



UNIVERSITÀ DI PISA

Sede aggregata Università degli Studi di Siena

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia

Dipartimento di Biotecnologie Mediche

U.O.C. Microbiologia e Virologia

(Direttore Prof.ssa Maria Grazia Cusi)

**Sorveglianza attiva di *Enterobacteriaceae* multiresistenti
presso l'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese**

Relatori

Chiar.ma Prof.ssa Maria Grazia Cusi

Dott.ssa Stefania Cresti

Tesi di Specializzazione
Benedetta Rossi

A.A. 2013-2014

INDICE

INTRODUZIONE	Pag.1
Meccanismi di resistenza ai β -lattamici	Pag.1
β -lattamasi	Pag.2
Evoluzione delle β -lattamasi	Pag.3
AmpC acquisite nelle <i>Enterobacteriaceae</i>	Pag.5
ESBL nelle <i>Enterobacteriaceae</i>	Pag.6
Carbapenemasi nelle <i>Eterobacteriaceae</i>	Pag.7
Diffusione delle carbapenemasi	Pag.9
Diffusione delle ESBL e delle carbapenemasi in Europa e in Italia	Pag.10
Controllo della diffusione di infezioni da patogeni multiresistenti	Pag.14
	Pag.15
MATERIALI E METODI	
Sistema di sorveglianza presso l'azienda ospedaliera universitaria senese (A.O.U.S.)	Pag.15
Segnalazione alert	Pag.15
Sorveglianza attiva	Pag.16
Disegno dello studio	Pag.17
Raccolta e semina dei tamponi rettali	Pag.18
Identificazione degli isolati, rilevazione ed identificazione delle ESBL e delle carbapenemasi	Pag.19
Banca Dati	Pag.19
Valutazione dell'efficacia del sistema di	Pag.20

sorveglianza attiva	Pag.21
ABBREVIAZIONI	Pag.22
RISULTATI	
Tamponi rettali di <i>screening</i> effettuati per la ricerca di <i>Enterobacteriaceae</i> MDR (TRS) e numerosità dei pazienti sottoposti a <i>screening</i>	Pag.22
Prevalenza di <i>Enterobacteriaceae</i> MDR nei TRS	Pag.24
Infezioni da <i>Enterobacteriaceae</i> MDR e relazione con la colonizzazione intestinale.	Pag.26
Relazione tra isolati clinici E-MDR e TRS	Pag.27
Prevalenza di di <i>E. coli</i> produttore di ESBL e <i>K. pneumoniae</i> produttrice di ESBL, KPC o MBL nei campioni clinici	Pag.28
Incidenza di emocolture positive per <i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> MDR	Pag.29
Valutazione dell'efficacia del sistema di sorveglianza attiva	Pag.30
DISCUSSIONE	Pag.34
BIBLIOGRAFIA	Pag.38

INTRODUZIONE

Dalla seconda metà del XX secolo il trattamento e la prevenzione delle malattie infettive e delle infezioni sono cambiati radicalmente grazie allo sviluppo e all'impiego degli antibiotici. L'impiego diffuso e continuo degli antibiotici ha portato alla comparsa di ceppi resistenti a tali molecole. L'utilizzo continuo degli antibiotici, infatti, ha favorito la pressione selettiva, la moltiplicazione e la diffusione dei ceppi resistenti, rendendo più difficile il trattamento delle infezioni. Nelle infezioni correlate all'assistenza sanitaria, che insorgono e si diffondono all'interno di ospedali e altre strutture sanitarie, sono comparsi patogeni resistenti a più antibiotici contemporaneamente (multidrug resistance - MDR), (1) che ne rendono difficile il trattamento. La resistenza agli antibiotici è influenzata da molteplici fattori: l'aumentato impiego e l'utilizzo improprio di questi farmaci, la diffusione di infezioni sostenute da microrganismi resistenti in ambito ospedaliero ed il limitato controllo di queste infezioni, un aumento dei viaggi internazionali, che favorisce la diffusione di tali ceppi *etc.* La comparsa di fenomeni di resistenza è stata particolarmente rapida per i β -lattamici, la classe di antibiotici che comprende penicilline, cefalosporine, cefamicine, carbapenemi e monobattami, che sono tra gli antimicrobici più utilizzati.

MECCANISMI DI RESISTENZA AI β -LATTAMICI

I principali meccanismi di resistenza ai β -lattamici sono:

- modificazione del bersaglio, dovuta, per esempio, ad eventi di ricombinazione che riducono l'affinità alle *penicillin binding proteins* (PBPs)
- ridotto accesso al farmaco per impermeabilità della membrana esterna o per sistemi di efflusso attivo
- inattivazione dell'antibiotico mediata dall'espressione di enzimi (β -lattamasi) (2)

La modificazione del bersaglio, dovuta frequentemente a mutazioni che riducono l'affinità del bersaglio per il farmaco o per aggiunta enzimatica di gruppi chimici (gruppi acetili, adenili, fosfati ecc), è un meccanismo che previene l'interazione del farmaco con il bersaglio senza comprometterne la funzione biologica (3).

La ridotta permeabilità della membrana esterna batterica può essere dovuta a mutazioni che causano una mancata o diminuita espressione di porine, come avviene nella resistenza ai carbapenemi in *Pseudomonas aeruginosa* (4).

I sistemi di efflusso attivo, invece, sono pompe in grado di espellere determinate classi di farmaci antibatterici utilizzando come fonte di energia l'ATP o il gradiente protonico di membrana (5).

Il meccanismo di resistenza per inattivazione del farmaco è dovuto alla produzione di enzimi che degradano la molecola di antibiotico. Questo meccanismo è frequentemente coinvolto nella resistenza ai β -lattamici, agli aminoglicosidi e al cloramfenicolo (6).

β -LATTAMASI

Nei batteri Gram negativi la resistenza ai β -lattamici è dovuta principalmente all'espressione di β -lattamasi. In letteratura sono state identificate oltre 400 differenti β -lattamasi, isolate da numerose specie batteriche (7). Questi enzimi possono seguire due classificazioni:

- classificazione funzionale (classificazione di Bush, Jacoby e Medeiros) (8), che le divide in gruppi in base ai gruppi funzionali (numerati da 1 a 4) ed in sottogruppi (indicati con lettere) in base all'attività nei confronti dei diversi substrati e degli inibitori (acido clavulanico, sulbactam e tazobactam)

- classificazione molecolare (di Ambler), che, in base alla loro struttura primaria, individua 4 classi (A, B, C, D) (9):

A	TEM, SHV, CTX-M, GES, KPC, PER, VEB, SME, PCI
B	IMP, VIM, IND, NMD
C	CMY, FOX, ACT, DHA, MOX MIR, ACC, CFE, LAT
D	OXA

Tab. 1: classificazione di Ambler delle β -lattamasi (Rice LB 2012; Mayo Clini Proc 87(2):198-208)

EVOLUZIONE DELLE β -LATTAMASI

Le prime β -lattamasi che sono state identificate sono state alcune penicillinasi a spettro ristretto, che si sono sviluppate in relazione all'impiego dell' ampicillina per le infezioni da Gram negativi. L'aumento della produzione di tali enzimi, come TEM-1 in *Escherichia coli* e SHV-1 in *Klebsiella pneumoniae*, ha portato allo sviluppo di nuovi β -lattamici (cefalosporine, carbapenemi e aztreonam) che non venivano idrolizzati dalle penicillinasi. Negli anni '80 è emersa la resistenza alle cefalosporine ad ampio spettro (10), soprattutto in *K. pneumoniae*, dovuta a mutazioni puntiformi dei geni codificanti per TEM e SHV(10).

L'accumulo di mutazioni, solitamente in combinazione con un'aumentata espressione dovuta a cambiamenti nel promotore e un ridotto accesso dei β -lattamici per riduzione delle porine, ha causato una resistenza ad alto livello alle cefalosporine ad ampio spettro (11,12). La maggior parte delle mutazioni ha indotto modificazioni nel sito attivo dell'enzima, rendendolo più affine alle cefalosporine ad ampio spettro, ma con una debole azione nei confronti dell'ampicillina (10). Sebbene, escluse poche eccezioni, queste mutazioni determinano la sensibilità degli enzimi agli inibitori delle β -lattamasi stesse, a causa della produzione enzimatica elevata e, spesso, "multipla" di vari enzimi, gli isolati che portano queste mutazioni risultano clinicamente resistenti alle combinazioni β -lattamico-inibitore delle β -lattamasi (13). Queste β -lattamasi a spettro esteso (ESBL), inoltre, sono inattive nei confronti dei carbapenemi (14).

Vista la ridotta attività di questi enzimi nei confronti delle penicilline, la loro ipersensibilità agli inibitori e la inefficacia nei confronti dei carbapenemi, in seguito alla

comparsa di isolati produttori di ESBL si è optato per l'impiego terapeutico delle penicilline in combinazione con gli inibitori delle β -lattamasi o dei carbapenemi, rispetto alle cefalosporine.

Alla fine degli anni '80 si è assistito alla comparsa e diffusione delle β -lattamasi a spettro esteso denominate CTX-M (15). Questi enzimi, che derivano da un enzima cromosomico di *Kluyvera* spp., sono cefalosporinasi naturali e si sono diffusi rapidamente in altre specie, comprese *K. pneumoniae* ed *E. coli* (16). Le β -lattamasi CTX-M sono ESBL naturali che hanno come substrato elettivo il cefotaxime rispetto al ceftazidime. Questa forte attività nei confronti del cefotaxime è dovuta alla geometria del sito di legame per i β -lattamici, che riconosce in maniera più efficiente le penicilline, le cefalosporine a spettro ristretto ed il cefotaxime, rispetto al ceftazidime, che è una molecola più ingombrante (17,18). In Italia CTX-M risultano le ESBL più diffuse (19,20).

Più recentemente si sono sviluppate e diffuse le carbapenemasi (21, Fig. 1), β -lattamasi in grado di idrolizzare con varia efficienza le penicilline, le cefalosporine nella maggior parte dei casi, i carbapenemi ed i monobattami, questi ultimi con l'eccezione delle metallo- β lattamasi (MBL).

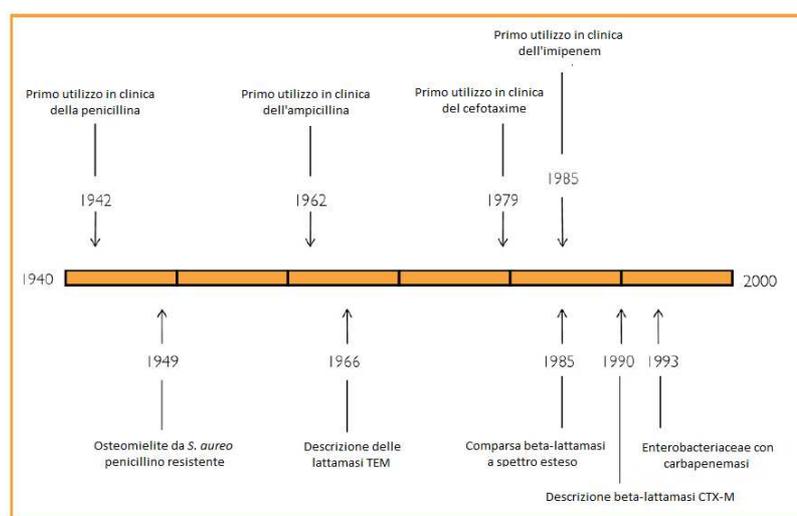


Fig. 1: Uso delle diverse classi di antibiotici e pubblicazione del primo articolo sulla resistenza ai differenti antibiotici o su una nuova classe di β -lattamasi (Rice LB 2012; 87(2):198-208)

AmpC ACQUISITE NELLE *ENTEROBATTERIACEAE*

Le cefalosporinasi di tipo AmpC sono β -lattamasi di classe C, che idrolizzano le peniciline, le cefalosporine (anche quelle di terza generazione, ma solitamente non quelle di quarta) ed i monobattami. Generalmente le AmpC sono poco inibite dagli inibitori delle β -lattamasi, soprattutto dall'acido clavulanico (9) che, anzi, può talvolta funzionare da induttore.

I primi isolati produttori di AmpC acquisite sono stati identificati alla fine degli anni '80 e si sono poi diffusi in tutto il mondo sia per espansione clonale che per trasferimento genico orizzontale. Le AmpC acquisite sono codificate da geni plasmidici (AmpC plasmidiche) (22-24).

Esistono varie "linee" di geni mobili codificanti per AmpC, originati da geni dei produttori naturali, chiamati *Enterobacter group* (MIR e ACT), *Citrobacter freundii group* (CMY-2, LAT, CFE), *Morganella morganii group* (DHA), *Hafnia alvei group* (ACC), *Aeromonas group* (CMY-1, FOX, MOX) e *Acinetobacter baumannii group* (ABA). Gli enzimi più diffusi sono CMY-2, ma anche DHA sono molto diffusi (22). Le principali specie che producono AmpC acquisite sono *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e *Proteus mirabilis*, isolati sia da pazienti (ospedalizzati o no), da animali e da cibo (*E.coli* e *S. enterica*). Le AmpC acquisite sono comunque meno diffuse rispetto alle ESBL, anche se il numero degli organismi produttori di tali enzimi è in aumento (22-26).

Molte *Enterobacteriaceae* ed altri batteri Gram negativi producono AmpC naturali, alcune costitutive a bassi livelli (*E. coli*, *Acinetobacter baumannii*), altre inducibili (*Enterobacter spp*, *C. freundii*, *M. morganii* e *P. aeruginosa*). La derepressione o l'iperproduzione di AmpC naturali può però conferire alta resistenza alle cefalosporine e alle combinazioni penicilline-inibitori. Nelle *Enterobacteriaceae* spesso le cefalosporinasi di classe C sono acquisite e sono espresse costitutivamente, conferendo

una resistenza simile a quella dei mutanti derepressi o iperproduttori di AmpC. Il livello di resistenza dipende dalla quantità di enzimi espressi e dalla co-presenza di altri meccanismi di resistenza.

ESBL NELLE *ENTEROBACTERIACEAE*

Le ESBL sono enzimi in grado di idrolizzare la maggior parte delle penicilline e cefalosporine, comprese gli ossimino- β -lattami (cefuroxime, cefalosporine di terza e quarta generazione e aztreonam), ma non idrolizzano le cefamicine ed i carbapenemi. La maggior parte delle ESBL appartengono alle β -lattamasi di classe A e sono inibite dagli inibitori delle β -lattamasi (acido clavulanico, sulbactam e tazobactam) (27).

Il primo ceppo produttore delle ESBL è stato identificato nel 1983 e tale resistenza si è progressivamente diffusa in tutto il mondo a causa dell'espansione clonale degli organismi produttori, del trasferimento genico orizzontale per mezzo di plasmidi e, più raramente, per insorgenza *de novo*. I gruppi clinici di ESBL più diffusi sono gli enzimi CTX-M, seguiti dalle ESBL derivate da SHV e TEM (28-31). Fanno parte delle ESBL anche alcune classi di enzimi di classe D che derivano dalle OXA sulle quali l'attività inibente da parte degli inibitori delle β -lattamasi è più debole che sulle altre ESBL (27).

La produzione di ESBL è stata osservata soprattutto nelle *Enterobacteriaceae*, inizialmente in ambito ospedaliero, successivamente nelle Residenze Sanitarie Assistite (RSA) o in Centri di Riabilitazione e dal 2000 in ambito comunitario (pazienti non ricoverati, portatori sani, animali sani o malati, cibo). *E. coli* e *K. pneumoniae* sono le specie che producono più frequentemente ESBL, ma tutte le *Enterobacteriaceae* di rilevanza clinica possono essere produttrici di ESBL. La prevalenza di isolati produttori di tali enzimi dipende da molti fattori, quali la specie, la localizzazione geografica, il tipo di infezione ecc. (28,29,32,33). La maggior parte di ESBL sono enzimi acquisiti,

codificati da geni plasmidici, vengono espressi a vari livelli e mostrano differenti caratteristiche biochimiche e diversa attività nei confronti dei β -lattamici (per es. cefotaxime, ceftazidime, aztreonam). Il livello di espressione, le proprietà enzimatiche e la presenza di altri meccanismi di resistenza (altre β -lattamasi, sistemi di efflusso, alterata permeabilità...) determinano una grande varietà di fenotipi di resistenza (27-30,34,35).

CARBAPENEMASI NELLE *ENTEROBACTERIACEAE*

I carbapenemi, β -lattamici con lo spettro d'azione più ampio nei confronti dei Gram negativi, vengono idrolizzati molto lentamente dalla maggior parte delle β -lattamasi e per tale motivo, fin dalla loro introduzione negli anni '80, questi antibiotici sono stati impiegati con successo e sono stati utilizzati contro i batteri multiresistenti. Negli anni '80 nelle *Enterobacteriaceae* sono state individuate le carbapenemasi, enzimi che idrolizzano le penicilline, in molti casi le cefalosporine e a vari gradi i carbapenemi ed i monobattami. Le carbapenemasi appartengono alle classi A, B e D delle β -lattamasi (36). Alle carbapenemasi di classe A la β -lattamasi KPC (*K. pneumoniae* carbapenemasi), così chiamata perché identificata per la prima volta in *K. pneumoniae* (37). I ceppi che producono tale enzima, diffusi in tutto il mondo, sono resistenti a tutti i β -lattamici e insensibili agli inibitori. Gli enzimi KPC sono generalmente portati da trasposoni, pertanto possono essere trasferiti a differenti specie, infatti geni codificanti per KPC, inizialmente identificati in *Enterobacteriaceae*, ed in particolare *K. pneumoniae*, più recentemente, sono stati ritrovati anche in *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* group (38,39,40).

Carbapenemasi di classe B sono le metallo- β -lattamasi, che richiedono la presenza di un metallo, solitamente zinco, come cofattore e pertanto possono essere inibite in presenza di chelanti come EDTA. Questi enzimi, a differenza di KPC, non idrolizzano

l'aztreonam.

Le beta lattamasi OXA appartengono alla classe D. Solamente alcune OXA agiscono come carbapenemasi e sono, ad esempio, responsabili della resistenza ai carbapenemi in *Acinetobacter spp* (41). Come le altre carbapenemasi anche le OXA non sono sensibili all'azione degli inibitori delle β -lattamasi. La maggior parte delle carbapenemasi sono enzimi acquisiti, codificati da elementi trasponibili localizzati su plasmidi, espressi a vario livello (42). Tali enzimi possiedono caratteristiche biochimiche diverse e differente attività nei confronti dei β -lattamici. I diversi livelli di espressione, di attività β -lattamasica e l'associazione con altri meccanismi di resistenza (altre β -lattamasi, pompe di efflusso e/o alterata permeabilità di membrana) porta ad un ampio spettro di fenotipi di resistenza (42,43). E' necessario poi ricordare che nelle *Enterobacteriaceae* la ridotta sensibilità ai carbapenemi può essere dovuta alla produzione di ESBL o AmpC associate ad una ridotta permeabilità per perdita delle porine (44).

La maggior parte delle carbapenemasi conferisce resistenza alle cefalosporine ad ampio spettro (45), ma non OXA-48. I produttori di OXA 48 spesso esprimono però altri enzimi che idrolizzano le cefalosporine e per tale motivo risultano comunque resistenti a tali molecole.

Carbapenemasi	Classe molecolare	Substrato	Inibitori
KPC	A	Tutti i β -lattamici	- Acido boronico - Parzialmente inibita da acido clavulanico e tazobactam
IMP VIM NDM	B (metallo β -lattamasi)	Penicilline, cefalosporine, carbapenemi	Acido dipicolinico
OXA-48 OXA-181	D	Penicilline Carbapenemi cefalosporine ad ampio spettro (ceftazidime e aztreonam) con bassa cinetica	-

Tab. 2: classificazione delle principali carbapenemasi con i relativi substrati ed inibitori (modificato da Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. N. Engl. J. Med. 2005;352:380-391)

DIFFUSIONE DELLE CARBAPENEMASI

Fino al 2000 la produzione di carbapenemasi non era stata descritta nelle *Enterobacteriaceae*, infatti fino a quel momento la resistenza ai carbapenemi riportata occasionalmente in enterobatteri era dovuta ad iperproduzione di AmpC o produzione di ESBL associata a perdita di porine. Nel 2001 è stato pubblicato il primo lavoro su *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi per produzione di carbapenemasi (46). Questo ceppo era stato isolato nel 1996 in un reparto di terapia intensiva di un ospedale del North Carolina, ma è stato caratterizzato solamente anni dopo, identificandolo come produttore di KPC. Fino al 2004 sono stati riportati in letteratura solo pochi isolati produttori KPC, ma negli anni successivi le segnalazioni sono aumentate rapidamente. Tra il 1996 ed il 2006 *K. pneumoniae* produttrice di KPC si è diffusa dagli Stati Uniti in maniera endemica in molti altri Paesi, in particolare in Israele (47,48), Grecia (49, 50) ed Italia (50).

La famiglia degli enzimi VIM (Verona *integron-encoded metallo-beta-lattamases*) è stata riportata per la prima volta nel 1999 (51), in un ceppo di *Pseudomonas aeruginosa*, isolato nel 1997 in Italia, ma la prima *Enterobacteriaceae* produttrice di tale enzima è stata isolata in Grecia nel 2001 (52). La diffusione di *Enterobacteriaceae* produttrici di VIM è limitata all'Italia (53), a certe zone della Spagna (54) e alla Grecia (55). La comparsa di KPC e VIM è stata seguita da quella di NDM (*New Delhi metallo-beta-lattamase*), diffusasi nel Sub continente indiano e da quella di OXA-48 nei bacini Est e Sud del Mediterraneo. La diffusione di questi quattro enzimi ha portato ad un'elevata endemia di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi (CRE) in tutto il mondo.

DIFFUSIONE DELLE ESBLE E DELLE CARBAPENEMASI IN EUROPA ED IN ITALIA

E. coli è il batterio Gram negativo che più frequentemente viene isolato da emocolture ed urinocolture. In tutta Europa continua ad aumentare la percentuale di isolati resistenti agli antibiotici più comuni e la maggior parte degli isolati è resistente ad almeno uno degli antimicrobici sotto sorveglianza (β -lattamici, fluorochinoloni, aminoglicosidi, polomixine). In base ai dati dell'EARS-Net (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), dal 2012 al 2014 la media europea degli isolati di *E. coli* resistenti alle cefalosporine a spettro esteso è aumentata nella maggior parte dei Paesi europei, passando da una media dell'11,9% ad una media del 25%.

In Toscana sia nel 2013 che nel 2014 *E. coli* è risultato il patogeno batterico più frequentemente isolato da emocolture (32,5%). Nel 2014 la percentuale media regionale di resistenza alle cefalosporine a spettro espanso è stata del 41,3%, più alta della media italiana (28,7%). In Europa solo l'Italia ed alcuni paesi del Mediterraneo hanno mostrato valori così alti, anche se la media europea ha mostrato un incremento significativo dal 2010 al 2014. (EARS-Net 2014, Fig. 2).

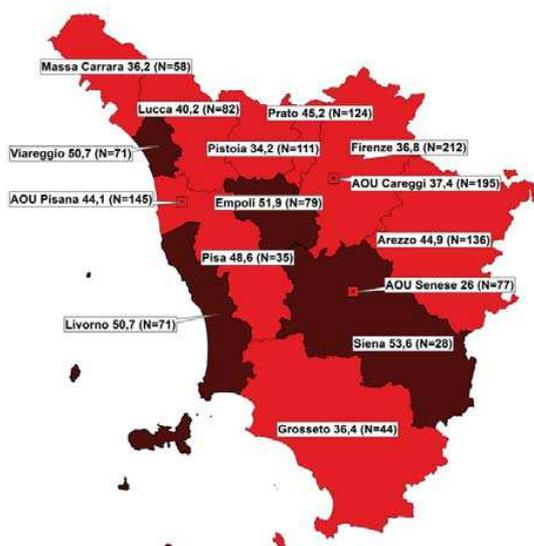




Fig. 2: *E. coli*: percentuale (%) di isolati resistenti a Cefalosporine di III generazione nei territori delle aziende sanitarie toscane (Toscana, 2014) e nei paesi europei (2014) -valore medio regionale: 41,3%; valore medio italiano: 28,7%

K. pneumoniae è causa di infezioni in soggetti immunocompromessi o con CVC e soprattutto di infezioni del tratto urinario, respiratorio e di setticemie. *K. pneumoniae* diffonde rapidamente tra i pazienti in ambiente ospedaliero e l'aumento di ceppi resistenti lo ha reso un patogeno di importanza pubblica in tutta Europa. Secondo L'EARS - Net del 2014 la maggior parte degli isolati è risultata resistente ad almeno un antibiotico sotto sorveglianza (β -lattamici, fluorochinoloni, aminoglicosidi, polomixine) e si sono riscontrate frequentemente resistenze multiple. Dal 2009 al 2012 è infatti aumentata la percentuale di isolati resistenti alle cefalosporine di terza generazione, ai fluorochinoloni e agli amminoglicosidi. In Europa si stanno diffondendo rapidamente anche ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi, in precedenza i pochi antibiotici efficaci contro i ceppi multiresistenti.

In Toscana nel 2014 la percentuale di *K. pneumoniae* resistenti alle cefalosporine di terza generazione è del 63,9% degli isolati e la resistenza di *K. pneumoniae* verso i carbapenemi ha una percentuale media del 46,2% (Fig.3). In alcune aree della regione le resistenze ai carbapenemi si riscontrano in oltre il 50% degli isolati di *K. pneumoniae*

(Fig.4). La Toscana presenta una media superiore a quella italiana riportata per il 2013 (34,3%), che a sua volta, dopo la Grecia, rappresenta il più alto valore in Europa (Fig. 4).

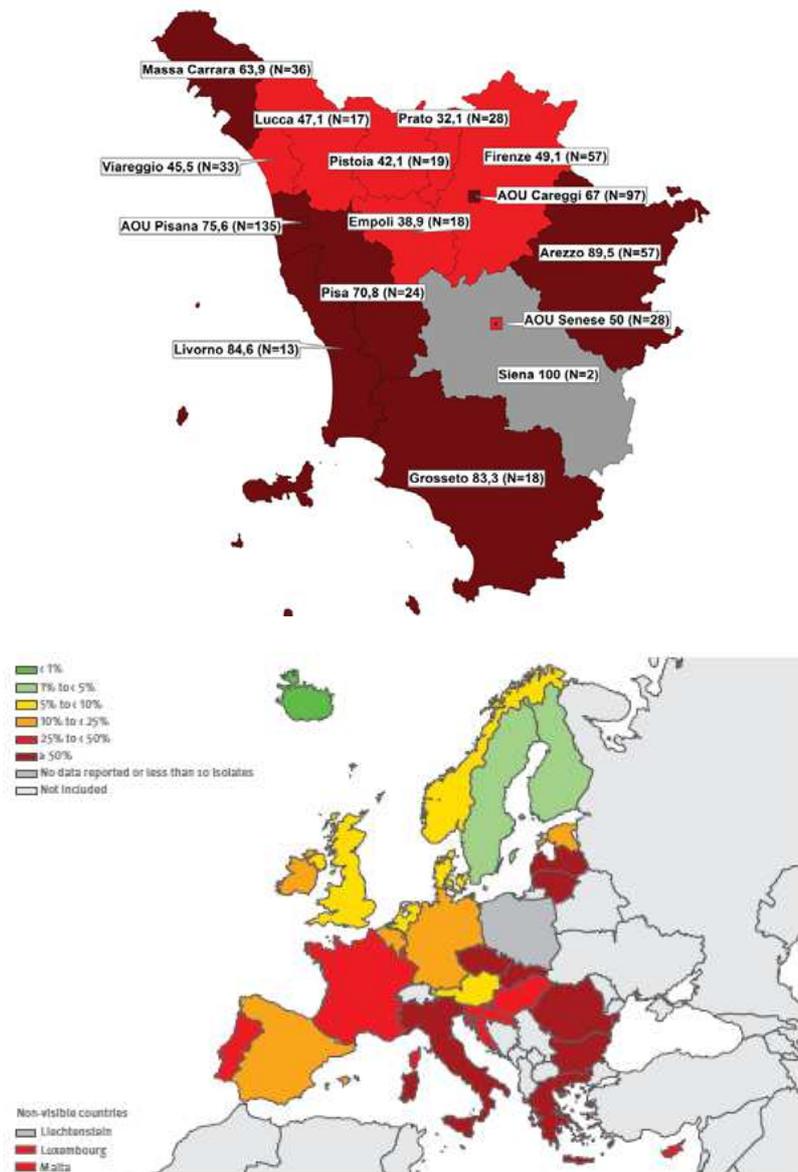


Fig. 3: percentuale (%) di isolati di *K. pneumoniae* resistenti alle cefalosporine di III generazione nei territori delle Aziende sanitarie toscane (Toscana, 2014) e nei paesi europei (2014).

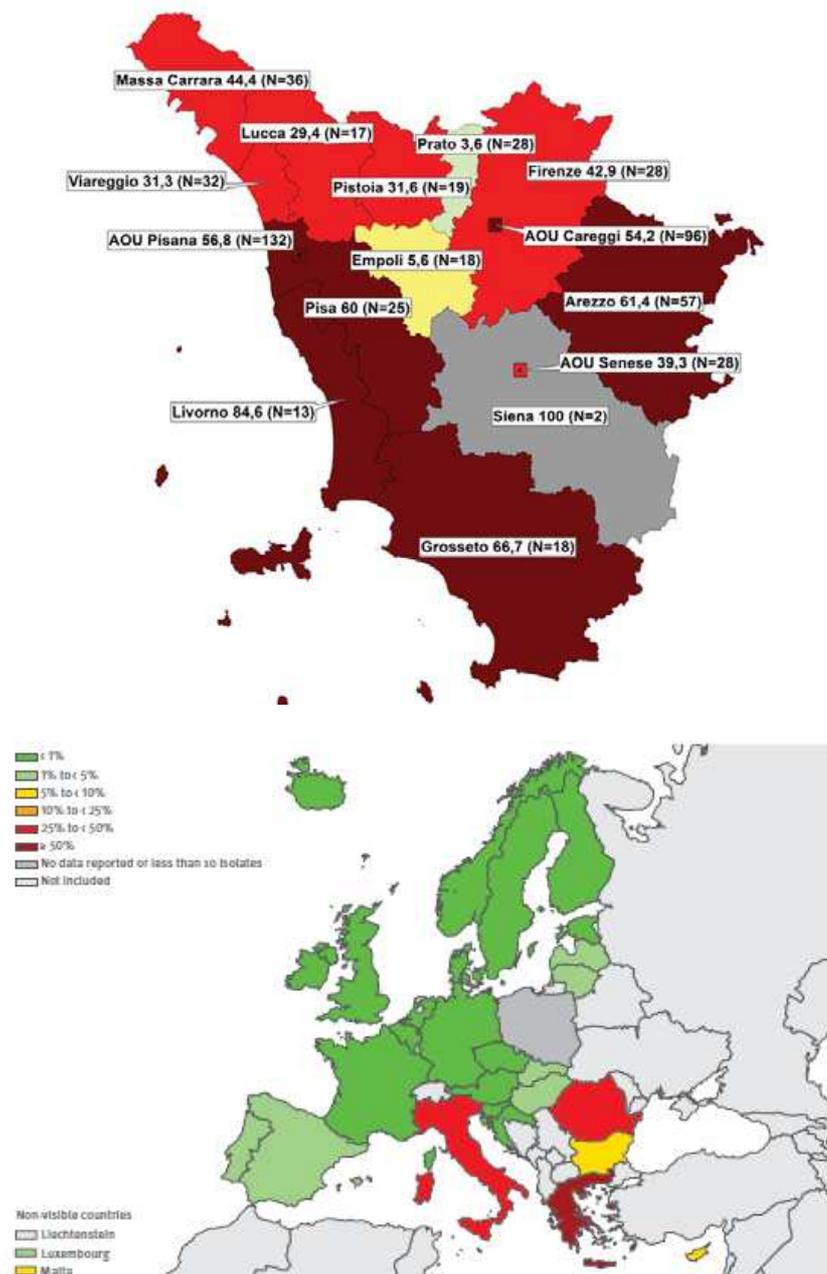


Fig. 4: percentuale (%) di isolati di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemi nei territori delle Aziende sanitarie toscane (Toscana, 2014) e nei paesi europei (2014).

CONTROLLO DELLA DIFFUSIONE DI INFEZIONI DA PATOGENI MULTIRESISTENTI

La diffusione di microrganismi multiresistenti all'interno delle Terapie Intensive e dei Reparti di degenza ha un notevole impatto in termini di fallimento della terapia, morbilità, mortalità ed aumento della degenza ospedaliera. La diffusione delle *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e soprattutto di carbapenemasi, quindi,

rappresenta un'emergenza di interesse pubblico (56). Per tale motivo sono stati sviluppati programmi per la prevenzione di tali infezioni, basati sull'identificazione precoce di pazienti portatori di ceppi multiresistenti, attraverso colture di tamponi rettali (57-59) e l'adozione di tempestive misure di contenimento di diffusione di infezioni sostenute da tali patogeni (isolamento funzionale, igiene delle mani, pulizia e decontaminazione dell'ambiente ecc.) (60,61). Per contrastare la diffusione delle CRE sono state messe a punto linee guida da numerose istituzioni internazionali (Center for disease control, Health Protection Agency, European Center for Disease Prevention and Control) (59,62,63). Il programma di sorveglianza, oltre allo *screening* microbiologico, prevede una tempestiva comunicazione dell'esito, l'applicazione delle misure di isolamento standard e da contatto ai pazienti infetti/colonizzati, verifica quotidiana della corretta applicazione delle misure di isolamento presso le UU.OO. coinvolte e, se possibile, far assistere i pazienti colonizzati/infetti da personale sanitario dedicato. Assume, pertanto, una fondamentale importanza l'educazione e la formazione del personale sanitario sulle misure di sorveglianza e controllo delle infezioni da CRE. Il programma di sorveglianza, inoltre, prevede l'attivazione di un'indagine epidemiologica in caso di infezione o di un incremento inatteso delle positività, strumenti di comunicazione (una U.O. che trasferisce un paziente colonizzato/infetto deve darne comunicazione telefonica alla Struttura Sanitaria accogliente), un flusso informativo (segnalazione del primo caso di colonizzazione/infezione presso la struttura ospedaliera e degli eventi epidemici determinati da infezioni), la raccolta e l'elaborazione dei dati. E' stato dimostrato che questo approccio riduce le infezioni da CRE nei reparti di Terapia Intensiva e nei Reparti di Degenza (57,58,64,65) ed è raccomandato come prima strategia per ridurre la mortalità associata ad infezioni sostenute da tali patogeni (59).

MATERIALI E METODI

SISTEMA DI SORVEGLIANZA PRESSO L'AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA SENESE (A.O.U.S.)

Presso l'AOUS esiste un sistema di sorveglianza attiva per la prevenzione ed il controllo della diffusione di patogeni multiresistenti e sentinella basato sulla rapida segnalazione da parte della UOC Microbiologia e Virologia dei microrganismi *alert* cui segue l'intervento del Nucleo Operativo di Sorveglianza Epidemiologica (NOSE) nel cui ambito è istituito un *team* costituito da Epidemiologi, Infettivologi e Microbiologi Clinici. Oltre alla tempestiva segnalazione, il sistema di sorveglianza ha il suo punto di forza nel programma di sorveglianza attiva della colonizzazione da Gram negativi multiresistenti basato sullo *screening* mediante tampone rettale.

La sorveglianza nei confronti dei Gram negativi MDR messa in atto in AOUS è pertanto costituito da un insieme di misure che includono: sorveglianza attiva mediante esecuzione di tamponi rettali di *screening* della colonizzazione, sistema di segnalazione degli *alert* per via telematica al momento dell'invio del referto, che determina l'attivazione del team, implementazione di misure di isolamento funzionale, attività di formazione specifica rivolta al personale assistenziale.

Segnalazione alert

Dal 2007 è operante un sistema di segnalazione microrganismi *alert* e sentinella, la cui lista viene costantemente aggiornata. I microrganismi *alert*, sono classificati all'interno della lista, in due gruppi, a seconda del livello di potenziale di rischio clinico e/o epidemiologico. Il CCIO (Comitato Controllo Infezioni Ospedaliere) provvede a revisionare ed aggiornare la lista dei microrganismi *alert* in base alle evoluzioni epidemiologiche (comparsa di nuovi determinanti di resistenza, arrivo nel Policlinico di particolari microrganismi ecc.).

Per quanto riguarda gli enterobatteri MDR, la lista dei microrganismi *alert*, suddivisi in due livelli, è la seguente:

Alert di 1° livello (rischio basso e medio) :

- *Enterobacteriaceae* produttrici di beta lattamasi a spettro esteso (ESBL) o di enzimi di classe C acquisiti
- *Enterobacteriaceae* non sensibili ai carbapenemi (Meropenem e/o Imipenem), escluse quelle incluse nel secondo livello

Alert di 2° livello:

- *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi, sospetta produttrice di carbapenemasi KPC
- Enterobatteri probabili produttori di carbapenemasi NDM-1
- Enterobatteri probabili produttori di carbapenemasi OXA-48

L' U.O.C. Microbiologia e Virologia ha il compito di inviare il referto di microrganismi *alert*, oltre che al reparto richiedente, anche all'email dedicata (mbio.alert@local.aos) e, nel caso di microrganismi di livello allerta 2, di inviare anche un avviso di notifica al team di consulenti.

Sorveglianza attiva

Dal 2011 il programma di sorveglianza attiva, proposto dal CCIO, prevede lo *screening* di tutti i pazienti all'ingresso e settimanalmente nei reparti ad alta intensità di cura. Per altri reparti medici e chirurgici, in particolare quelli cui fanno accesso pazienti pluripatologia e/o con pregressi ricoveri in ospedale, centri di riabilitazione o Residenze Sanitarie Assistite, dovrebbero essere sottoposti a *screening*, al momento dell'ingresso, almeno i pazienti che presentano i seguenti fattori di rischio:

- Storia durante l'anno precedente di: ospedalizzazione, ammissione ad una casa

di cura, dialisi, tracheotomia o chirurgia, infezioni della pelle o della ferita chirurgica o ventilazione meccanica, cateteri permanenti (CVC, cateteri urinari ecc.), storia di pregressa infezione/colonizzazione da Gram negativi MDR.

- Ospedalizzazione superiore a 5 giorni
- Uso di antibiotici nei tre mesi precedenti (cefalosporine, chinolonici, carbapenemici)
- Immunodepressione o terapia immunosoppressiva

Per i pazienti in attesa di risultati, colonizzati o infetti viene applicato l'isolamento funzionale, che prevede nel considerare infetta l'area entro un metro tra un paziente ed un altro e l'obbligo per il personale di adottare tutte le misure di barriera previste dalle precauzioni standard, che differiscono (ad esempio da contatto e da droplet) a seconda della sede interessata (vie aeree, cute, intestino etc.), come indicato nella procedura aziendale D. 626.IO.01 redatta nell'ottobre del 2015.

In caso di positività al tampone la strategia più idonea per il monitoraggio del paziente viene valutata dal team di consulenti costituito nell'ambito del NOSE.

DISEGNO DELLO STUDIO

In questo studio sono stati analizzati i tamponi rettali effettuati nel 2014 e nel 2015 nell'ambito del programma di sorveglianza di patogeni multiresistenti, previsto dall'AOUS, per monitorare la presenza di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e carbapenemasi presso il Policlinico Santa Maria alle Scotte di Siena. Sono state inoltre valutate le infezioni causate da enterobatteri *alert* nello stesso periodo.

Le diverse UU.OO.CC. della AOUS ai fini dell'analisi epidemiologica sono state raggruppate per tipologia: UTI, comprendente le due Terapie Intensive non specialistiche, Toraco-Cardiochirurgie (inclusi trapianti cuore polmone), Area Medica, Neurochirurgia (inclusa la Neuroanestesia), Altre Chirurgie, Ematologie etc

RACCOLTA E SEMINA DEI TAMPONI RETTALI

Ai pazienti considerati a rischio di colonizzazione da *Enterobacteriaceae* multiresistenti sono stati effettuati i tamponi rettali, secondo quanto indicato nel documento dell' Emilia Romagna (66). Sono stati considerati idonei alla semina i campioni raccolti con mezzo di trasporto e non.

I tamponi rettali sono stati arricchiti in terreno liquido BHI (Brain Heart Infusion - Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) per 24 ore a 37°C, per aumentare la sensibilità dello *screening* e non perdere neppure gli MDR presenti eventualmente in basse cariche. Nel caso di mancato intorbidamento del brodo di coltura dopo l'arricchimento (indice di assenza di crescita), il campione è stato considerato non idoneo, ed il reparto è stato invitato ad eseguire un nuovo prelievo. Se il campione è stato ritenuto idoneo, è stato seminato nei seguenti terreni:

- Per la ricerca di *Enterobacteriaceae* MDR (produttrici di ESBL e carbapenemasi) Mac Conkey agar supplementato con cefotaxime (CTX) 2µg/ml. Questo terreno, preparato presso il Laboratorio e validato secondo norma ISO 9001-2015, consente la crescita di batteri Gram negativi resistenti al cefotaxime, che sono poi sottoposte al test di conferma per la produzione di ESBL o delle carbapenemasi.
- Per la ricerca di *Enterobacteriaceae* MDR produttrici di carbapenemasi e l'identificazione presuntiva delle KPC: terreno chromID™ CARBA agar (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France). ChromID™ CARBA agar è un terreno selettivo cromogeno per lo *screening* di *Enterobacteriaceae* produttrici di carbapenemasi (CPE), in particolare KPC e NDM-1, in pazienti colonizzati o a rischio di colonizzazione. Questo terreno contiene antibiotici che consentono la crescita selettiva di CPE e tre substrati cromogeni per l'identificazione presuntiva di: *E.coli* (colonie dal rosa al bordeaux), *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter* (colorazione delle colonie dal verde bluastrò al

grigio bluastrò).

Dopo la semina negli opportuni terreni le piastre sono state incubate a 37°C in aerobiosi per 24 ore.

IDENTIFICAZIONE DEGLI ISOLATI, RILEVAZIONE ED IDENTIFICAZIONE DELLE ESBL E DELLE CARBAPENEMASI

Gli isolati sospetti, cresciuti sui terreni utilizzati per lo *screening*, sono stati identificati e, se appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, sottoposti ai test di conferma.

Gli isolati sono stati identificati mediante spettrometria di massa, basata sulla tecnologia MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight), utilizzando il sistema automatico VitekMS (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

La conferma fenotipica della produzione di ESBL e di carbapenemasi, e la caratterizzazione fenotipica di queste ultime, è stata effettuata secondo i criteri EUCAST (67) con il metodo della combinazione su disco (NEO-SENSITAB ROSCO Diagnostica A/S, Taastrup, Denmark).

Sugli isolati clinici gli antibiogrammi sono stati effettuati mediante il sistema Vitek 2 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia) e la relativa *card* AST-N202 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Le MIC (*minimum inhibitory concentration*) sono state interpretate secondo le linee guida EUCAST (68).

BANCA DATI

I dati relativi agli isolati sono stati estratti dal software del laboratorio (TD Synergy, Siemens AG, Munich, Germany) ed analizzati elaborando isolati non duplicati degli anni 2014 e 2015 e prendendo in considerazione Neurochirurgie, Toraco-Cardiochirurgie, Altre Chirurgie, UTI, Ematologie e Area Medica. In questo modo sono stati valutati i dati relativi ai reparti che, come le come UTI e Neurochirurgie, effettuano

screening di routine che gli altri reparti che non aderiscono al programma in maniera continuativa, ma effettuano i tamponi di *screening* solo in caso di *outbreaks*.

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEL SISTEMA DI SORVEGLIANZA

Per valutare l'efficacia degli interventi messi in atto è stata analizzata nel dettaglio la situazione epidemiologica delle UU.OO. di Neurochirurgia e Terapia Intensiva Neurochirurgica, dai cui pazienti nel 2012 erano stati identificati i primi isolati clinici di *Klebsiella pneumoniae* produttrice di KPC in AOUS ed in cui, per questo motivo era stata poi implementata la sorveglianza. In questo caso è stata valutata la prevalenza degli isolati KPC positivi anche in relazione agli interventi di controllo intrapresi, inclusi momenti formativi specifici per il personale del reparto, distinguendo anche tra diffusione intra-reparto degli MDR e ceppi isolati da pazienti già colonizzati all'ingresso.

ABBREVIAZIONI

A.O.U.S. = Azienda Ospedaliera Universitaria Senese

CCIO = Comitato Controllo Infezioni Ospedaliere

CPE: *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*

CRE = *carbapenem-resistant Enterobacteriaceae* (*Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi)

EARS-Net = European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

E-MDR = *Enterobacteriaceae* multiresistenti

ESBL: *Extended Spectrum β Lactamases* (β Lattamasi a Spettro Esteso)

EUCAST = *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

MBL: *Metallo β Lactamase* (Metallo β Lattamasi)

MDR: *Multi Drug Resistant*, microrganismi resistenti ad almeno uno degli antibiotici di tre o più famiglie diverse (voce bibliografica 1)

MIC = *minimal inhibitory concentration*

NDM = *New Delhi metallo-beta-lattamase* (NDM Metallo β Lattamasi)

NOSE = Nucleo Operativo di Sorveglianza Epidemiologica

PBPs = *penicillin binding proteins*

RSA = Residenze Sanitarie Assistite

SART = Rete di Sorveglianza dell'Antibiotico Resistenza in Toscana

TRS: tampone rettale di *screening* per la ricerca di enterobatteri MDR produttori di carbapenemasi o ESBL

U.O. = Unità Operativa

UOC = Unità Operativa Complessa

UTI: Unità di Terapia Intensiva

VIM = Verona *integron-encoded metallo- β -lactamases* (VIM Metallo β Lattamasi)

RISULTATI

Tamponi rettali di *screening* effettuati per la ricerca di *Enterobacteriaceae* MDR (TRS) e numerosità dei pazienti sottoposti a *screening*:

Nel 2014 sono stati effettuati 4.695 TRS, mentre nel 2015 i tamponi effettuati ammontavano a 5.017. Quelli eseguiti per la ricerca *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e carbapenemasi sono stati 646 nel 2014 e 1.261 nel 2015, mentre quelli per sola la ricerca di *Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae* (CPE) sono stati 4.049 nel 2014 e 3.756 nel 2015 (Grafico 1).

TRS effettuati suddivisi per tipologia di *screening*

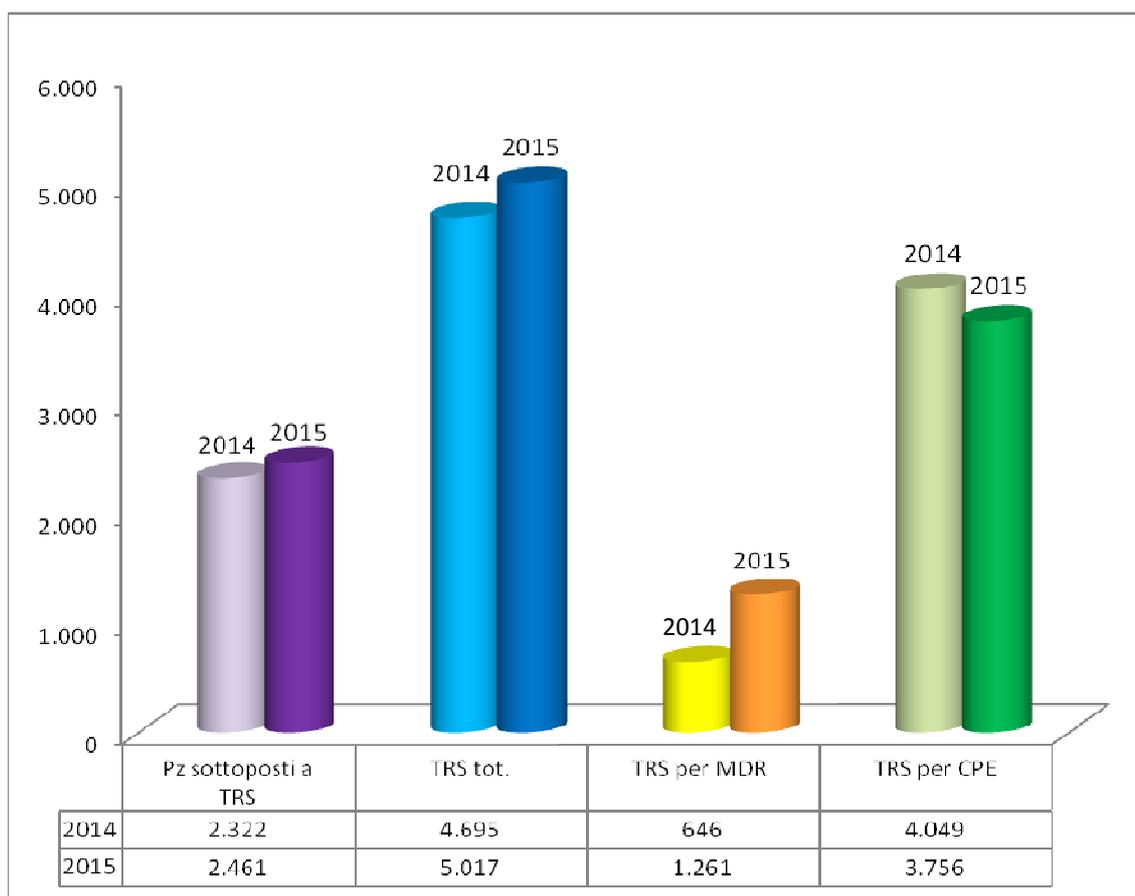


Grafico 1: numero totale di pazienti sottoposti a TRS, numero totale di TRS eseguiti e numero di TRS per la ricerca di E-MDR nel 2014 e nel 2015.

Come si può vedere nel 2015 è stato registrato solo un lieve aumento sia dei pazienti sottoposti alla sorveglianza che del numero complessivo dei TRS, ma sono quasi raddoppiati i TRS per E-MDR, come ben visualizzabile nel grafico1.

Per quanto riguarda la numerosità dei pazienti sottoposti a TRS, nel 2014 sono stati 2.322 di cui 263 per la ricerca di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e Carbapenemasi, 1.948 per la ricerca di CPE e 111 per entrambe le tipologie di *screening*. Nel 2015 sono stati sottoposti a TRS 2.461 pazienti, di cui 469 per la ricerca di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e Carbapenemasi, 1.801 per la ricerca di CPE e 191 per entrambe le tipologie di *screening* (Grafico 2).

Pazienti sottoposti a TRS per diverse tipologie di enterobatteri MDR

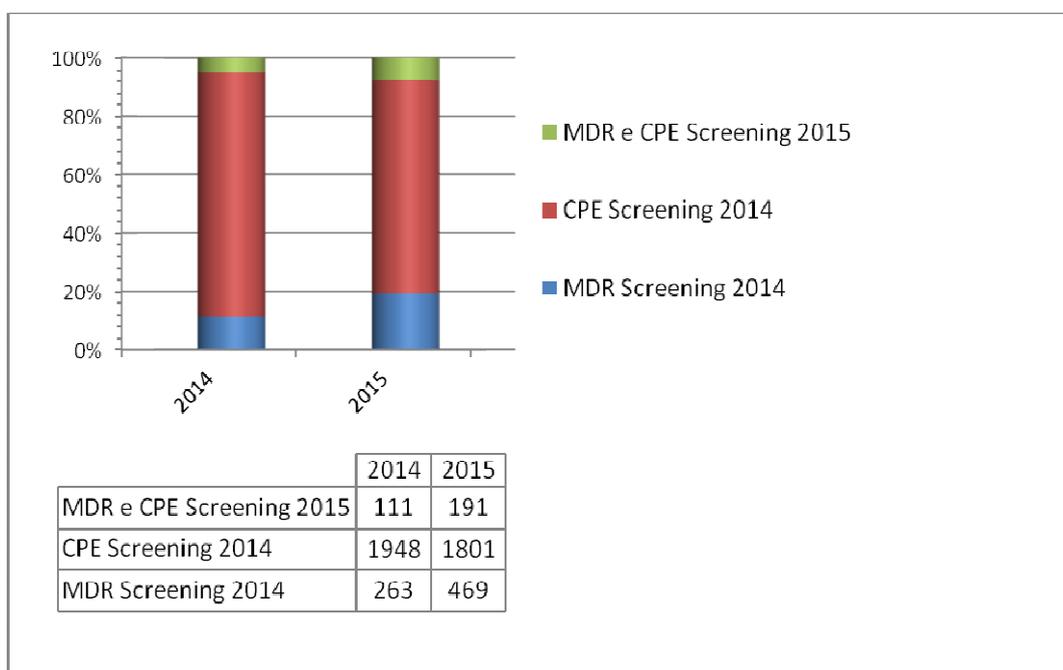


Grafico 2

Prevalenza di E-MDR nei TRS

Nel 2014 i pazienti positivi allo *screening*, per almeno un tipo di E-MDR (ESBL o Carbapenemasi produttore), sono stati 100 (4%). Se andiamo a stratificare i pazienti positivi a TRS nei vari fenotipi di resistenza possiamo osservare che il 41% è risultato positivo ad *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL, il 58% positivo per CPE e nel 2% dei pazienti sono state isolate sia *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL che CPE.

Nel 2015 il 6% di pazienti è risultato positivo al TRS per almeno un tipo di E-MDR: il 77% è risultato positivo ad *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL, 19% a CPE e, nel 5% dei pazienti, sono state isolate sia *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL che CPE (Grafico 3).

Prevalenza di pazienti positivi allo *screening* suddivisi per i diversi fenotipi di resistenza

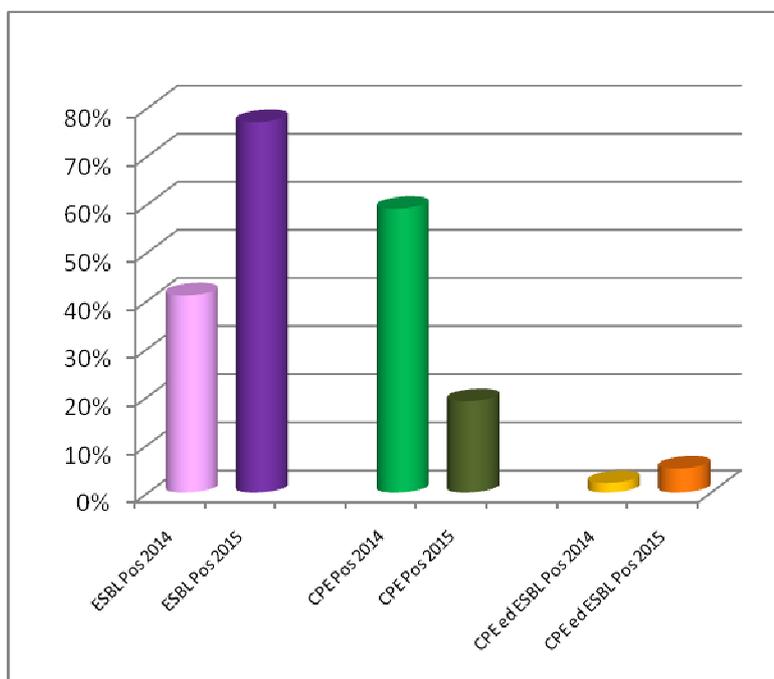


Grafico 3: percentuale di pazienti positivi allo *screening* (2014-2015)

Analizzando la provenienza dei pazienti sottoposti a TRS per tipologia di reparti, è stato registrato che nel 2014 1.479 provenivano da Neurochirurgia, 408 dalle Toraco-

Cardiochirurgie, 304 dalle UTI, 72 dalle Ematologie, 56 dall'Area Medica e 3 da Altre Chirurgie. Nel 2015, invece, 1.476 provenivano da Neurochirurgia, 409 da Toraco-Cardiochirurgie, 461 da UTI, 71 da Ematologie, 36 da Area Medica e 8 da Altre Chirurgie (Grafico 4).

Pazienti sottoposti a TRS suddivisi per reparto di provenienza

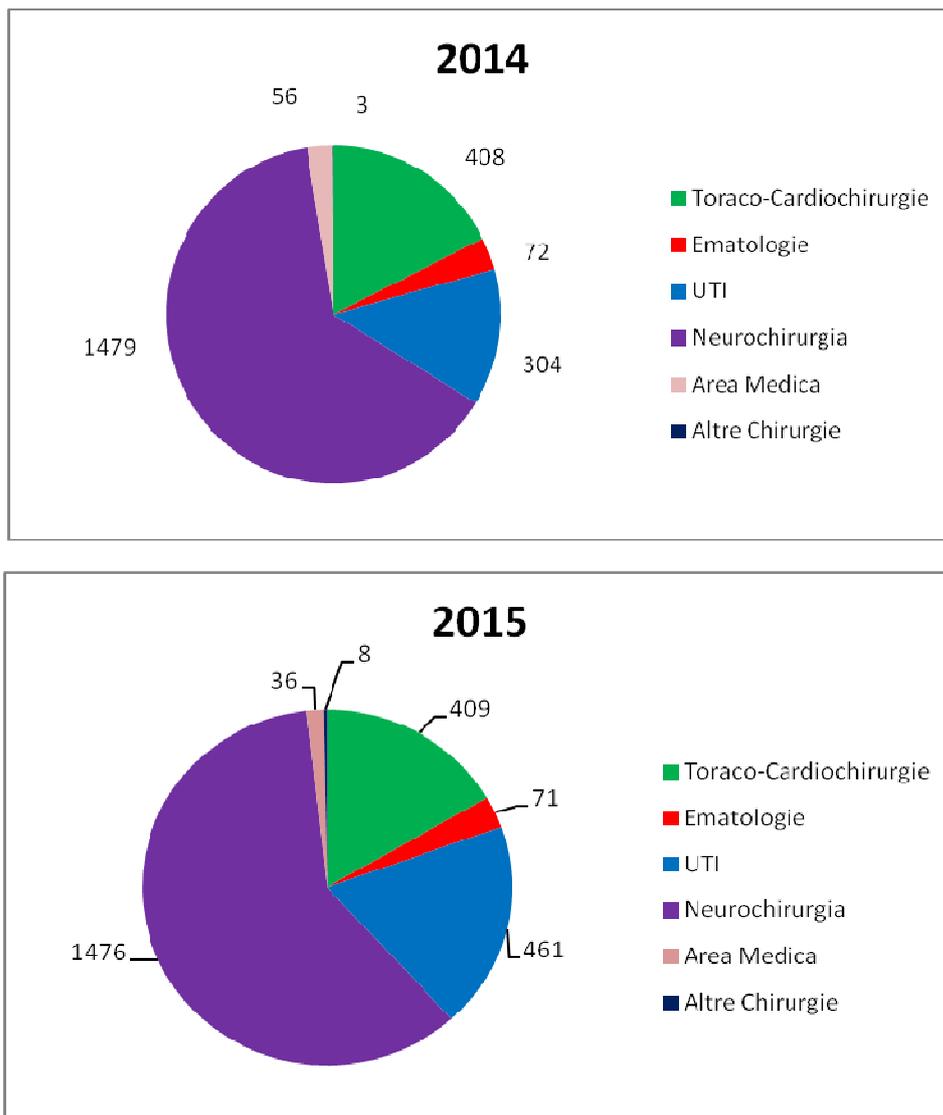


Grafico 4

Infezioni da E-MDR e relazione con la colonizzazione intestinale

Sono stati analizzati gli isolamenti di enterobatteri MDR da campioni clinici di pazienti che erano risultati precedentemente positivi a TRS per lo stesso patogeno, con lo stesso fenotipo di resistenza.

In questi pazienti, nel corso del 2014 si sono registrati 291 casi di infezione/colonizzazione da E-MDR isolati da campione clinico, mentre nel 2015 sono stati 250.

Di questi gli isolamenti da campione clinico in pazienti che avevano già un TRS positivo per lo stesso microrganismo sono stati 14 nel 2014 e 16 nel 2015 (Grafio 5).

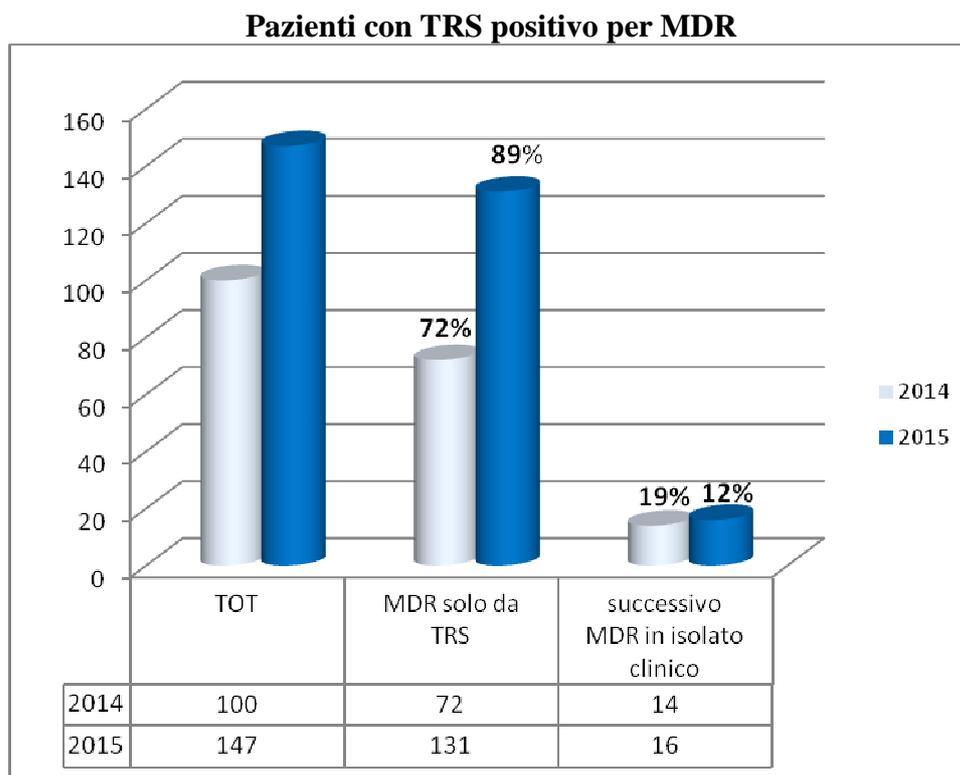


Grafico 5: Pazienti positivi allo *screening* (2014/2015) e pazienti con primo isolamento E-MDR da TRS con o senza successivo isolamento da campione clinico

Analizzando i meccanismi di resistenza degli E-MDR isolati sia da TRS che da successivo campione clinico, si è registrato che nel 2014 il 29% erano enterobatteri produttori di ESBL ed il 71% di KPC.

Nel 2015, invece, la percentuale di pazienti positivi per *Enterobacteriaceae* produttrici

di ESBL è stata del 75%, il 19% è risultato positivo a KPC e il 6% a MBL (Grafico 6).

Meccanismi di resistenza degli E-MDR isolati da TRS e da successivo campione clinico

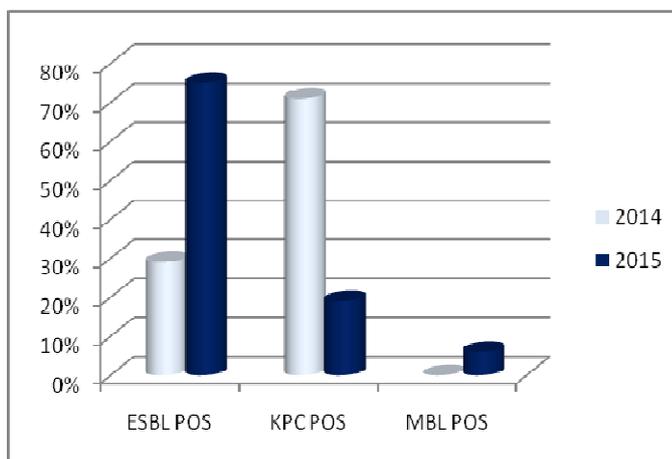


Grafico 6

Relazione tra isolati clinici E-MDR e TRS

Dei 291 pazienti che hanno avuto almeno un isolato clinico di E-MDR nel 2014, solo 81 (28%) erano stati precedentemente sottoposti a TRS. Di questi solo 14 (17%) erano però positivi allo *screening*. Nel 2015 i pazienti con infezione/colonizzazione da E-MDR sono stati 250, 33 (13%) sono stati sottoposti a TRS, ma di questi solo 16 (6%) erano positivi allo *screening*.

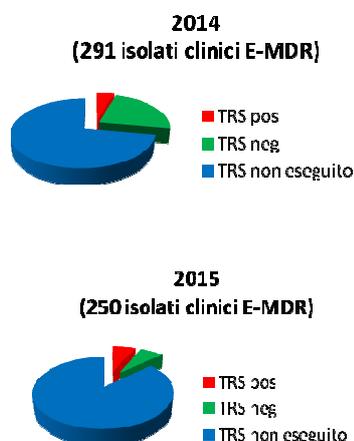


Grafico 7: Relazione tra isolati clinici e TRS (2014/2015)

Prevalenza di di *E. coli* produttore di ESBL e *K. pneumoniae* produttrice di ESBL, KPC o MBL nei campioni clinici

Nel 2014 sono stati isolati, da campioni clinici, 726 *E. coli*, di cui il 25% produttori di ESBL e 193 isolati di *K. pneumoniae* di cui il 17% produttrici di ESBL, 25% di KPC e 9% di MBL. Nel 2015 sono stati isolati 775 *E.coli*, di cui il 22% produttori di ESBL, e di *K. pneumoniae*, di cui il 26% K. produttrici di ESBL, il 10% produttrici di KPC ed il 7% di MBL (Grafico 8).

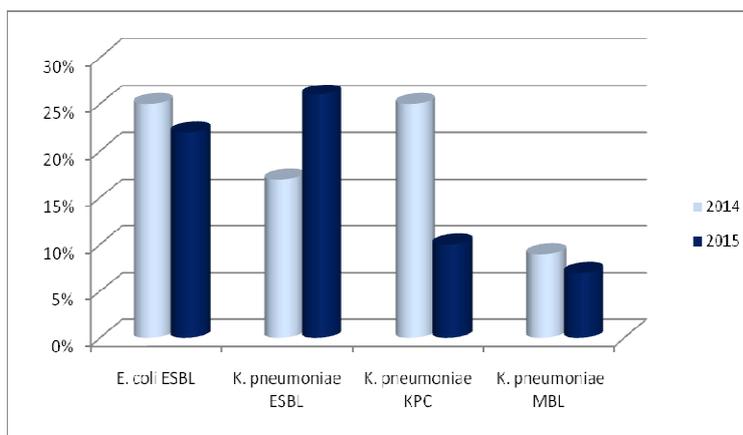


Grafico 8

Nel 2014 su un totale di 291 pazienti con infezione/colonizzazione di E-MDR 32 (11%) provenivano da UTI, 27 (9%) Neurochirurgia, 35 (12%) da Toraco-Cardiochirurgie e 4 (1%) da Ematologie, 148 (51%) da Area Medica e 45 (16%) da Altre Chirurgie. In particolare i colonizzati da ESBL in Area Medica sono state il 5% nel 2014 e l'11% nel 2015, contro, rispettivamente l'1,7% e 4,7% nei reparti ad alta intensità di cura. Nel 2015 si sono verificati 250 casi di infezioni/colonizzazioni da E-MDR di cui 17 (7%) provenienti da UTI, 17 (7%) da Neurochirurgia, 41 (16%) da Toraco-Cardiochirurgie, 5 (2%) da Ematologie e 146 (58%) da Area Medica e 24 (10%) da Altre Chirurgie (Grafico 9).

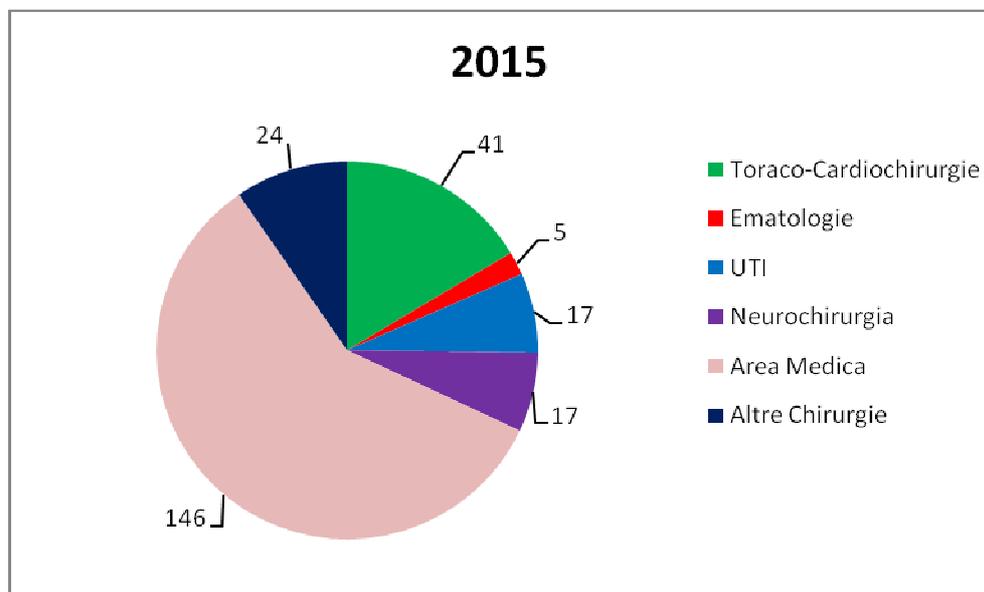
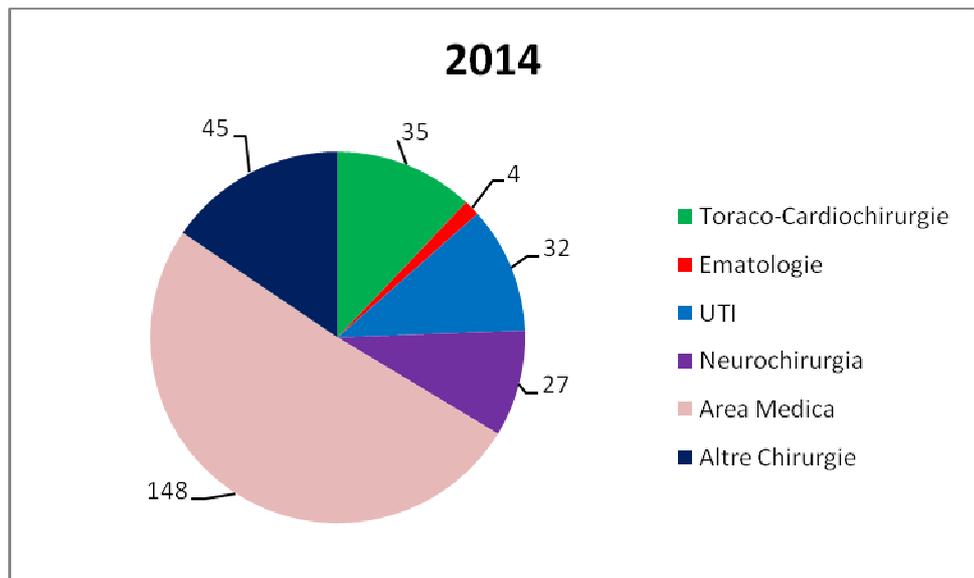


Grafico 9: pazienti con infezione/colonizzazione di E-MDR nel 2014 e nel 2015, suddivisi per reparto di provenienza

Incidenza di emocolture positive per *E. coli* e *K. pneumoniae* MDR

Nel 2014 si sono verificati 20 casi di setticemia da *E. coli* e *K. pneumoniae* produttrici di ESBL, di cui 15 (75%) provenienti da reparti di Area Medica, 3 (15%) da UTI, 1 (5%) da Neurochirurgia ed 1 (5%) da Toraco-Cardiochirurgie.

Di questi 20 pazienti 3 sono stati sottoposti a TRS, ma con esito negativo. In 6 casi (30%) l'isolamento da emocoltura è stato preceduto da isolamento da altri campioni clinici (urine, liquidi biologici), mentre la maggioranza dei casi (14, pari al 70%) l'E-

MDR è stato isolato direttamente da emocoltura.

Nel 2015 i casi di setticemia sono stati 21, di cui 10 (48%) provenienti da Area Medica, 5 (24%) da Altre Chirurgie, 3 da Ematologie (14%) e 3 (14%) da Neurochirurgia. Di questi pazienti 5 sono stati sottoposti a TRS, di cui 2 con esito positivo.

Nell'90% dei casi (19 pazienti) il primo isolamento di E-MDR è stato effettuato dall'emocoltura e nel 10% (2 pazienti) dal TRS.

Per quanto riguarda le sepsi causate da *K. pneumoniae* produttrice di KPC se ne sono registrate 6 nel 2014, di cui 2 (33%) provenienti da Area Medica, 1 (17%) da Ematologie, 1 da Toraco-Cardiochirurgie (17%) e 2 (33%) da Altre Chirurgie. Di questi 6 pazienti 2 sono stati sottoposti a TRS, 1 con esito negativo ed 1 positivo. 5 dei 6 pazienti totali (83%) hanno avuto il primo isolamento di *K. pneumoniae* produttrice di KPC da campione clinico, di cui 4 (80%) dall'emocoltura e 1 (20%) da altro campione clinico. Nello stesso anno un paziente proveniente da UTI ha sviluppato una setticemia da *K. pneumoniae* produttrice di MBL, in cui il primo isolamento è stato effettuato da emocoltura.

Nel 2015 sono stati osservati solo 2 pazienti con setticemia da *K. pneumoniae* produttrice di KPC, entrambi provenienti da UTI e di 2 pazienti con sepsi da MBL, di cui 1 proveniente da un reparto di Area Medica ed 1 proveniente da UTI. Tutti i pazienti hanno avuto il primo isolamento di *K. pneumoniae* produttrice di carbapenemasi dall'emocoltura.

Valutazione dell'efficacia del sistema di sorveglianza attiva

Le unità di Neurochirurgia e Terapia Intensiva Neurochirurgica sono state le prime UU.OO., all'interno della AOUS, ad aderire compiutamente al programma di monitoraggio e controllo della diffusione di enterobatteri MDR. Per valutare l'efficacia degli interventi messi in atto abbiamo voluto analizzare i dati relativi ai mesi successivi

a due picchi epidemici da diffusione di *K. pneumoniae* KPC produttrice, che si sono verificati al loro interno nel periodo Aprile-Agosto 2012.

A seguito di questi due episodi il NOSE ha supportato il personale delle due UU.OO. per intensificare l'attività di sorveglianza e controllo della diffusione degli E-MDR, a partire dalla tempestiva identificazione dei pazienti colonizzati e infetti, l'applicazione della procedura di isolamento funzionale, la sensibilizzazione del personale sanitario e dei visitatori, il corretto lavaggio delle mani e la detersione accurata degli ambienti di degenza. Sono stati organizzati anche due momenti formativi (settembre 2012 e luglio 2013) per richiamare i principi base della sorveglianza delle infezioni nosocomiali e, in particolare nel secondo, analizzare le modifiche comportamentali adottate e le relative conseguenze.

Da Ottobre 2012 a Novembre 2013 sono stati eseguiti 3.527 tamponi rettali su 1589 pazienti. Il tampone rettale era positivo per KPC in 77 pazienti (4,8%), di cui 16 (20,8%) già positivi all'ingresso e 61 (79,2%) positivizzati durante la degenza (Grafico 10).

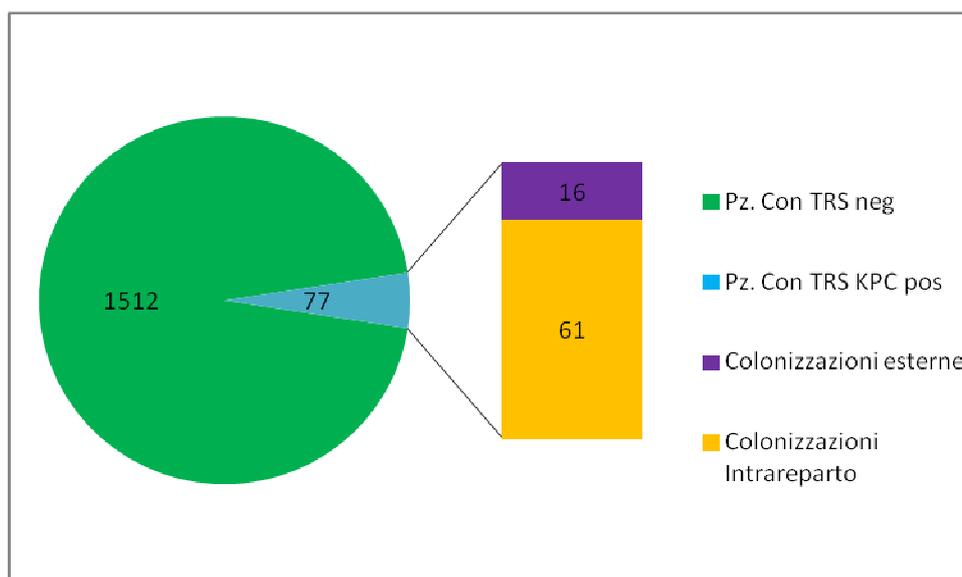


Grafico 10: pazienti positivi per KPC al tampone rettale, pazienti colonizzati all'ingresso e durante la degenza

Tra i pazienti colonizzati, 42 (2,6% sul totale dei soggetti osservati e 54,5% dei colonizzati) hanno sviluppato almeno una infezione, alcuni pazienti hanno sviluppato infezione in più sedi, per un totale di 55 infezioni causate da KPC (Grafio 11).

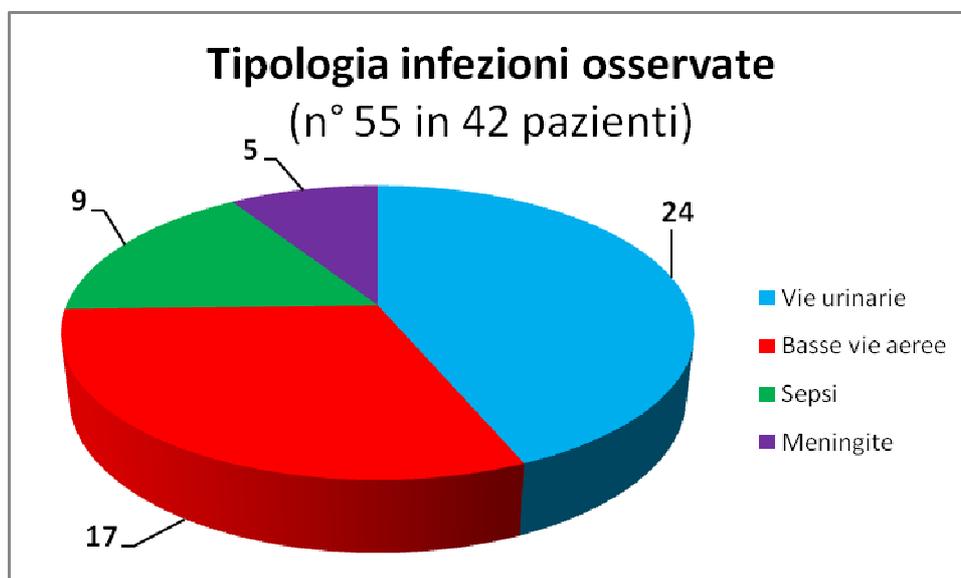


Grafico 11: tipologia delle infezioni osservate

Analizzando l'andamento temporale dall'ottobre 2012 (dopo il primo intervento in seguito all'*outbreak* verificatosi tra agosto e settembre 2012), si vede come a fine marzo 2013 vi è stata riduzione sia dell'incidenza di colonizzazioni intra-reparto (da 29,6% persone/mese a 3,1% persone/mese) che di infezioni cliniche (dal 17% persone/mese allo 1,5% persone/mese). Dall'aprile 2013, si è osservata una recrudescenza di nuove colonizzazioni, esclusivamente intra-reparto, con incidenza 33% persone/mese a maggio 2013 e parallelo incremento delle infezioni (30,3% persone/mese).

Nel giugno-luglio 2013 si è nuovamente intensificata l'attività di sorveglianza, anche attraverso l'analisi delle procedure e la formazione del personale dedicato all'assistenza, che aveva subito un *turn-over*. Nei mesi successivi si è assistito quindi ad un drastico calo delle colonizzazioni intrareparto (0% persone/mese da Settembre 2013, $p < 0.00001$). In seguito a ciò anche le infezioni hanno subito un calo significativo, fino a 0% PM nel novembre 2013. Al contrario le colonizzazioni esterne sono rimaste stabili

in tutto il periodo (Grafico 12).

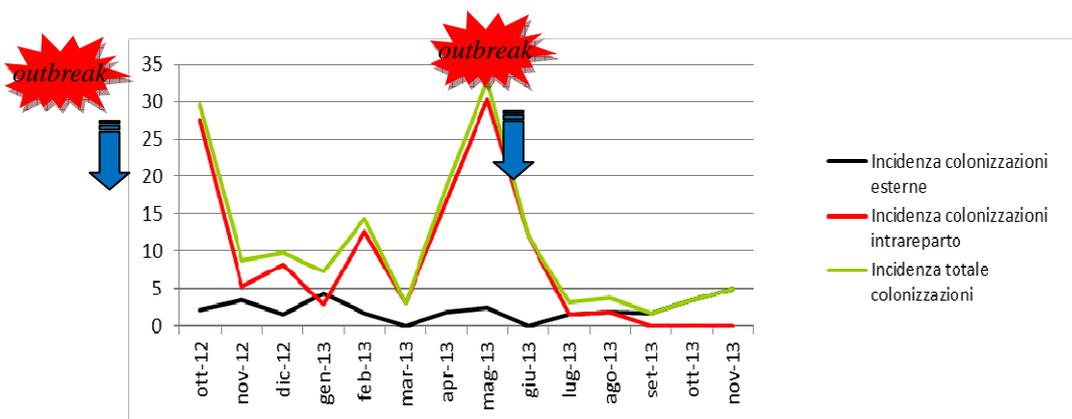


Grafico 12: andamento temporale dell'incidenza delle nuove colonizzazioni, suddivise per esterne, intraparto e totali e la correlazione temporale con gli interventi adottati
= intensificazione della sorveglianza



DISCUSSIONE

Negli ultimi anni la velocità di diffusione di batteri multiresistenti, responsabili sia di infezioni nosocomali che in ambito comunitario, è giunta a livelli allarmanti (45). Le *Enterobacteriaceae*, in particolare *E. coli* e *K. pneumoniae*, sono patogeni che frequentemente acquisiscono fenotipi di resistenza, mediante la produzione di ESBL e carbapenemasi. Fino al 2000 l'interesse è stato rivolto alla resistenza delle *Enterobacteriaceae* ai β -lattamici per produzione di ESBL, in particolare della β -lattamasi CTX-M (69). Negli ultimi anni l'attenzione della comunità scientifica è stata rivolta verso la produzione di carbapenemasi nelle *Enterobacteriaceae* (70-73). La rilevanza clinica delle *Enterobacteriaceae* è dovuta alla loro capacità di causare un ampio spettro di infezioni, quali setticemie, infezioni del sistema nervoso centrale, del tratto respiratorio, urinario e gastrointestinale, di cui sono anche i più comuni colonizzatori. La diffusione delle CPE è diventata un'emergenza di interesse pubblico, soprattutto da quando l'infezione e la colonizzazione da parte di questi patogeni multiresistenti è stata associata ad una maggior mortalità in ambiente ospedaliero (74-76,57). Le CPE possono colonizzare o infettare non solo pazienti debilitati o immunocompromessi, ma anche soggetti sani possono essere colonizzati o essere infettati in un ambiente ospedaliero in cui non venga praticato un adeguato controllo di tali patogeni. E' pertanto fondamentale prevenire e ridurre la diffusione nosocomiale di questi patogeni multiresistenti. Nel 2011 un'indagine effettuata dall'EARS-Net ha rivelato che in Italia il 27% di *K.pneumoniae* ed il 3% di *E.coli* erano resistenti ai carbapenemi (77) ed un terzo degli isolati di *K. pneumoniae* era resistente alle cefalosporine di terza generazione, ai fluorochinoloni e agli aminoglicosidi (77). Per contenere la diffusione di CPE, nel 2013 il Ministero ha suggerito di implementare la sorveglianza attiva dei colonizzati, mediante esecuzione di un tampone rettale ai pazienti ricoverati o trasferiti in reparti a rischio, quali Terapia

Intensiva, Oncologia, Ematologia, Neuro-Riabilitazione/Unità spinale e Chirurgia dei trapianti e dei pazienti provenienti da altro ospedale, recentemente ricoverati in ospedale (negli ultimi tre mesi) o provenienti da strutture territoriali per anziani o riabilitative. In Italia sono già stati condotti degli studi per verificare l'efficacia del sistema di sorveglianza attivo (78, 79) di Enterobacteriaceae MDR, (soprattutto di quelle produttrici di carbapenemasi), che hanno dimostrato l'importanza dell'identificazione precoce di pazienti colonizzati da CPE per contenere la diffusione di patogeni MDR. In Toscana le percentuali di *E.coli* e *K. pneumoniae* resistenti alle cefalosporine di terza generazione e ai carbapenemi sono superiori a quelle della media italiana (80), per tale motivo è necessario un sistema controllo efficace della diffusione di tali patogeni.

In questo studio è stata analizzata la diffusione di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e carbapenemasi presso i reparti dell'Azienda Ospedaliera Universitaria Senese al fine di valutare la diffusione di enterobatteri multiresistenti e l'efficacia del sistema di sorveglianza attiva (in essere dal 2012, seppure in maniera non omogenea nei diversi reparti) di tali patogeni negli anni 2014 e 2015. Da questa analisi è emerso che, nonostante nel 2015 ci sia stato un leggero aumento del numero di pazienti sottoposti a *screening* rispetto al 2014, il numero di pazienti colonizzati da CPE è diminuito (58% contro 19%). Questo potrebbe essere legato al fatto che, come verificato nelle UU.OO. di Neurochirurgia e Terapia Intensiva Neurochirurgica per gli anni 2012-2013, a partire dalla sorveglianza attiva implementata nel 2012, in AOUS è stato realizzato un sistema di controllo più organico/ampio che ha ridotto la diffusione intraospedaliera di questi patogeni. L'aumento dei colonizzati da *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL, che è stato osservato (41% nel 2014 e 77% nel 2015), può essere dovuto più che all'aumento del numero di pazienti sottoposti a *screening* per la ricerca di tali patogeni (che sono passati da 646 nel 2014 a 1261 nel 2015), ad una loro maggiore diffusione tra la

popolazione generale. I colonizzati da ESBL in Area Medica erano infatti il 5% nel 2014 e l'11% nel 2015, contro, rispettivamente l'1,7% e 4,7% nei reparti ad alta intensità di cura (UTI, Cardiochirurgie etc.).

Ricordando che nel corso del 2015 sono stati svolti in AOUS corsi di formazione specifica sulla prevenzione e diffusione delle infezioni da MDR, sul lavaggio mani etc., è stato registrato che è diminuita la percentuale di pazienti che ha sviluppato infezione dopo l'identificazione di un primo isolato sul tampone di *screening* (passando dal 19% al 12%), ma soprattutto è diminuito il numero di pazienti che ha sviluppato infezione pur risultando negativi allo *screening*. Ciò suggerisce che la sorveglianza attiva dei patogeni multiresistenti, come parte di un sistema di monitoraggio e prevenzione organico, contribuisce a diminuire la loro diffusione in ambiente ospedaliero, in linea con i risultati ottenuti in altri studi (57, 58, 78, 79). E' da sottolineare, infatti, che sia nel 2014 che nel 2015 l'incidenza maggiore di pazienti con infezioni da *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e carbapenemasi è risultata in reparti che non effettuano lo *screening* di routine (che, ricordiamo, è solo una parte del sistema di sorveglianza e prevenzione), ma solo sporadicamente, evidenziando ancora l'importanza e l'efficacia della sorveglianza. E' stato poi osservato che in entrambi gli anni l'isolamento di *Enterobacteriaceae* multiresistenti nelle emocolture è risultato essere più frequente in pazienti che hanno avuto il primo isolamento di tali patogeni su un campione clinico, piuttosto che nel tampone di sorveglianza, evidenziando che i TRS non risultano efficaci tanto per la prevenzione di infezione nel paziente colonizzato, ma in quanto parte del sistema di prevenzione della diffusione.

L'efficacia del sistema di sorveglianza attiva è stato dimostrato anche dal contenimento di un' epidemia di KPC nelle unità di Neurochirurgia e Terapia Intensiva Neurochirurgica dell'A.O.U. Senese avvenuta nel 2012. L'implementazione del sistema di sorveglianza attiva e segnalazione dei microrganismi *alert* ha permesso

l'individuazione precoce di pazienti colonizzati e il loro tempestivo isolamento da contatto. Un'adeguata formazione del personale e la collaborazione del Personale delle Unità con gli Infettivologi, la Direzione Sanitaria e la Microbiologia hanno consentito un'immediata riduzione di nuove colonizzazioni e di infezioni, con migliore prognosi per i pazienti ricoverati e con una riduzione dei tempi e dei costi della degenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas M.E, Giske CG, Harbarth S, Hindler F, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber J, and Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–281.
2. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-331.
3. Spratt BG. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 1994;264: 388-393.
4. McGowan. Resistance in non fermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med* 2006; 119: 29-36.
5. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae *Am J Med.* 2006;119(6 Suppl 1):S20-8; discussion S62-70.
6. Rice LB Antibiotic resistance in gram-positive bacteria. *Am J Med* 2006; 119: 11-19
7. Jacoby GA and Munoz-Price LS. The new β -lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352: 380-391.
8. Bush K, Jacoby GA, and Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
9. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Phil Trans Royal Soc London, Series B Biol Sciences* 1980; 289: 321-331.

10. Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(9):1697-1704.
11. Hernandez-Alles S, Alberti S, Alvarez D, et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* 1999;145 (Pt 3):673-679.
12. Rice LB, Carias LL, Hujer AM, et al. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(2):362-367.
13. Ardanuy C, Linares J, Dominguez MA, et al. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(7):1636-1640.
14. Rahal JJ, Urban C, Horn D, et al. Class restriction of cephalosporin use to control total cephalosporin resistance in nosocomial *Klebsiella*. *JAMA.* 1998;280(4):1233-1237.
15. Tzouveleki LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14(2):137-142.
16. Qi C, Pilla V, Yu JH, Reed K. Changing prevalence of *Escherichia coli* with CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 and 2008. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;67(1):87-91.
17. Chen Y, Delmas J, Sirot J, Shoichet B, Bonnet R. Atomic resolution structures of CTX-M β -lactamases: extended spectrum activities from increased mobility and decreased stability. *J Mol Biol.* 2005;348(2):349-62.
18. Ibuka AS, Ishii Y, Galleni M, Ishiguro M, Yamaguchi K, Frère JM, Matsuzawa H, Sakai H. Crystal structure of extended-spectrum β -lactamase Toho-1:

- insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion. *Biochemistry*. 2003;42(36):10634-43.
19. Luzzaro F, Mezzatesta M, Mugnaioli C, Perilli M, Stefani S, Amicosante G, Rossolini GM, and Toniolo A. Trends in the production of extended-spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest. Report of the second Italian survey. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:1659-1664.
 20. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F et al. CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50: 2700–2706.
 21. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-458, table of contents.
 22. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22:161-82
 23. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:1-11
 24. Beceiro A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. *Rev Med Microbiol.* 2004;15:141-152
 25. Empel J, Hrabák J, Koziowska A, Bergerová T, Urbášková P, Kern-Zdanowicz I, Gniadkowski M. DHA-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in the Czech Republic. *Microb Drug Resist.* 2010;16:291-295
 26. D'Andrea MM, Literacka E, Zioga A, Giani T, Baraniak A, Fiett J, Sadowy E, Tassios PT, Rossolini GM, Gniadkowski M, Miriagou V. Evolution of a multi-drug-resistant *Proteus mirabilis* clone with chromosomal AmpC-type cephalosporinases spreading in Europe. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2735-2742

27. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β - lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:211-1233
28. Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:557-584
29. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:933-951
30. Naas T, Poirel L, Nordmann P. 2008. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):42-52
31. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):144-153
32. Livermore DM, Cantón R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:165-174
33. Carattoli A. Animal reservoirs for extended-spectrum β -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):117-123
34. Gniadkowski M. 2008. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):11-32
35. Livermore DM. Defining an extended-spectrum β -lactamase. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(Suppl1):3-10
36. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791–1798.

37. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36 Suppl 3:S8-14.
38. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenemhydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1553–5. 25.
39. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price LS. Emergence of KPCproducing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:3072.
40. Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, Santana JL, Otero DM, Leon CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1354–7.
41. Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(8):3198-3202.
42. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440–58
43. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A et al. Infections with VIM-1 metallo β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol* 2009;47: 3514–9.
44. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63:659-67

45. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:432-8.
46. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al.. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 1151–1161.
47. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin. Infect. Dis.* 2011; 52: 848–855.
48. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, et al.. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 51: 3026–3029.
49. Pournara S, Protonotariou E, Voulgari E, et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009 64: 348–352.
50. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, et al.. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 2011 17: 1444–1447.
51. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1584-90.
52. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, & Tzouveleki LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003 47: 395–397.

53. Luzzaro F, Docquier JD, Colimon C, et al.. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-beta-lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 648–650.
54. Tortola MT, Lavilla S, Miro E, et al. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49: 3492–3494.
55. Vatopoulos, A..High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence. *Euro Surv.* 2008;**13**: pii 8023.
56. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009 (4):228-36. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4.
57. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B, Shalit I, Carmeli Y; Israel Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Working Group Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 2011 Apr 1;52(7):848-55. doi: 10.1093/cid/cir025. Epub 2011 Feb 11.
58. Ciobotaro P, Oved M, Nadir E, Bardenstein R, Zimhony O. An effective intervention to limit the spread of an epidemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an acute care setting: from theory to practice. *Am J Infect Control.* 2011 Oct;39(8):671-7. doi: 10.1016/j.ajic.2011.05.004. Epub 2011 Aug 23.
59. CDC. Guidance for control of carbapenemase-resistant enterobacteriaceae. www.cdc.gov/hai/organisms/cre/cre-toolkit 2013

60. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, Rossolini GM, Souli M, Giamarellou H. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb;16(2):102-11.
61. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 2011;1;53(1):60-7
62. The management, surveillance and epidemiology of carbapenem resistance. <https://www.gov.uk/government/collections/carbapenem-resistance-guidance-data-and-analysis>
63. Systematic review of the effectiveness of infection control measures to prevent the transmission of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae through cross-border transfer of patients. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/CPE-systematic-review-effectiveness-infection-control-measures-to-prevent-transmission-2014>.
64. Chitnis AS, Caruthers PS, Rao AK, Lamb J, Lurvey R, Beau De Rochars V, Kitchel B, Cancio M, Török TJ, Guh AY, Gould CV, Wise ME. Infect Control Hosp Epidemiol..Outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae at a long-term acute care hospital: sustained reductions in transmission through active surveillance and targeted interventions. 2012;;33(10):984-92.
65. Kochar S, Sheard T, Sharma R, Hui A, Tolentino E, Allen G, Landman D, Bratu S, Augenbraun M, Quale J. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(5):447-52.

66. Indicazioni pratiche e protocolli operativi per la diagnosi, la sorveglianza e il controllo degli enterobatteri produttori di carbapenemasi nelle strutture sanitarie e socio-sanitarie 2011. Regione Emilia Romagna
67. EUCAST guideline for the detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance 2013
68. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters
69. Canton R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9: 466–475.
70. Canton R, Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: S8–S14.
71. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440–458.
72. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791–1798.
73. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; 2: 501–512.
74. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30(12):1180-5.
75. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant Enterobacter species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(4):1413-8.3

76. Borer A, Saidel-Odes L, Riesenber K, Eskira S, Peled N, Nativ R, et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30(10):972-6
77. European antimicrobial resistance surveillance network. Ears-net database. <http://www.ecdc.europa.eu> 2013
78. A. Rossini, S.G. Di Santo, M.F. Libori, V. Tiracchia, M.P. Balice, A. Salvi Risk factors for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae colonization of asymptomatic carriers on admission to an Italian rehabilitation hospital *J. Hosp. Inf.* 2016 Jan;92(1):78-81.
79. Viale P, Tumietto F, Giannella M, Bartoletti M, Tedeschi S, Ambretti S, Cristini F, Gibertoni C, Venturi S, Cavalli M, De Palma A, Puggioli MC, Mosci D, Callea E, Masina R, Moro ML, Lewis RE. Impact of a hospital-wide multifaceted programme for reducing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections in a large teaching hospital in northern Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2015 21(3):242-7
80. Rete di Sorveglianza dell'Antibiotico Resistenza in Toscana. SART database. www.regione.toscana.it/start