di rianimazione e di medicina, i pattern di antibiotico resistenza (considerando anche i valori di MIC registrati con la strumentazione Vitek) degli isolati sono risultati essere uguali.

Valutata la distribuzione degli isolati nei 3 P.O. abbiamo focalizzato la nostra attenzione su quelli segnalati nel P.O. di Fano nel periodo dal 01/04/2004 al 31/07/2005, data la maggior numerosità del campione.

Nel 2004 (apr-dic) sono stati segnalati ceppi di MRSA in 16 pazienti e ceppi di *P. aeruginosa* multiresistenti in 19 pazienti, mentre nel 2005 (gen-lug) sono stati segnalati ceppi di MRSA in 13 pazienti e ceppi di *P. aeruginosa* multiresistenti in 21 pazienti. Alcuni ceppi di MRSA isolati nel 2005 hanno sviluppato resistenza alla nitrofurantoina cui risultavano sensibili tutti i ceppi isolati nel 2004, ed un aumento della resistenza nei confronti della rifampicina; mentre per quanto riguarda i ceppi di *P. aeruginosa* multiresistenti nel 2005 sono aumentate le resistenze ad aztreonam, imipenem ed amikacina.

Per quanto riguarda i 2 casi di *Enterococcus faecium* VAN-A, si è verificato ciò che è noto in letteratura, e cioè che *E. faecium* è molto più resistente agli antibiotici di *E. faecalis* che invece è più virulento. La resistenza agli antibiotici è stata fatale per il paziente che aveva l'*E. faecium* nell'emocoltura. Entrambi i pazienti avevano alti livelli di resistenza ai seguenti antibiotici: penicillina G (MIC  $\geq 16$ ), imipenem (MIC  $\geq 16$ ), gentamicina-500 (SYN-R), streptomina-2000 (SYN-R), teicoplanina (MIC  $\geq 16-32$ ), vancomicina (MIC  $\geq 32$ ).

Valutato l'andamento di ciascun microrganismo "sentinella" siamo andati a vedere se si fosse verificato qualche cambiamento nelle percentuali di sensibilità delle MIC; lo abbiamo fatto non solo

per MRSA e *P. aeruginosa* ma anche per altri germi che vengono tenuti sotto controllo da enti internazionali quali: European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (24) e Antibiotic Resistance Prevention and Control (ARPAC) (25).

Abbiamo inoltre indagato le variazioni percentuali delle MIC per *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. cloacae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, rispetto agli antibiotici testati nel periodo dal 01/04/2004 al 31/07/2005. Abbiamo considerato i valori ottenuti dal "rapporto cumulativo per MIC" che ci forniscono per un determinato microrganismo, le percentuali cumulative dei valori di MIC testati per ogni antibiotico da quella più bassa fino al valore di MIC più alto registrato per ogni antibiotico. In particolare abbiamo confrontato il valore percentuale fornito per ogni diluizione di MIC dalla concentrazione più bassa a quella più alta registrata per ogni antibiotico, dal 01/04/2004 al 31/12/2004 con quella dal 01/01/2005 al 31/07/2005. Nella maggior parte dei casi è stata registrata nel tempo una diminuzione delle percentuali cumulative dei valori di MIC testati per ogni antibiotico, indicando che i ceppi isolati si mostrano più resistenti verso quella concentrazione di antibiotico. In altri casi come nell'*E. faecium*, si è registrato uno spostamento della MIC verso una concentrazione superiore (da  $\leq 0.25$  a 0.5) rispetto alla concentrazione di partenza dell'anno precedente, per la Penicillina G indicando che i ceppi isolati sono più resistenti verso quella concentrazione di antibiotico; e nell'*E. cloacae* dove si è assistito allo spostamento di una concentrazione di MIC da 4 a 8 per l'associazione amoxicillina/acido clavulanico e di ben 3 concentrazioni di MIC da 2 a 8 per la cefalotina.

I dati fin qui analizzati ci hanno portato a chiederci come si è modificato nel tempo l'andamento delle sensibilità per tali germi tra gli isolati totali (reparti interni ed esterni) e quelli relativi ai soli reparti interni (figura IV); sono emerse delle differenze in linea con quanto appena descritto. Le differenze più eclatanti le abbiamo riscontrate in *E. faecium* (diminuzione significativa delle % di sensibilità per imipenem ed moxifloxacina per gli isolati 2004/2005 totali), *K. pneumoniae* (diminuzione delle % di sensibilità nel tempo per la maggior parte degli antibiotici testati per gli isolati 2004/2005 totali, con variazioni significative per gli isolati 2004 int/2005 int) e *P. aeruginosa* (diminuzione delle % di sensibilità nel tempo per amikacina, aztreonam, ceftazidime, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, piperacillina, ticarcillina/ac.clavulanico per gli isolati 2004/2005 totali, con variazioni significative per amikacina, aztreonam, ceftazidime, ciprofloxacina, gentami-

cina, imipenem, piperacillina, ticarcillina/ac.clavulanico negli isolati 2004 int/2005 int).

## CONCLUSIONI

Il fenomeno della resistenza agli antibiotici costituisce oggi un problema globale e di notevole impatto clinico ed economico in ambito sanitario. Nel 1999 la resistenza agli antibiotici è stata inclusa dal Consiglio dell'Unione Europea tra le priorità sanitarie da affrontare, e nel 2001 è stata emanata una risoluzione denominata "strategia contro la minaccia microbica" in cui al primo posto tra gli interventi per il contenimento di questo fenomeno, è indicata l'istituzione o il rafforzamento di sistemi di sorveglianza, su scala nazionale o internazionale, che consentano di raccogliere dati di antibiotico resistenza affidabili e comparabili, ai quali integrare anche dati sull'uso e sulle prescrizioni degli antibiotici stessi.

L'adozione di un sistema di sorveglianza (intesa come attività mirata a monitorare nel tempo specifici parametri di salute in una determinata popolazione al fine di attivare tempestivamente opportuni interventi preventivi e di controllo (12) (figura V), costituisce il primo passo per identificare i problemi locali e le priorità, e valutare l'efficacia dell'attività di controllo delle infezioni, e si propone di considerare i seguenti aspetti:

- identificare a livello di specie i patogeni responsabili dell'infezione (microrganismi "sentinella" o "alert" microorganisms) e valutarne il pattern di resistenza,
- identificare tempestivamente la presenza di epidemie (aumento statisticamente significativo della frequenza di specifiche infezioni),
- identificare infezioni endemiche selezionate in base alla loro prevedibilità,
- valutare la frequenza di ricorso a specifiche procedure invasive,
- valutare l'utilizzo di antibiotici.

Un sistema di sorveglianza deve rispettare i seguenti criteri (21): semplicità, flessibilità (consentire opportune modifiche quando appropriate), accettabilità (valutabile del livello di partecipazione, qualità dei risultati), tempestività, costanza (utilizzo di definizioni standard, metodologia), sensibilità e specificità (richiesta di precise definizioni e di personale qualificato per le ricerche).

Da questo studio è emerso come il laboratorio può rappresentare un'ottima ed economica fonte informativa per identificare i microrganismi "sentinella", per monitorare le resistenze agli antibiotici, per identificare le epidemie sostenute da un unico microrganismo.

Infatti, il laboratorio di microbiologia ha un ruolo chiave nella ricerca sistematica dei microrganismi "sentinella" rappresentando un'ottima ed econo-

mica fonte informativa per identificare microrganismi “pericolosi”, monitorare le resistenze ed identificare le epidemie sostenute da un unico microrganismo.

Perché ciò sia possibile è necessario che:

- il laboratorio concordi con i reparti specifici protocolli per l’appropriatezza della richiesta e l’esecuzione di indagini microbiologiche, protocolli di prelievo e trasporto del campione (sede di prelievo, tempi, modalità di raccolta, conservazione e trasporto);
- venga definito un modulo di richiesta esami che contenga alcuni dati di base (data di ricovero, data di insorgenza dei sintomi);
- venga controllata la qualità degli esami di laboratorio (controlli di qualità interni ed esterni);
- il laboratorio sia dotato di un sistema elettronico di analisi dei dati, in grado di identificare per ciascun paziente solo il primo isolamento da uno specifico materiale e di produrre alcune analisi standard (confronto sistematico degli antibiotici, confronto del numero di isolamenti in un periodo di tempo precedente confrontabile, ecc.). In assenza di questi requisiti è difficile ottenere dati utili alla sorveglianza delle infezioni (2).

La sorveglianza delle resistenze batteriche implica di conoscere la frequenza e la diffusione dei cloni multiresistenti che sono causa di infezioni più difficili da trattare, l’impiego di una terapia empirica ragionata sull’informazione dei pattern di resistenza locali, e l’attenzione sulle resistenze permette che un unico evento di una resistenza nuova nell’ospedale possa essere delimitata e controllata, evitando la diffusione ospedaliera. Quindi è importante tener conto della terapia (difficile o di seconda linea) in funzione della resistenza o meno agli antibiotici, e della diffusibilità del microrganismo isolato.

Infine, dall’analisi dell’andamento delle antibiotico resistenze nel tempo in relazione anche ai cambiamenti di MIC per specifici antibiotici, è emersa l’esigenza di monitorare anche altri germi oltre a quelli riportati in figura III, ed in particolare *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, ed i batteri produttori di ESBL, anche alla luce delle indicazioni fornite da alcuni enti internazionali sulla sorveglianza dei microrganismi “sentinella” come per esempio l’European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) (24) e l’Antibiotic Resistance Prevention and Control (ARPAC) (25) (tabella 3).

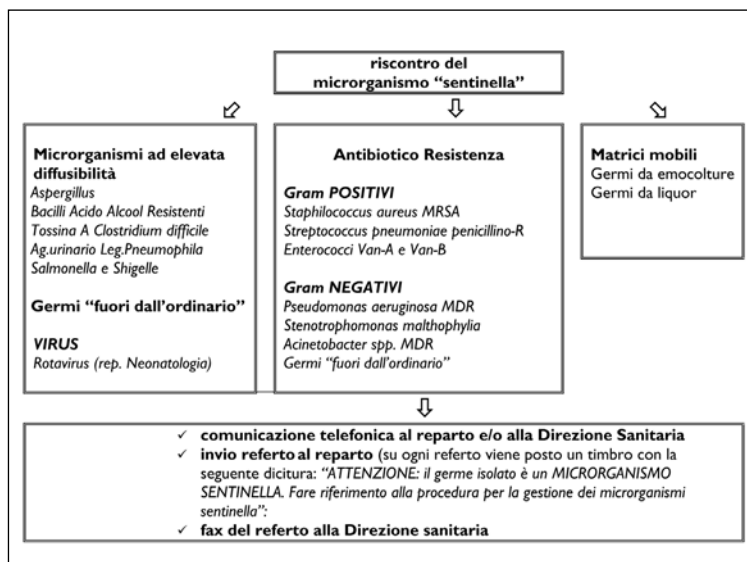
In seguito a tale monitoraggio e alla

raccolta di dati futuri potrebbe essere interessante osservare l’eventuale evoluzione delle resistenze agli antibiotici in ceppi isolati dallo stesso paziente (ricoverato in reparti a lunga degenza) in tempi diversi, allo scopo di verificare la possibile acquisizione di fenotipi di resistenza e la trasmissione orizzontale della resistenza tra patogeni in particolare per i germi Gram negativi.

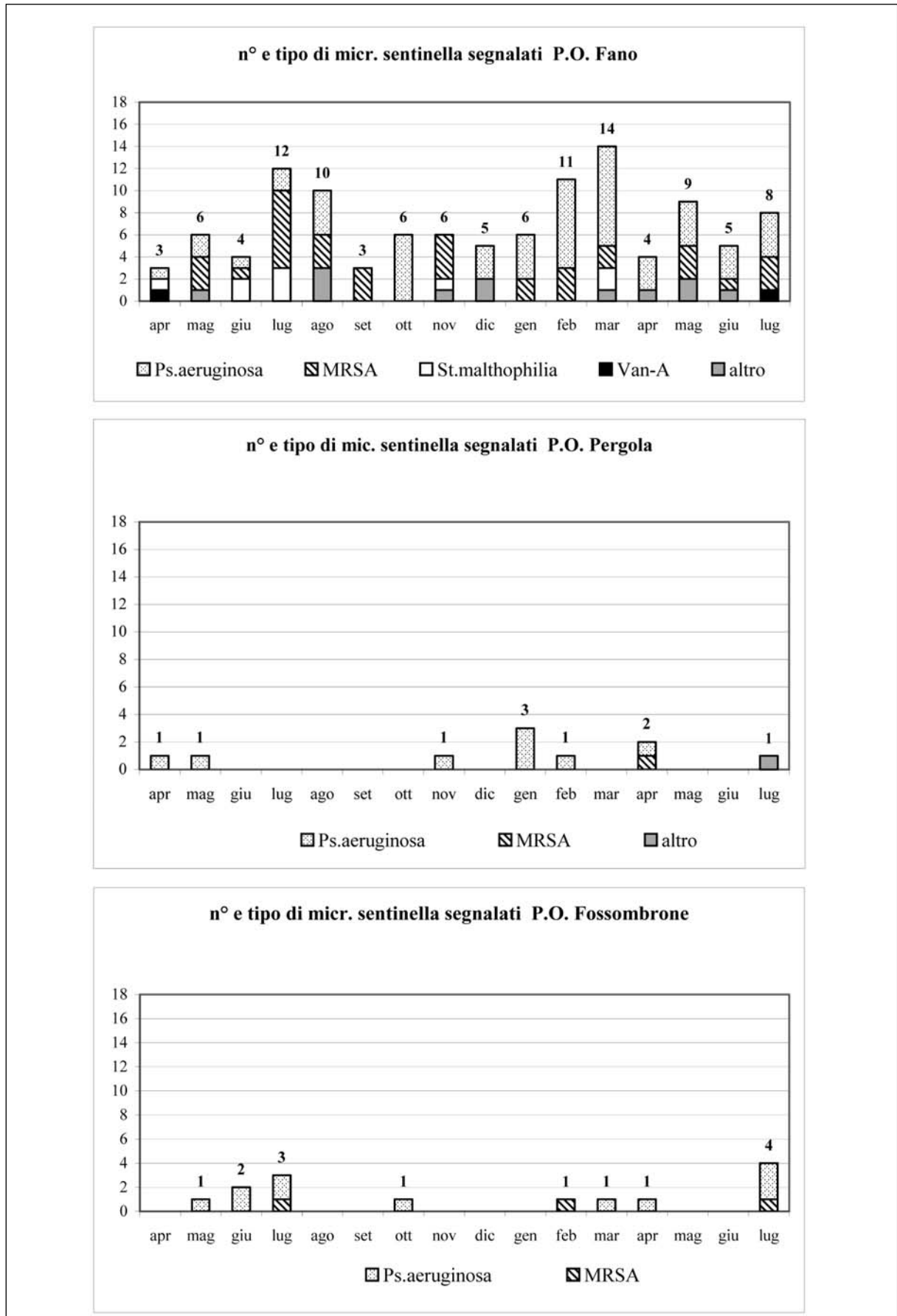
Per quanto riguarda l’uso appropriato degli antimicrobici, il cui obiettivo è quello di assicurare una prescrizione efficace ed economica per ridurre al minimo la selezione dei microrganismi resistenti, è quindi indispensabile una stretta collaborazione e interscambiabilità di informazioni tra microbiologo, Direzione Sanitaria, reparti e farmacia, ognuno per le sue competenze.

In conclusione, vogliamo proporre un suggerimento per contenere e monitorare nel tempo lo sviluppo delle antibiotico resistenze, cioè quello di fornire un referto “criptato”, cioè un referto nel quale il microbiologo, in accordo con i reparti e con il piano aziendale per una corretta politica dell’uso degli antibiotici, pur testando tutta la gamma di antibiotici a disposizione per un certo microrganismo, fornisce solo il risultato degli antibiotici di prima scelta per combattere il microrganismo “X”, sia esso o meno un germe “sentinella”, avvalendosi della possibilità di aumentare il numero di antibiotici refertati se il germe risulta resistente a quelli di prima scelta.

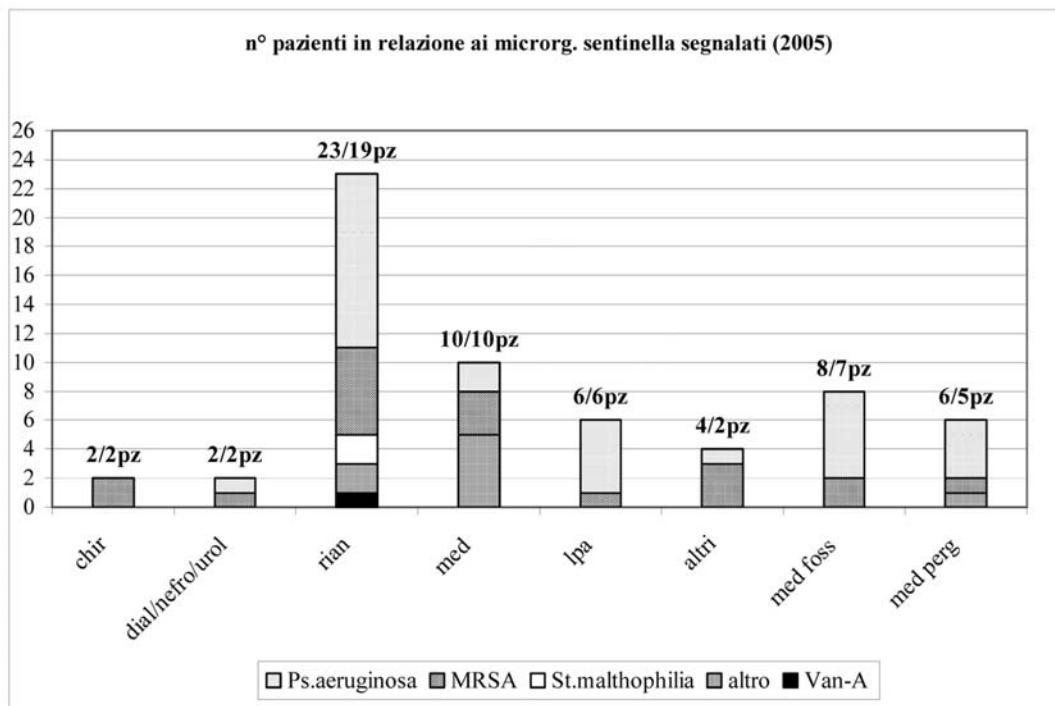
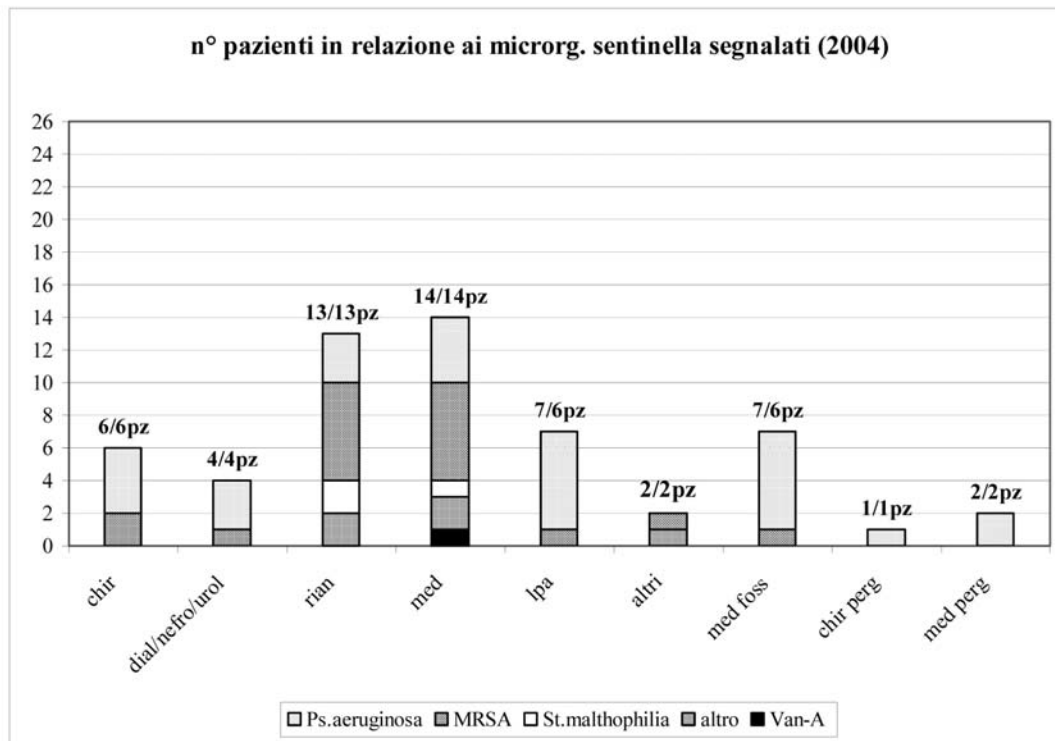
Naturalmente questa scelta deve essere discussa e valutata in accordo con i rappresentanti del C.I.O., con la prospettiva di adottare “protocolli per la razionalizzazione dell’uso degli antibiotici” ad hoc per ogni reparto.



**Figura I.** Elenco dei microrganismi “sentinella” e modalità di segnalazione ai reparti e alla Direzione Sanitaria.

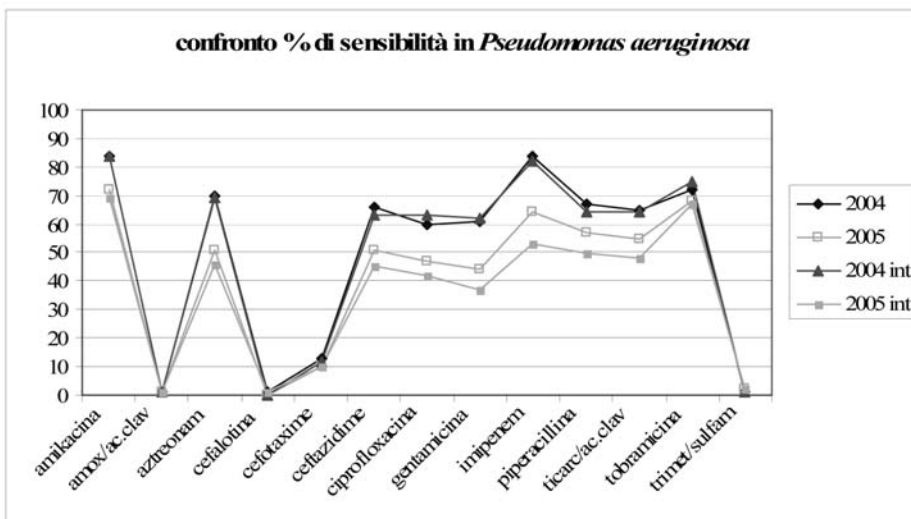
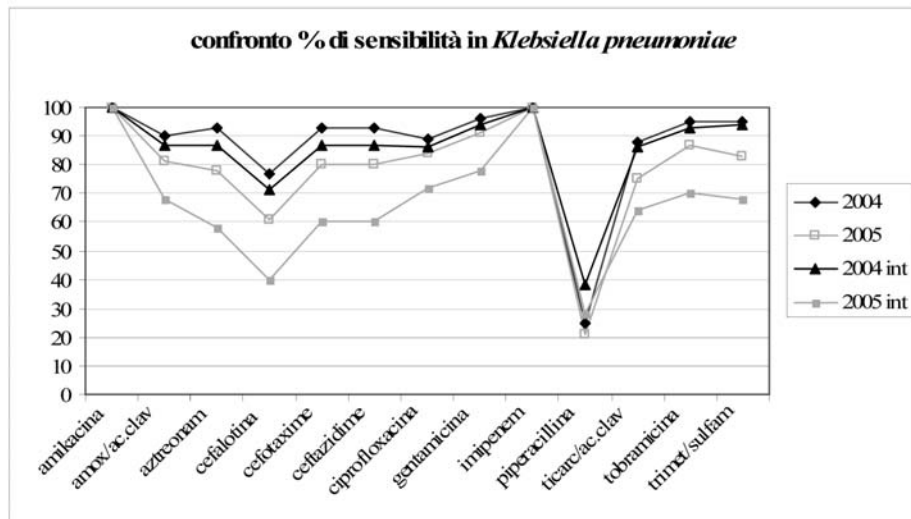
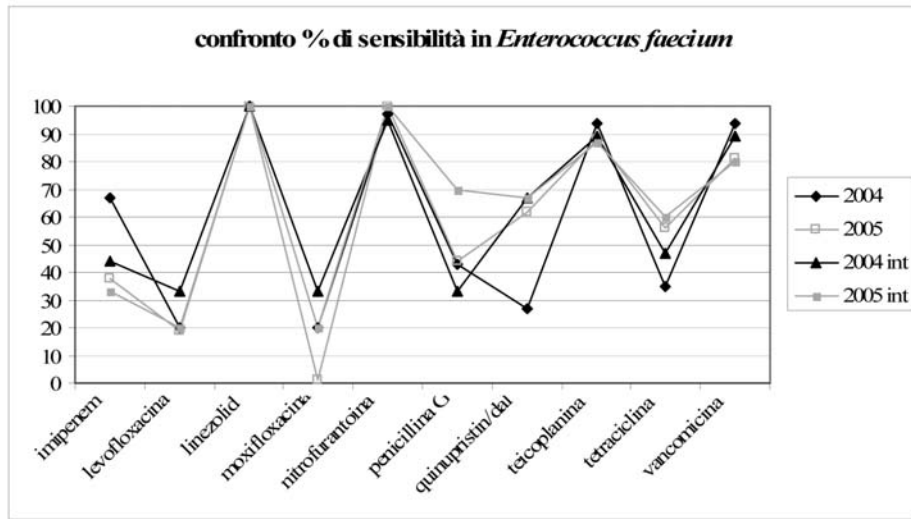


**Figura II.** Numero e tipo di microrganismi "sentinella" segnalati nei P.O. di Fano, Fossombrone e Pergola nel periodo dal 01/04/2004 al 31/07/2005.

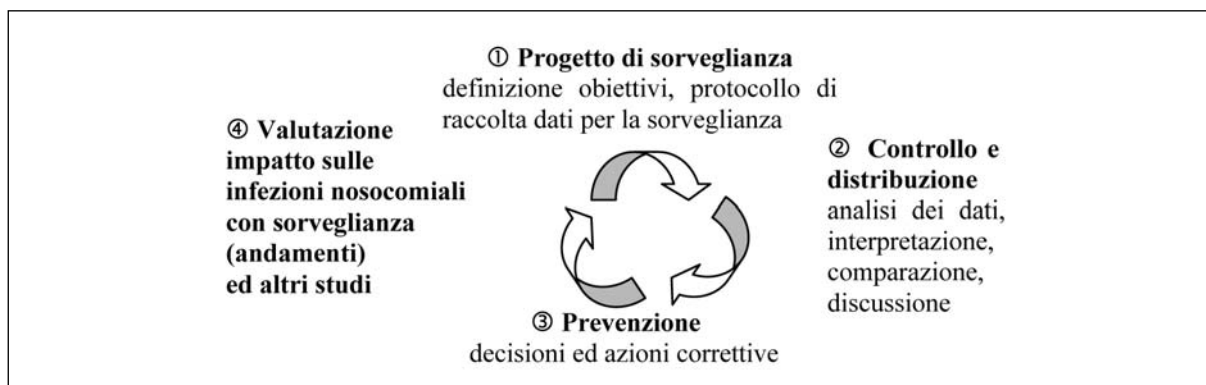


**Figura III.** Distribuzione dei microrganismi "sentinella" isolati in relazione al numero di pazienti (n° germi/ n° pz), segnalati nei 3 P.O. nel periodo dal 01/04/2004 al 31/07/2005.





**Figura IV.** Andamento delle antibiotico resistenze in diversi microrganismi in relazione agli isolati 2004/2005 da pazienti interni ed esterni.

**Figura V.** La sorveglianza: un processo circolare**Tabella 1.** Numero di richieste/anno, numero di isolati e percentuale di microrganismi "sentinella" segnalati dal 01/04/2004 al 31/07/2005, nei reparti interni di maggior interesse distinti per materiale.

Materiali	Numero richieste			Numero Isolati *			N° (%**) Germi "sentinella"		
	Fano	Foss.	Perg.	Fano	Foss.	Perg.	Fano	Foss.	Perg.
Urine	7414	740	323	817	135	114	28(3.4%)	12(8.9%)	5(4.4%)
Broncoaspirati	774	/	/	191	/	3	39(20.4%)	/	2(66.7%)
Espettorati	69	8	13	23	/	2	7(30.4%)	/	1(50.0%)
Emocolture	1354	146	134	355	33	25	8(0.3%)	/	/
Catetere	108	2	5	30	2	5	3(10.0%)	/	1.(20.0%)
Ferite	92	3	5	125	8	13	12(3.0%)	2(25.0%)	/
Liq. peritoneali	236	/	5	66	/	2	2(100.0%)	/	/
Liquor	69	/	4	2	/	1	2(0.0%)	/	/
Feci	2246	195	88	30	3	1	/	/	/
Materiali vari	438	37	152	111	1	6	1 (0.9%)	/	/

\* i valori riportati si riferiscono agli isolati per i quali è stato eseguito un antibiogramma nel nostro laboratorio. Sono esclusi isolati quali: bacillo di Koch, antigene urinario di Legionella pneumophila, miceti (Aspergillus spp., Mucorales spp.), tossina "A" di Clostridium difficile.

\*\* I valori percentuali si riferiscono al numero di isolati per categoria di materiale rispetto al numero totale di isolati

**Tabella 2.** Distribuzione dei microrganismi "sentinella" segnalati nel periodo dal 01/04/2004 al 31/07/2005, in relazione al reparto ed al numero di pazienti coinvolti.

Reparto	n° pz	Gram positivi	Gram negativi	Altro
<b>2004</b>				
Chirurgia	6	2 MRSA	4 P. aeruginosa	
Dial/Nefro/Urol	4	1 MRSA	3 P. aeruginosa	
Rianimazione	13	6 MRSA	3 P. aeruginosa	1 C. sporogenes
			4 S. malthophilia	1 Aspergillus spp.
Medicina	14	6 MRSA	4 P. aeruginosa	1 Y. enterolitica
		1 Van-A	1 S. malthophilia	1 ToxA C. difficile
Lungodegenza	6	1 MRSA	6 P. aeruginosa	
Altri	2	1 MRSA	1 Salmonella gr.C	
Medicina Foss	6	1 MRSA	6 P. aeruginosa	
Chirurgia Perg	1		1 P. aeruginosa	
Medicina Perg	2		2 P. aeruginosa	
	<b>54</b>	<b>18 MRSA</b> <b>1 Van-A</b>	<b>29 P. aeruginosa</b> <b>5 S. malthophilia</b>	
<b>2005</b>				
Chirurgia	2	2 MRSA		
Dial/Nefro/Urol	2	1 MRSA	1 P. aeruginosa	
Rianimazione	19	6 MRSA	12 P. aeruginosa	1 Aspergillus spp.
		1 Van-A	2 S. malthophilia	1 Mucorales spp.
Medicina	10	3 MRSA	2 P. aeruginosa	4 A. Legionella
				1 ToxA C. difficile
Lungodegenza	6	1 MRSA	5 P. aeruginosa	
Altri	2	3 MRSA	1 P. aeruginosa	
Medicina Foss	7	2 MRSA	6 P. aeruginosa	
Medicina Perg	5	1 MRSAz	4 P. aeruginosa	1 ToxA C. difficile
	<b>56</b>	<b>19 MRSA</b> <b>1 Van-A</b>	<b>31 P. aeruginosa</b> <b>2 S. malthophilia</b>	

**Tabella 3.** Microrganismi e antibiotico resistenze monitorate dai Sistemi di sorveglianza EARSS e ARPAC.

Germe	EARSS	ARPAC
<i>S. aureus</i>	MRSA	MRSA
<i>S. pneumoniae</i>	Penicillina I o R Eritromicina R Ciprofloxacina R	Penicillina R
<i>E. faecalis/E. faecium</i>	Vancomicina R Aminoglicosidi HLR Ampicillina R	Vancomicina R
<i>E. coli</i> / <i>K. pneumoniae</i>	Aminopenicillina R Cefalosporine III° gen. R Aminoglicosidi R Fluorochinoloni R	Quinoloni R ( <i>E. coli</i> ) Cefalosporine R ( <i>K. pneumoniae</i> )
<i>P. aeruginosa</i>	Carbapenemi R Aminoglicosidi R Quinoloni R Cefalosporine II-II° gen. R	Carbapenemi R Aminoglicosidi R Quinoloni R Cefalosporine II-II° gen. R
<i>Acinetobacter baumannii</i>		Carbapenemi R
<i>Clostridium difficile</i>		Tossina A

### RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il Dott. Aldo Ricci, Direttore della Zona Territoriale N°3 di Fano, estremamente attento al controllo delle Infezioni Ospedaliere, per i preziosi suggerimenti forniti sugli aspetti organizzativi relativi al problema della gestione dei microrganismi "sentinella".

### BIBLIOGRAFIA

- Barry AL, Thornsberry C. Susceptibility testing: Diffusion test procedure. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ Jr, Truant JP. Manual of Clinical Microbiology, 6<sup>th</sup> Edition. American Society for Microbiology, Washington DC, 2003.
- Braga A, Goglio A, Marchiano G, Moro ML. Sorveglianza e controllo delle infezioni ospedaliere. Manuale per il microbiologo clinico. Tipografia Galimberti, Milano, 1989.
- Chopra I, Hodgson J, Metcalf B, Poste G. To search for antimicrobial agents effective against bacteria resistant to multiple antibiotics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1997; 41: 497-503.
- Circolare del Ministero della Sanità N. 52 / 1985.
- Circolare del Ministero della Sanità N. 8 / 1988.
- Costantini M, Donasi PM, Turrin MG, Diana L. Hospital acquired infections surveillance and control in intensive care services. Results of an incidence study. Eur J Epidemiol 1987; 3 (4): 347-355.
- Dianzani F, Zampieri A. The Italian research Council and hospital infections. Chemioterapia 1987; 6 (3): 161-163.
- Gallo IA, Petrosillo N, Celletti S, et al. Microbiological control of hospital infection. Ann IG 1989; 1 (3-4): 761-767.
- Gaynes R and Culver D. National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) System Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the United States, 1975-1996 (abstract 727). In Proceedings of the 35th, annual meeting of the Infectious Diseases Society of America (San Francisco) Alexandria VA: IDSA, 1997; 206.
- Greco D, Moro ML. Surveillance activity in Italy. Chemioterapia 1987; 6 (3): 156-160.
- Greco D. The development of infection control in Italy. J Chemother 1989; 1: 28-31.
- Langmuir AD, Farr W. Founder of modern concepts of surveillance. International Journal of Epidemiology 1976; 5: 13-18.
- Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. Clinical Infectious Diseases 2003; 36 (Suppl 1): S11-23.
- Manuale di Microbiologia: Raccolta di Procedure Speciali ed Istruzioni Operative. Laboratorio Analisi Ospedale Santa Croce Fano.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing. Sixteenth informational supplement: M100-S16, 2006; 26 (1).
- 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. Clinical Infectious Diseases 2002; 34 (Suppl 3): S78-84.
- Orefici G, Greco D. Hospital Infections: the state of the art in Italy. Infect Control 1981; 2 (2): 149-150.
- Piano Sanitario Nazionale 1998-2000. Gazzetta Ufficiale 10 dicembre 1998; 288 S.O.
- Piano Sanitario Nazionale 2003-2005. Gazzetta Ufficiale 18 giugno 2003; 139 S.O.
- Study on the Efficacy of Nosocomial Infectio Control (SENIC). SWISS -NOSO 2000; 7 (3).
- Thacker SB et al. A method for evaluation systems of epidemiological surveillance. World Health Statistic Quart, 1988; 41: 11-18.
- Tenover FC. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview. Clinical Infectious Diseases 2001; 33 (Suppl 3): S 108- 115.
- Wood MJ, Moellering RC. Microbial resistance: bacteria and more. Clinical Infectious Diseases 2003; 36 (Suppl 1): S 2-3.
- www.earss.rivm.nl : European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS).
- www.esamid.org : Antibiotic Resistance Prevention and Control (ARPAC).