



**ARS TOSCANA**  
agenzia regionale di sanità

**Regione Toscana**



**Servizio  
Sanitario  
della  
Toscana**



**Workshop**

**Focus sul controllo delle infezioni nelle Residenze sanitarie assistenziali**

**Firenze, 7 giugno 2018**

**SALONE DELLE ROBBIANE - Villa la Quiete - FORMAS (via di Boldrone n.2)**

*Infezione e colonizzazione da patogeni multi-resistenti nell'anziano in residenze sanitarie assistenziali: il progetto PAMURSA*

*Romano Mattei  
Direttore S.C. Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche  
LUCCA ASL TOSCANA NORD OVEST*

# *Infezione e colonizzazione da patogeni multi-resistenti nell'anziano in residenze sanitarie assistenziali: il progetto PAMURSA*



**Marisa Accogli, Marina Cerquetti, Maria Giufrè,**  
*Dipartimento di Malattie Infettive, ISS*

*Marisa Accogli, Maria Giufrè, Fabrizio Barbanti, Monica Monaco, Fernanda Pimentel de Araujo, Patrizia Spigaglia, Annalisa Pantosti, Marina Cerquetti (Dipartimento di Malattie Infettive, ISS), Maria Luisa Moro, Enrico Ricchizzi, Rossella Buttazzi (Agenzia Sanitaria e Sociale Regionale, Regione Emilia-Romagna, Bologna); Claudio Farina, Marina Cosentino (Ospedale Papa Giovanni XXIII, Bergamo); Paolo Fazii, Vincenzo Savini (Ospedale Spirito Santo, Pescara); Romano Mattei, Maria Nardone (Ospedale Campo di Marte, Lucca); Mario Sarti, Agostino Barozzi (Ospedale S. Agostino-Estense-Baggiovara, Modena).*

# Residenti arruolati nello studio

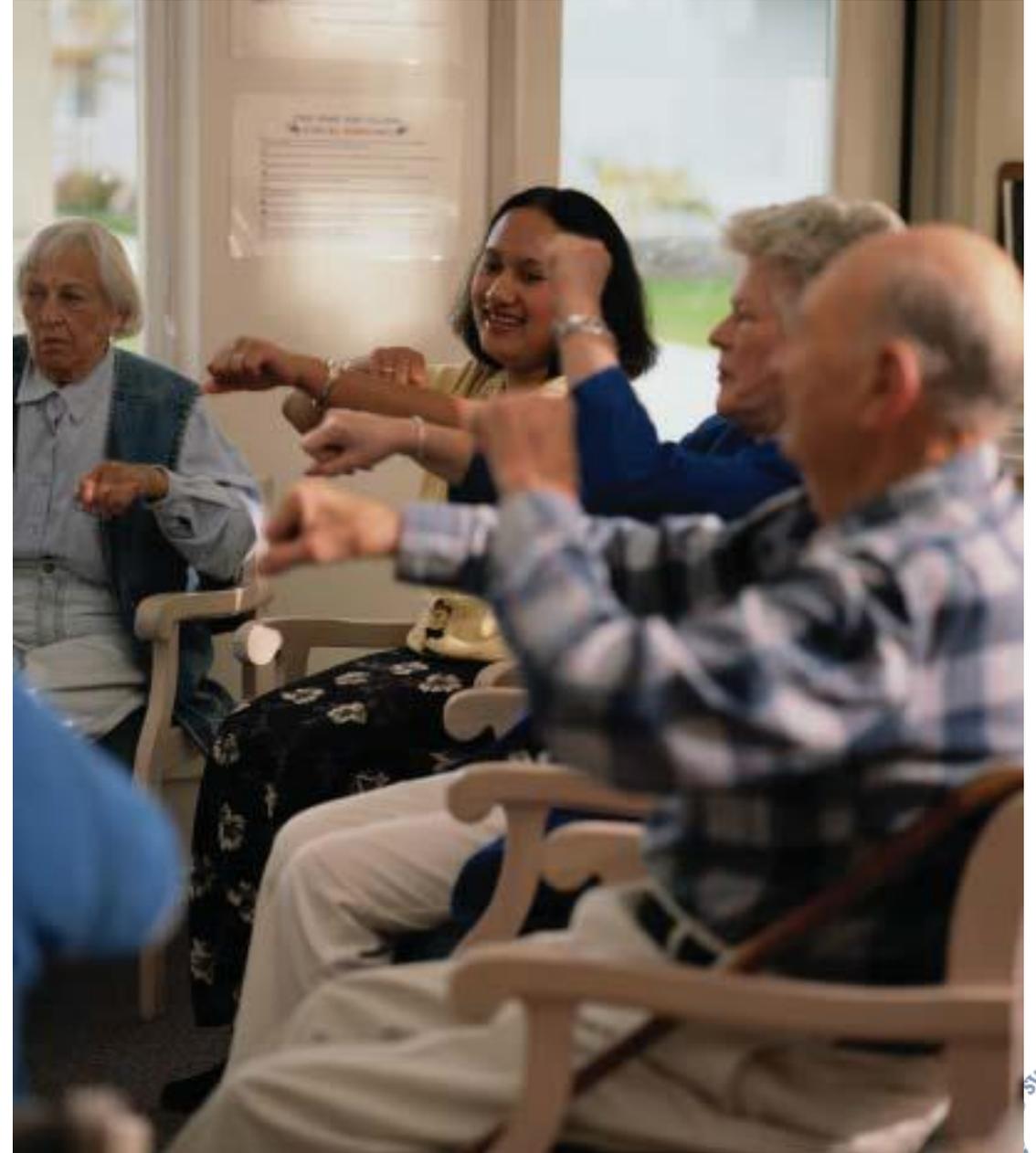
- **489** Residenti Totali
- **12** strutture

Bergamo (BG)  
Lucca (LU)  
Modena (MO)  
Pescara (PE)

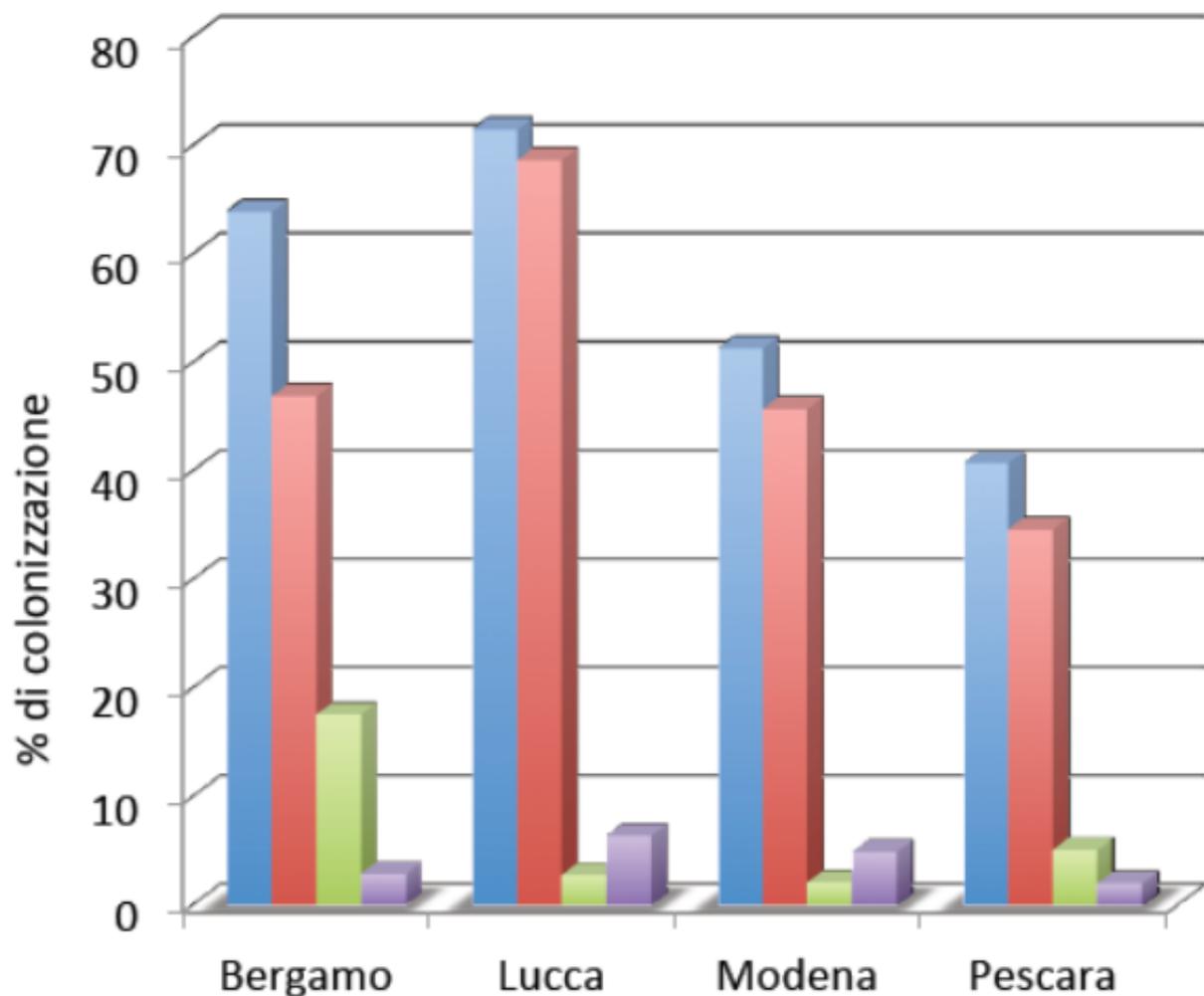
U.O.	Struttura	Residenti inclusi
BG	B02	87
BG	PFP01	49
LU	L01	54
LU	L02	20
LU	L03	11
LU	L04	25
MO	M01	45
MO	M02	49
MO	M03	50
PE	PE/I	20
PE	PE/II	18
PE	PE/III	61

U.O.	Residenti
BG	136
LU	110
MO	144
PE	99

- ✓ **OBIETTIVO SPECIFICO 1:** Determinare la prevalenza di colonizzazione intestinale con ceppi MDR di *E coli*, *K. pneumoniae* e *C. difficile* e di colonizzazione nasale con *MRSA* multi-resistente in anziani in RSA.
- ✓ **OBIETTIVO SPECIFICO 2:** Indagare la frequenza di ceppi MDR di *E coli* e *K. pneumoniae* da colonizzazioni/infezioni delle vie urinarie in anziani in RSA.
- ✓ **OBIETTIVO SPECIFICO 3:** Indagare la prevalenza d'infezioni del tratto gastrointestinale sostenute da *C. difficile* MDR e/o ipervirulenti; identificare eventuali outbreaks.
- ✓ **OBIETTIVO SPECIFICO 4:** Determinare i profili di suscettibilità agli antibiotici dei ceppi MDR isolati da colonizzazione/infezione.
- ✓ **OBIETTIVO SPECIFICO 5:** Determinare la prevalenza di enterobatteri (*E. coli* e *K. pneumoniae*) produttori di carbapenemasi da colonizzazione/infezione e identificare il tipo di carbapenemasi presente (KPC, metallo- $\beta$ -lattamasi di tipo VIM e NDM, OXA-48).
- ✓ **OBIETTIVO SPECIFICO 6:** Identificare i principali genotipi/cloni di *E. coli*, *C. difficile*, *MRSA* multi-resistenti e/o iper-virulenti isolati da colonizzazione/infezione.
- ✓ **OBIETTIVO SPECIFICO 7:** Indagare i fattori di rischio correlati alla colonizzazione con patogeni MDR e descrivere le caratteristiche dei pazienti anziani colonizzati in RSA.



## Prevalenza di colonizzazione con *Enterobacteriaceae* ESBL per area geografica



Microorganismi	Colonizzati/Arruolati (%)
Enterobacteriaceae ESBL	279/487 (57,3) (32,8 – 81,5)
<i>E. coli</i> ESBL	239/487 (49,1)
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	35/487 (7,2)
Altri enterobatteri ESBL	20/487 (4,1)

- Enterobacteriaceae ESBL
- E. coli* ESBL
- K. pneumoniae* ESBL
- Altri enterobatteri ESBL

## *Frequenza di ceppi MDR di E.coli e K.pneumoniae in infezioni delle vie urinarie*

- **Urine:** 626 pazienti  806 esami  
negativi      contaminati      positivi  
215 (27%)      99 (12%)      492 (**61,0%**)

### **Frequenza UTI causate da**

✓ **23,4% E. coli ESBL (115/492)**

✓ **4,5% K. pneumoniae ESBL (22/492)**

# Profili di sensibilità di *E.coli* e *K.pneumoniae* in infezioni delle vie urinarie

303 isolati di *Enterobacteriaceae*

247 *E.coli*

35 *K. pneumoniae*

21 altre *Enterobacteriaceae*

*Proteus mirabilis*(n. 9 isolati), *Enterobacter cloacae*(n. 3), *Enterobacter aerogenes*(n. 1), *Klebsiella oxytoca*(n. 2), *Citrobacter freundii*(n.3), *Citrobacter koseri*(n. 1), e *Morganella morganii*(n. 1)

## Fenotipi di resistenza più frequenti

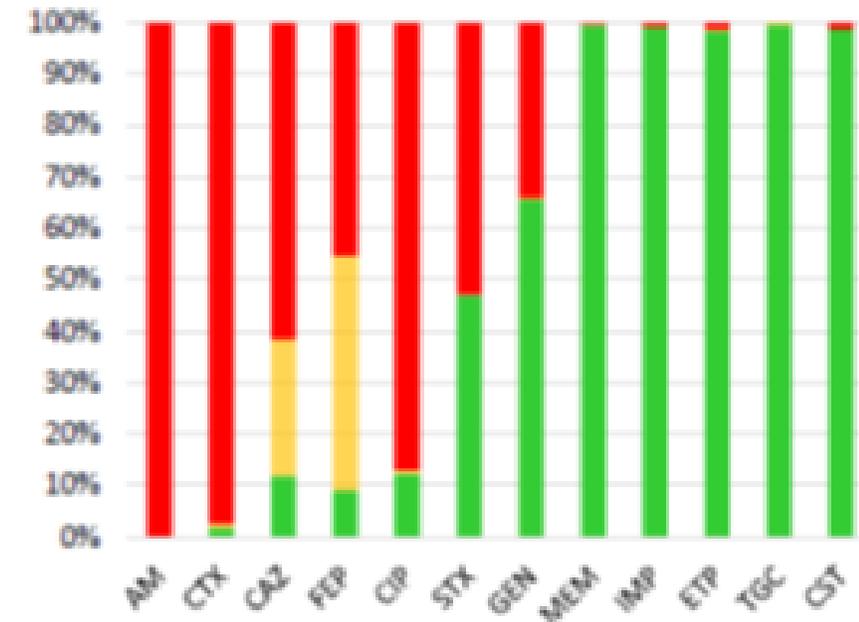
***E. coli***      **87%**      Ampicillina + cefalosporine di 3°/4° generazione + ciprofloxacina

**49%**      = + SXT

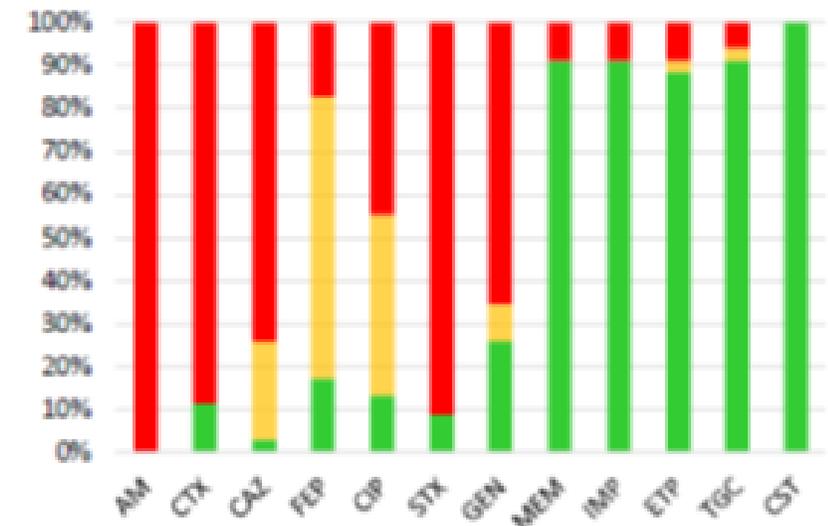
***K. pneumoniae*** **83%**      Ampicillina + cefalosporine di 3°/4° generazione + SXT

**66%**      = + gentamicina

247 ceppi di *E. coli*

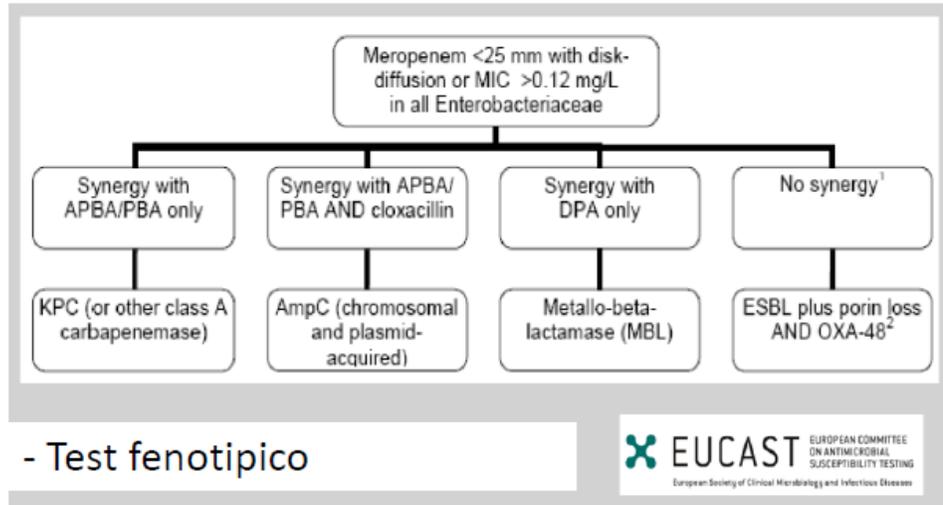


35 ceppi di *K. pneumoniae*

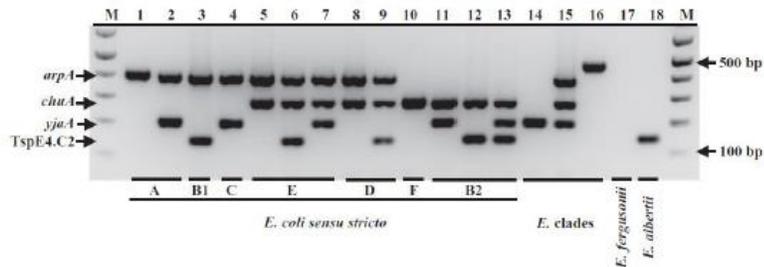


# Caratterizzazione fenotipica e genotipica di ceppi di *Enterobacteriaceae* ESBL e/o carbapenemasi-produttori

## METODI



### ✓ Tipizzazione filogenetica (multiplex PCR)



Clermont, Environmental Microbiology Reports (2013) 5(1), 58–65

### ✓ Identificazione sub-clone *fimH30*

PCR e sequenziamento gene *fimH*

- PCR e sequenziamento:

geni *kpc*  
*vim*  
*oxa-48*

-PCR e sequenziamento:

geni *bla*<sub>TEM</sub>  
*bla*<sub>CTX-M</sub>  
*bla*<sub>SHV</sub>  
*bla*<sub>CMY</sub>

### ✓ Multi Locus Sequence Typing (MLST)

*E. coli* Sequence Typing

<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>



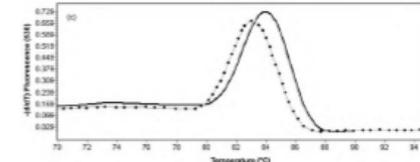
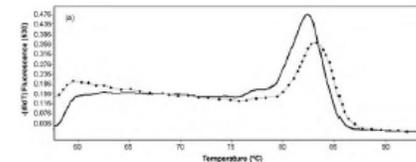
Klebsiella Sequence Typing

<http://bigsdbs.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>



### ✓ Screening ST131 e CTX-M15

Real-time PCR per identificazione clone ST131 di *E. coli* ed ESBL CTX-M-15

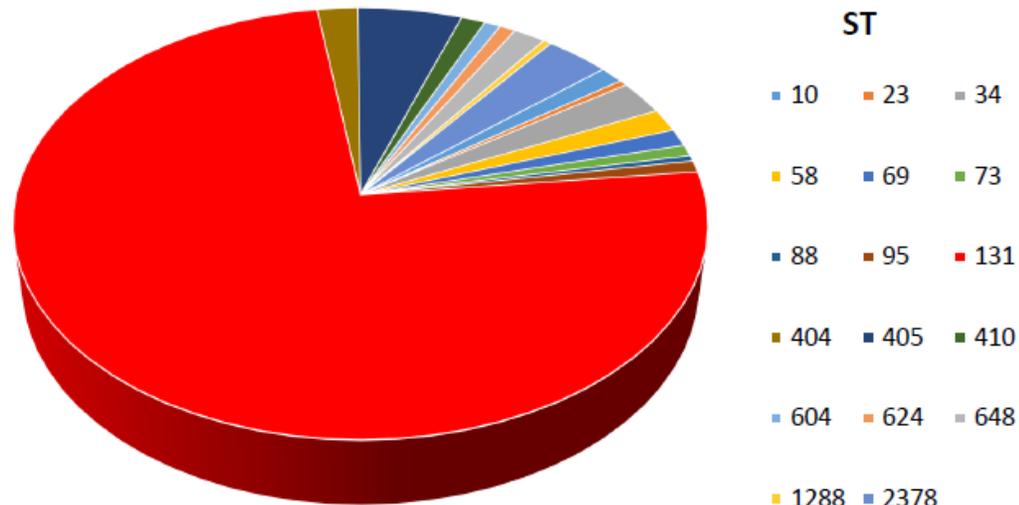


*Prevalenza, caratterizzazione fenotipica e genotipica di ceppi di Enterobacteriaceae carbapenemasi-produttori isolati nel corso del progetto*

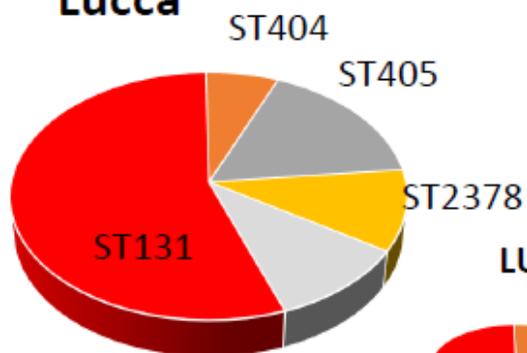
Ceppo n°	Specie	Campione	MIC Carbapenemi IMP			Co-resistenze	Carbapenemasi	ST
			ETP	MEM				
L01-ECOL45	<i>E. coli</i>	feci	≥16	2	1	AM, PIP, CIP, CTX	VIM1	131
MO3-ECOL34	<i>E. coli</i>	feci	≥16	0.5	≥16	AM, PIP, CTX	VIM1	1288
L02-KPNE6	<i>K. pneumoniae</i>	feci	≥16	≥8	≥16	AM, PIP, CIP, CTX,TG	KPC3	512
BG-KPNE16	<i>K. pneumoniae</i>	feci	≥16	≥8	≥16	AM, PIP,GM,CIP,CTX	KPC3	512
M02-KPNE4	<i>K. pneumoniae</i>	feci	≥16	≥8	≥16	AM, PIP, CIP, CTX,TG	KPC3	512

# Genotipizzazione mediante Multi Locus Sequence Typing (MLST)

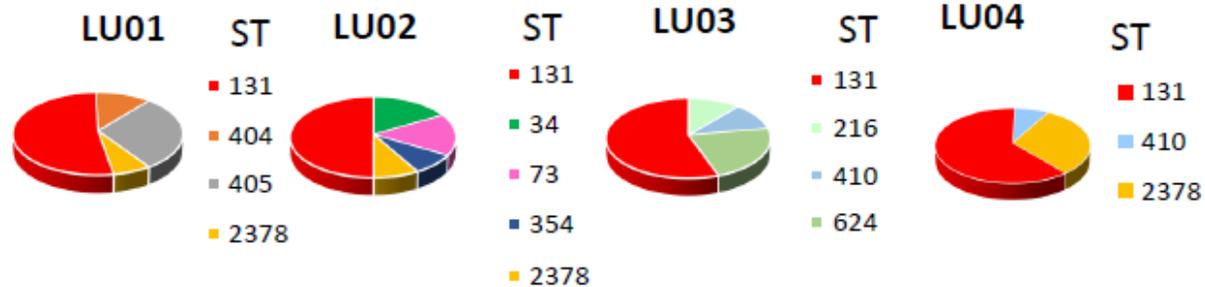
## *E. coli* ESBL



## Lucca



**ST 131: 175/247 (70,9%)**  
100% sub-clone *fimH30*



# ST131

- ✓ Emergenza nell'ultima decade a livello globale
- ✓ Gruppo filogenetico B2
- ✓ Associato a FQ-resistenza
- ✓ Frequentemente MDR
- ✓ Produce ESBL (soprattutto CTX-M)
- ✓ Predomina sub-clone *fimH30*

[\*Escherichia coli\* ST131, an Intriguing Clonal Group](#) Marie-Hélène Nicolas-Chanoine, Xavier Bertrand, Jean-Yves Madec *Clin Microbiol Rev.* 2014

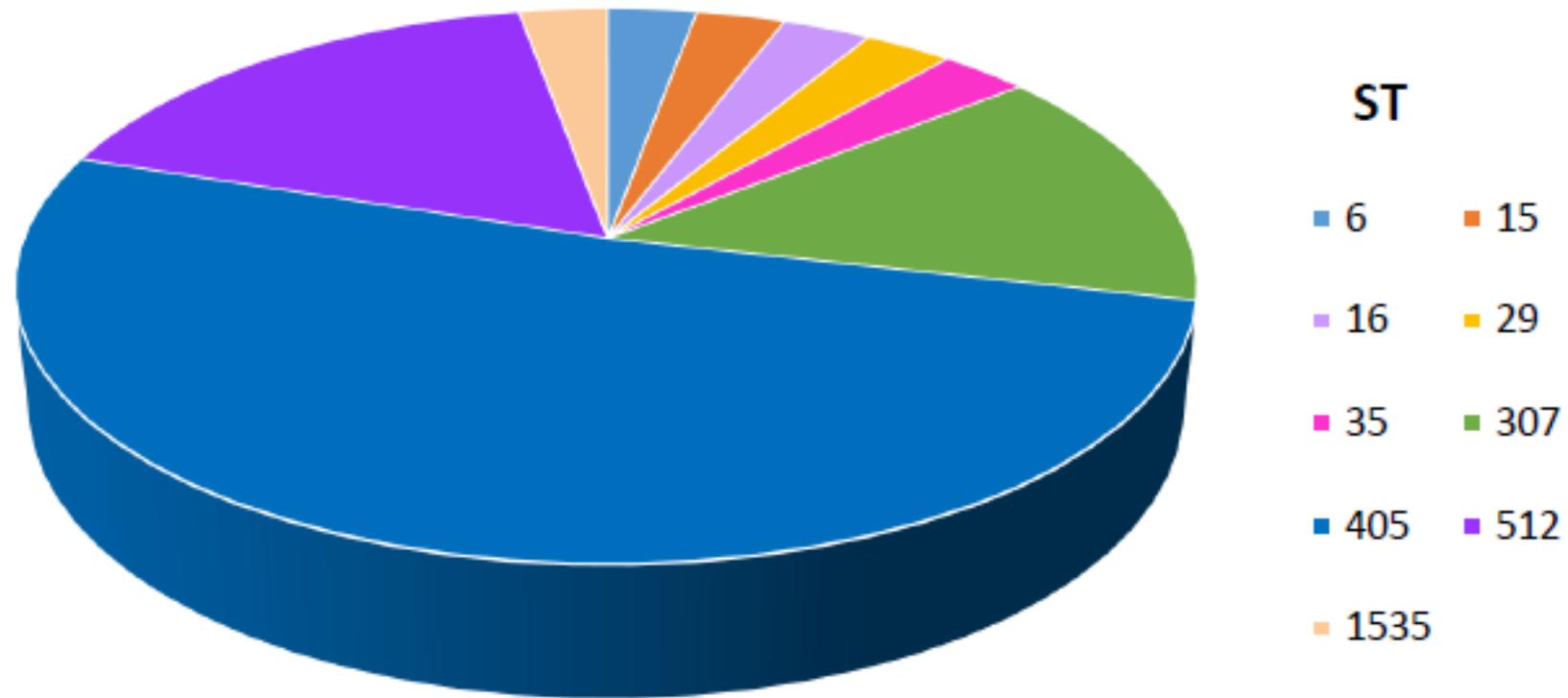
[Prevalence of extended-spectrum- \$\beta\$ -lactamase-producing \*Escherichia coli\* and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany.](#) J Arvand M, Moser V, Pfeifer Y. *Antimicrob Chemother* 2013;

[\*Escherichia coli\* Sequence Type 131 \(ST131\) Subclone H30 as an Emergent Multidrug-Resistant Pathogen Among US Veterans](#) Aylin Colpan et al. *Clin Infect Dis.* 2013

[Epidemiology and Characteristics of \*Escherichia coli\* Sequence Type 131 \(ST131\) from Long-Term Care Facility Residents Colonized Intestinally with Fluoroquinolone-Resistant \*Escherichia coli\*](#) Jennifer H. Han et al. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018

# Genotipizzazione mediante Multi Locus Sequence Typing (MLST)

## *K. pneumoniae* ESBL



**ST 405:** 18/35 (51,4%)

ST 512: 6/35 (17,1%) → 3 ceppi CPE con *bla*<sub>KPC-3</sub>

ST 307: 5/35 (14,28)

### Dati dei residenti colonizzati da *E. coli* con *mcr-1* e caratterizzazione degli isolati

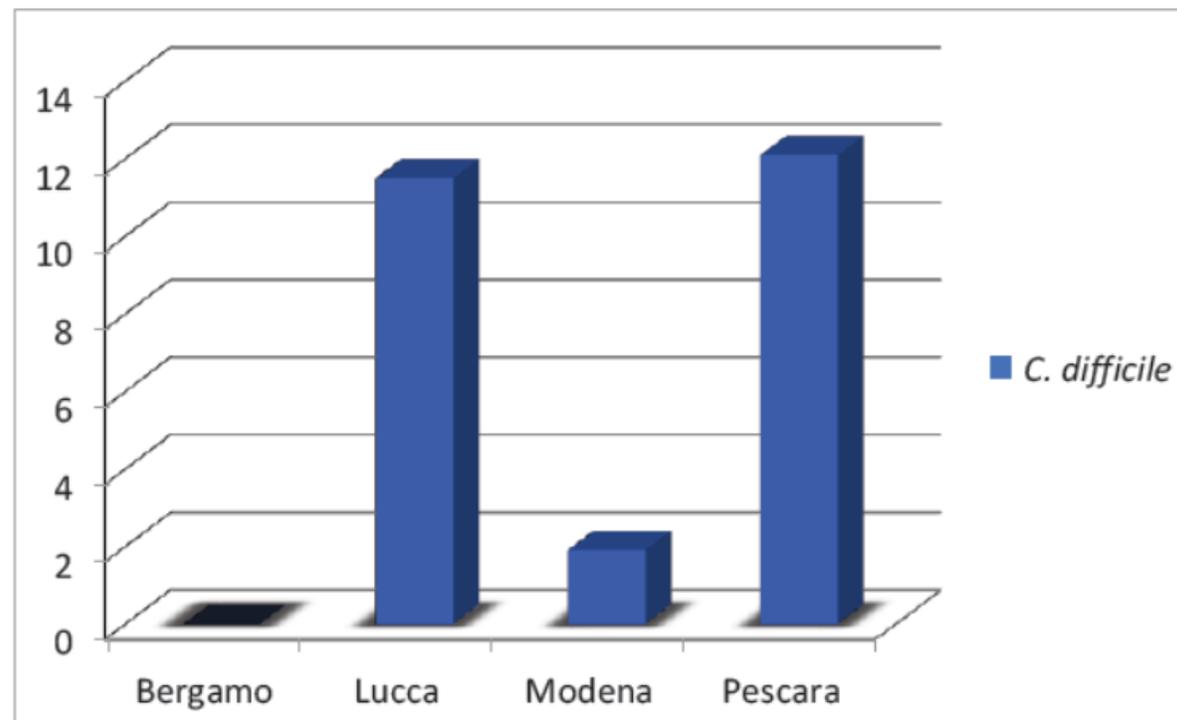
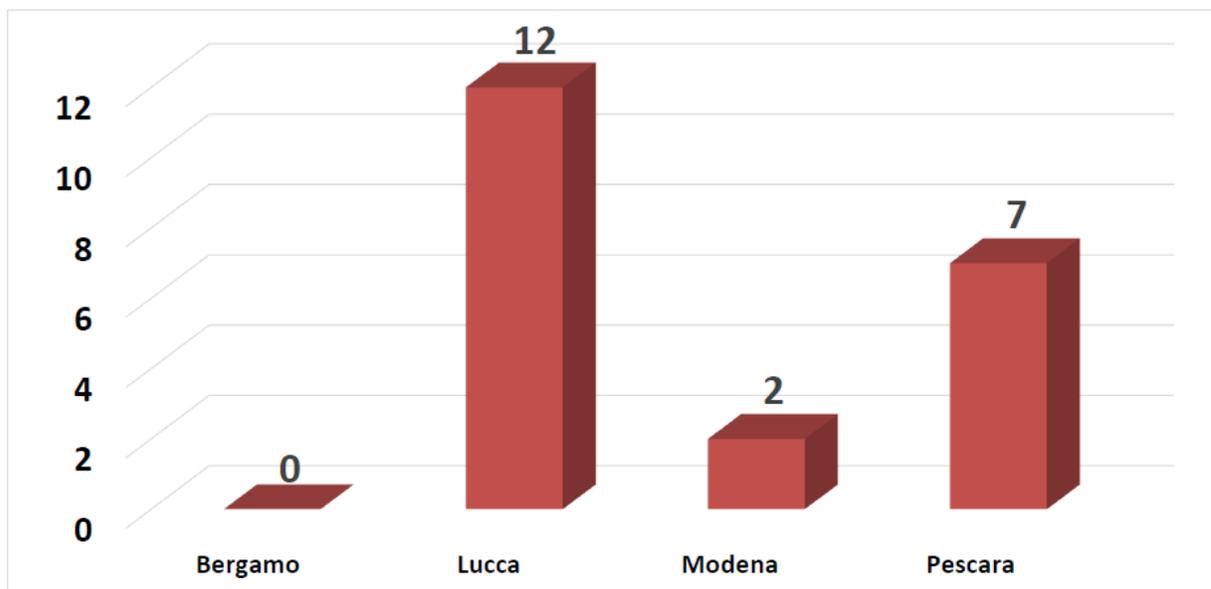
	Residente 1/ isolato EC51	Residente 2/ isolato EC61-2	Residente 3/ isolato EC62
<b>Residente:</b>			
Età/sexo	95/F	87/F	74/F
Residente in LTCF da	8 anni	5 anni	3 mesi
Precedente ospedalizzazione (ultimi 3 mesi)	No	Si	No
Terapia antimicrobica (ultimo mese)	No	No	No
<b>Isolato:</b>			
Gruppo filogenetico	D	A	A
ST/CC	ST2165*	ST88/CC23	ST10/CC10
ESBL	SHV12	CTX-M15	CTX-M15
Plasmidi	IncI1, NT	IncI1, FIB, FIIS, FIIM, NT	IncI1, NT
<b>MIC (mg/L):</b>			
Amikacina	≤4	≤4	≤4
Gentamicina	≤1	≤1	≤1
Cefotaxime	≥8	≥8	≥8
Ceftazidime	64	64	32
Cefepime	16	≥64	≥64
Ciprofloxacina	1	≥4	≤0.06
Colistina	8	8	8
Imipenem	≤1	≤1	≤1
Meropenem	≤0.12	≤0.12	≤0.12
Tigeciclina	≤0.12	≤0.12	≤0.12

*PAMURSA: comparison between infection study and colonization study in long-term care facility residents*

	<b>Infection study</b>	<b>Colonization study</b>
<b>Microorganism</b>	<b>Isolates/Positive samples (%)</b>	<b>Colonized/Enrolled residents (%)</b>
Total ESBL-producing Enterobacteriaceae	166/459 (36.2)	279/487 (57.3)
ESBL-producing <i>E. coli</i>	115/459 (25.1)	239/487 (49.8)
ESBL-producing <i>E. coli</i> ST131	95/492 (19.3)	173/487 (35.5)
ESBL-producing <i>K. pneumoniae</i>	22/459 (4.8)	35/487 (7.2)
Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.	4/459 (0.9)	5/487 (1.0)
<b>Isolate genotype</b>	<b>Type/Number of isolates (%)</b>	<b>Type/Number of isolates (%)</b>
Major ESBL/species		
CTX-M-15/ <i>E. coli</i>	82/115 (71.3)	157/247 (63.6)
CTX-M-14/ <i>E. coli</i>	19/115 (16.5)	54/247 (21.9)
CTX-M-15/ <i>K. pneumoniae</i>	17/22 (77.3)	26/35 (74.2)
Major MLST clones/species		
ST131/ <i>E. coli</i>	95/115 (82.6)	175/247 (70.9)
ST410/ <i>E. coli</i>	5/115 (4.3)	3/247 (1.2)
ST405/ <i>E. coli</i>	3/115 (2.6)	13/247 (5.3)
ST10/ <i>E. coli</i>	3/115 (2.6)	3/247 (1.2)
ST307/ <i>K. pneumoniae</i>	7/22 (31.8)	5/35 (14.3)
ST15/ <i>K. pneumoniae</i>	5/22 (22.7)	1/35 (2.9)
ST405/ <i>K. pneumoniae</i>	2/22 (9.1)	18/35 (51.4)
ST512/ <i>K. pneumoniae</i>	2/22 (9.1)	6/35 (17.1)

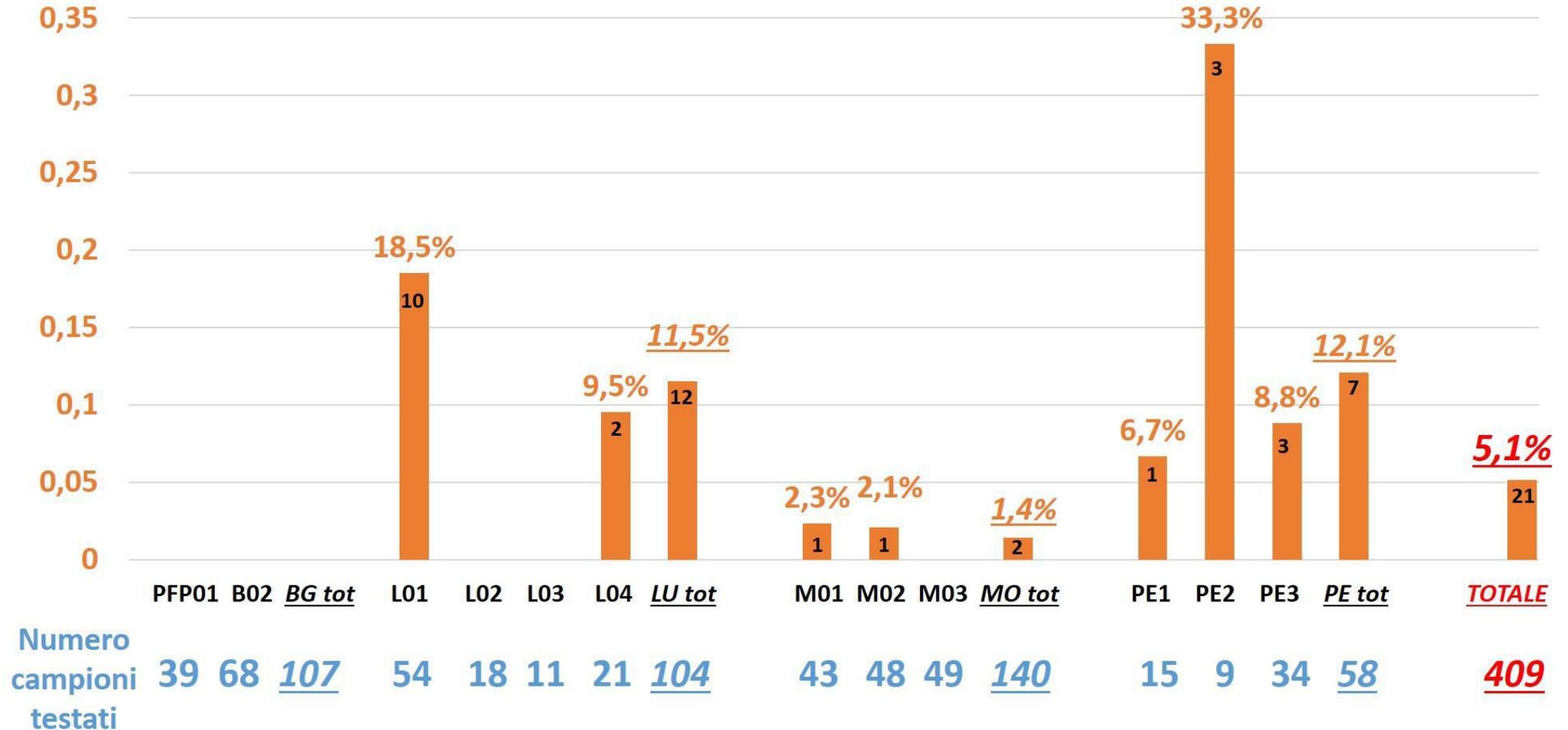
# Prevalenza di colonizzazione intestinale con ceppi di *Clostridium difficile*

409 residenti arruolati → 21 ceppi isolati



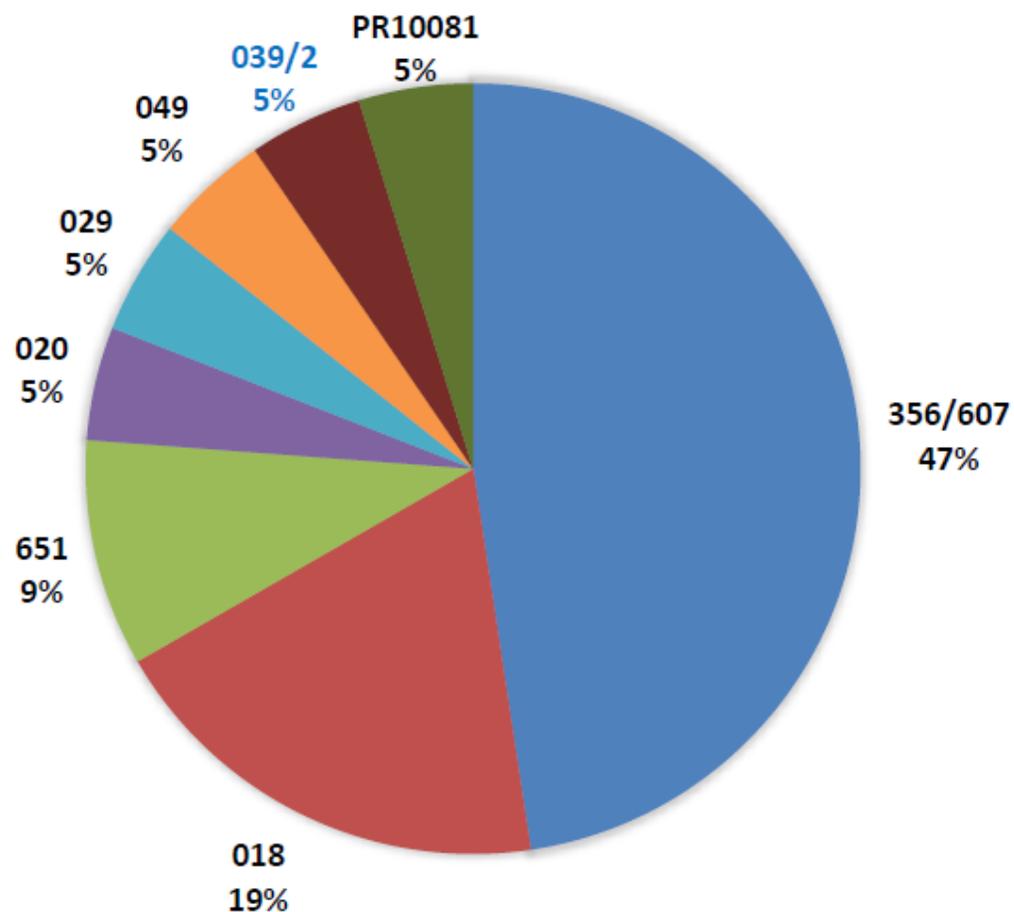
*Ceppi di Clostridium difficile isolati nello studio di colonizzazione/infezione del progetto PAMURSA*

**% residenti colonizzati**



# Caratterizzazione genotipica e fenotipica di Ceppi di *Clostridium difficile* isolati nello studio di colonizzazione/infezione del progetto PAMURSA

## PCR-ribotyping



## Caratterizzazione fenotipica

### Agar dilution

Vancomicina e Metronidazolo

100% Sensibili

### % resistenti

Moxifloxacina

81%

Eritromicina

86%

Clindamicina

90%

Rifampicina

90%

## Conclusione...

PCR-ribotype 356/607 (47%) e 018 (19%) predominanti

La maggior parte dei ceppi sono multi-resistenti (86%)

Negli anziani delle RSA analizzate non sono stati identificati ceppi iper-virulenti PCR-ribotype 027 e/o 078

## Prevalenza di infezioni intestinale sostenute da *Clostridium difficile* MDR e/o ipervirulenti

- **Feci:** 111 pazienti → 136 esami  
GDH positivi, tox positivi 21

✓ **15,4% *C. difficile*** (21/136)

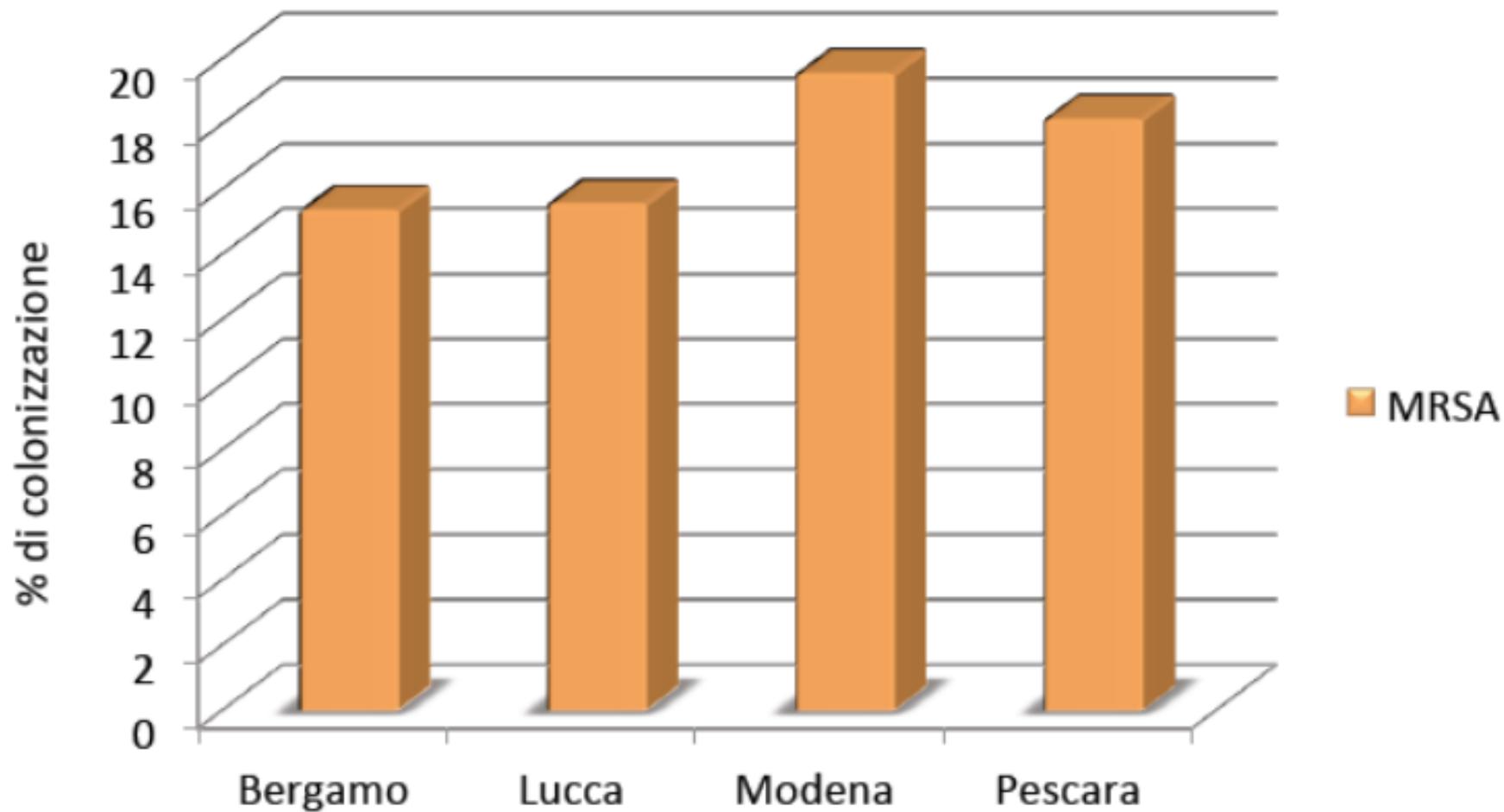
✓ **11,0% *C. difficile* MDR e/o ipervirulento** (14 MDR +  
2 ipervirulenti )

**Outbreaks??**

*PAMURSA: comparison between C.difficile Infection study  
and colonization study in long-term care facility residents*

	<i>Infection study</i>	<i>Colonization study</i>
<i>Microorganism</i>	<i>Isolates/Positive samples (%)</i>	<i>Colonized/Enrolled residents (%)</i>
<i>C. difficile</i>	21/136 (15.4)	21/409 (5.1)
<i>Major C. difficile PCR-ribotype</i>		
356/607	9/21 (42.9)	10/21 (47.6)
018	3/21 (14.3)	4/21 (19.0)

*Prevalenza di colonizzazione (nasale/ascellare) con MRSA multi-resistente*



# Caratterizzazione genotipica e fenotipica di Ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillina-resistente (MRSA) isolati nello studio di colonizzazione/infezione del progetto PAMURSA

## Tecniche molecolari per *S. aureus*

Conferma della specie e della resistenza alla meticillina :

➔ PCR *mecA/nuc*

Genotipizzazione :

➔ *spa* typing  
MLST  
SCC*mec*

### SCC*mec* typing

Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)



### *spa* Typing

Sequenziamento della regione polimorfica del gene della proteina A di membrana

*Ceppi di di Staphylococcus aureus meticillina-resistente (MRSA) isolati nello studio di colonizzazione/infezione*

**487** residenti sono stati sottoposti a tampone ascellare e nasale



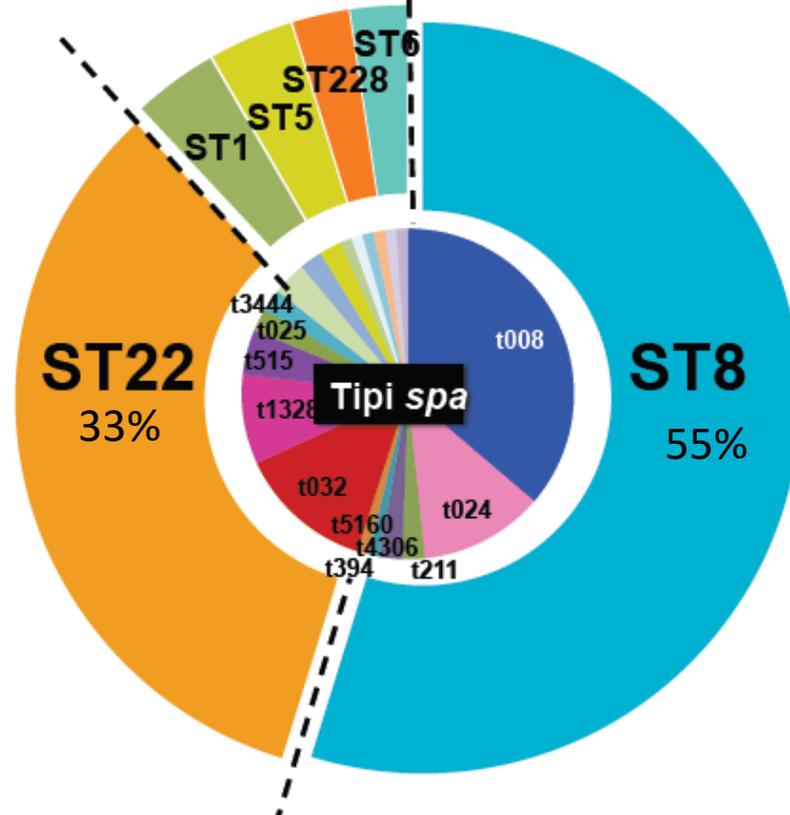
➡ **84 ( 17.2%)** erano positivi per MRSA

Tipo di tampone	N° ospiti positivi
tampone nasale	60 ( 71,5%)
tampone ascellare	16 ( 19%)
t. nasale + t. ascellare	8 ( 9,5%)

➡ Tutte le RSA risultarono positive per MRSA ( range **5%** al **32%**)

Genotipizzazione dei ceppi di MRSA (n. 84), isolati da 489 residenti in RSA arruolati nello studio di colonizzazione

## Genotipizzazione di 84 ceppi MRSA (spa typing e MLST)



→ 6 cloni  
ST8 + ST22 = 88%

## Conclusione...

- **Il tasso di colonizzazione da MRSA è elevato e varia da struttura a struttura.**
- **Lo *spa* typing e l'MLST hanno dimostrato che gli MRSA che circolano nelle RSA appartengono agli stessi tipi e cloni che sono diffusi comunemente negli ospedali italiani.**
- **La prevalenza di un singolo tipo *spa* predominante in alcune RSA suggerisce la possibilità di una trasmissione locale di MRSA.**

# Analisi dei fattori di rischio correlati alla colonizzazione con patogeni MDR, MRSA e C.difficile

## Ospiti colonizzati

UO	Struttura	ESBL	E. Coli	K. Pneumonia e	E.coli+ K.pne	MRSA	C. difficile	ESBL MRSA CDIF
BG	B02	54	46	7	2	12	0	0
BG	PFP01	33	18	17	3	9	0	0
LU	L01	44	43	1	1	9	10	3
LU	L02	13	12	1	1	1	0	0
LU	L03	8	8	1	1	2	0	0
LU	L04	13	12	0	0	5	2	2
MO	M01	21	15	0	0	6	1	0
MO	M02	30	29	2	1	7	1	0
MO	M03	23	22	1	1	15	0	0
PE	PE/I	9	7	1	0	6	1	0
PE	PE/II	11	10	0	0	1	3	0
PE	PE/III	20	17	4	1	11	2	0
TOT		279	239	35	11	84	20	5*

### Fattore

Sesso

Età >86 anni

Lesioni da pressione

Altre ferite

Catetere Vascolare

Catetere urinario

PEG

Incontinenza urinaria

Incontinenza fecale

Disorientato

Deamulante non autonomo

Allettato

Antibiotico 30gg

Ospedalizzazione 30gg

Intervento chirurgico 30gg

Degenza <4 mesi

# Fattori di rischio associati a colonizzazione Enterobacteriaceae ESBL

*Prevalenza di colonizzazione - Variabilità tra strutture*

Min. 32.8 – **Media 57.3** – Max 81.5

## Analisi multivariata

- **Allettamento** (OR 1,85; 95% CL 1,02 – 3,34; p=0,043)
- **Incontinenza urinaria e/o fecale** (OR 1,57; 95% CL 1,00 – 2,45; p=0,048)
- **Struttura** (p=0,0010)

- *Allettamento ed incontinenza sono fattori di carico assistenziale e quindi ricorso alle cure e conseguente contatto con il personale sanitario.*
- *Rischio legato all'aderenza alle misure di prevenzione e controllo da parte dei sanitari.*

# Fattori di rischio associati a colonizzazione MRSA

*Prevalenza di colonizzazione - Variabilità tra strutture*  
Min. 5.0 – **Media 17.2** – Max 30.6

## Analisi multivariata

- **Allettamento** (OR 1,84; 95% CL 1,06 – 3,17; p=0,029)
  - **Permanenza in struttura  $\leq$  4mesi** (OR 2,05; 95% CL 1,22 – 3,43; p=0,0007)
- L'*Allettamento* è un **fattore di carico assistenziale** ricorso alle cure e conseguente contatto con il personale sanitario. Quindi rischio legato alla aderenza alle misure di prevenzione e controllo da parte dei sanitari.
- La **breve permanenza in struttura** potrebbe essere interpretata come una potenziale introduzione di MRSA da fonte esterna alla struttura (ospedale?).

# Fattori di rischio associati a colonizzazione *C. difficile*

*Prevalenza di colonizzazione - variabilità tra strutture*

5 strutture prevalenza ZERO di colonizzazione

10 casi su 20 di colonizzazione sono concentrati in una singola struttura

## Analisi multivariata

- **Allettamento** (RR 3,99; 95% CL 1,66 – 9,63; p=0,002 )
  - **Ospedalizzazione nei 3 mesi precedenti** (RR 3,79 ; 95% CL 1,60 – 8,97; p=0,002)
- 
- *Allettamento* è un fattore di carico assistenziale e quindi contatto con il personale sanitario per le cure. Quindi rischio legato all'aderenza alle misure di prevenzione e controllo da parte dei sanitari.
  - *Ospedalizzazione nei 3 mesi precedenti* indica una probabile acquisizione di *C.difficile* in ospedale con successiva importazione in struttura.

# Fattori di rischio associati a colonizzazione

## Consumo di antibiotici

- Ospiti in trattamento antibiotico il giorno dello studio **8%** min 0%-max 15%
- Ospiti in trattamento antibiotico nei 30 giorni precedenti **26%** min 4%- max 56%

Mai statisticamente significativo

Classe ATC04	Numero di molecole		%				
<i>Penicilline</i>	J01C	8	26%				
<i>Cefalosporine</i>	J01D	11 (2 carbapenemi)	35%	6%			
<i>Macrolidi, Lincosamidi e Streptogramine</i>	J01F	2	6%				
<i>Chinoloni</i>	J01M	8 (5 levofloxacina)	26%				
<i>Altri antibatterici</i>	J01X	2	6%				
Totale		31					

ATC05	Principio attivo	N	%
J01CR02	Amoxi clav	8	26%
J01DD01	Cefotaxime	7	23%
J01DD04	Ceftriaxone	2	6%
J01DH02	Meropenem	1	3%
J01DH51	Imipenem	1	3%
J01FA09	Claritromicina	1	3%
J01FF01	Clindamicina	1	3%
J01M	Chinolone	3	10%
J01MA12	Levofloxacina	5	16%
J01XD01	Metronidazolo	1	3%
J01XE01	Nitrofurantoina	1	3%

- ✓ Prevalentemente infezioni respiratorie e urinarie
- ✓ In linea con quanto riportato in altri studi nazionali
- ✓ Simile a prescrizioni "da territorio"

*Multidrug-resistant infections in long-term care facilities: extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae and hypervirulent antibiotic resistant Clostridium difficile.* M. Giufrè, M. Accogli, E. Ricchizzi, F. Barbanti, C. Farina, P. Fazii, R. Mattei, M. Sarti, A. Barozzi, R. Buttazzi, M. Cosentino, M. Nardone, V. Savini, P. Spigaglia, M. L. Moro, M. Cerquetti. [Diagnostic Microbiology and Infectious Disease \(2018\)](#)

*Colonization by multidrug-resistant organisms in long-term care facilities in Italy: a point-prevalence study.* Giufrè M, Ricchizzi E, Accogli M, Barbanti F, Monaco M, Pimentel de Araujo F, Farina C3, Fazii P, Mattei R, Sarti M, Barozzi A, Buttazzi R, Cosentino M, Nardone M, Savini V, Spigaglia P, Pantosti A, Moro ML, Cerquetti M. [Clin Microbiol Infect. 2017](#)

*Emergence of the colistin resistance mcr-1 determinant in commensal Escherichia coli from residents of longterm-care facilities in Italy* Maria Giufre`, Monica Monaco, Marisa Accogli, Annalisa Pantosti and Marina Cerquetti\* on behalf of the PAMURSA Study Group†. [Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access 2016](#)