

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO DI MEDICINA E DI SCIENZE DELLA SALUTE

“VINCENZO TIBERIO”

Dottorato di Ricerca in

“Medicina Traslazionale e Clinica”

Ciclo XXXVIII

TESI DI DOTTORATO

Epidemiologia molecolare in Sanità Pubblica: integrazione nei sistemi di sorveglianza per la prevenzione e il controllo delle infezioni correlate all’assistenza sostenute da patogeni multiresistenti

Tutor

Chiar.mo Prof.re

Giancarlo Ripabelli

Co-Tutor

Chiar.ma Prof.ssa

Manuela Tamburro

Coordinatore

Chiar.mo Prof.re

Giovanni Scapagnini

Dottoranda

Dott.ssa Adele Lombardi

Matricola 176183

SSD: MEDS-24/B

INDICE

Abstract	4
1. Premessa	5
2. Introduzione	6
2.1 L'antibiotico-resistenza	6
2.1.1 Definizione, impatto clinico e socio-economico	6
2.1.2 Cause, diffusione e approccio “ <i>One-Health</i> ”	9
2.1.3 Sfide attuali e strategie di contrasto all'antibiotico-resistenza	12
2.2 Le Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA)	15
2.2.1 Definizione, importanza clinica e fattori di rischio	15
2.2.2 Tipologie principali di ICA	16
2.2.3 Meccanismi di insorgenza e diffusione	19
2.2.4 Epidemiologia delle ICA a livello globale, europeo ed italiano	21
2.2.5 Impatto delle ICA sulla sanità pubblica	25
2.3 I microrganismi ESKAPE	27
2.3.1 Ruolo clinico e ambientale dei microrganismi ESKAPE nelle ICA	27
2.3.2 Meccanismi di resistenza agli antibiotici	30
2.3.3 Meccanismi di virulenza	35
2.3.4 Biofilm e persistenza	38
3. Sorveglianza e strategie di prevenzione e controllo	40
3.1 Sorveglianza microbiologica e molecolare	40
3.2 Strategie di prevenzione e controllo	46
4. Obiettivi	48
5. Materiali e Metodi	50
5.1 Isolamento e selezione dei ceppi di <i>P. aeruginosa</i>, <i>E. faecium</i> e <i>S. aureus</i>	50
5.2 Test di suscettibilità agli antibiotici	55
5.3 Estrazione del DNA	56
5.4 Protocolli di ERIC-PCR e RAPD-PCR per <i>P. aeruginosa</i>	57
5.5 Protocolli di PFGE	58
5.6 Protocolli di MLST per <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. faecium</i>	59
5.7 Ricerca di geni di resistenza agli antibiotici e virulenza in ceppi di <i>E. faecium</i> e <i>S. aureus</i>	61
5.8 <i>Spa</i> Typing per <i>S. aureus</i>	64
6. Risultati	65

6.1	<i>P. aeruginosa</i>	65
6.1.1	Caratterizzazione molecolare mediante MLST	76
6.2	<i>E. faecium</i>	78
6.3	<i>S. aureus</i>	95
6.3.1	Profili di antibiotico-resistenza	95
6.3.2	Caratterizzazione molecolare mediante PFGE	98
6.3.3	Prevalenza dei geni di resistenza e virulenza	99
6.3.4	<i>Spa</i> typing	100
7.	Discussione	103
7.1	Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di <i>P. aeruginosa</i>	104
7.2	Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di <i>E. faecium</i>	108
7.3	Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di <i>S. aureus</i>	111
8.	Conclusioni	114
9.	Bibliografia	118

Abstract

L'antibiotico-resistenza (AMR) rappresenta una delle principali sfide per la sanità globale. L'emergenza di organismi multiresistenti (MDR) è particolarmente critica in ambito ospedaliero, dove le infezioni correlate all'assistenza (ICA) sono spesso causate da microrganismi MDR. Il lavoro di tesi si è focalizzato su tre patogeni che sono cause rilevanti di ICA, quali *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus aureus*, con l'obiettivo di caratterizzare i profili di resistenza e le relazioni molecolari degli isolati. È stato adottato un approccio epidemiologico integrato, basato su metodiche tradizionali e molecolari, al fine di tracciare la diffusione dei ceppi MDR, identificare cloni ad alta virulenza e valutare la resistenza agli antibiotici nel principale ospedale della Regione Molise. La suscettibilità agli antibiotici è stata determinata mediante sistema automatizzato *BD Phoenix*TM, mentre la caratterizzazione molecolare ha incluso l'impiego di tecniche quali PFGE, ERIC-PCR e RAPD-PCR per *P. aeruginosa*, MLST per *P. aeruginosa* ed *E. faecium*, saggi di PCR per la ricerca dei geni di resistenza e virulenza nei ceppi di *E. faecium* e *S. aureus* e *spa* typing per *S. aureus*. Per *P. aeruginosa*, i risultati hanno evidenziato una correlazione genetica tra isolati clinici e ambientali, con resistenze estese verso β -lattamici, fluorochinoloni e carbapenemi. Le tecniche di tipizzazione (PFGE, ERIC-PCR, RAPD-PCR e MLST) hanno rilevato cluster che hanno incluso ceppi clinici e ambientali, confermando il ruolo delle superfici ospedaliere come *reservoir* di ceppi MDR e la presenza di cloni ad alto rischio, tra cui ST111, ST235, ST446 e ST895. Nel caso di *E. faecium*, tutti gli isolati hanno mostrato resistenza a vancomicina e teicoplanina, con elevata prevalenza del gene *vanA* (90,3%). La PFGE ha identificato cluster con ceppi isolati da terapia intensiva, suggerendo persistenza ambientale e possibili eventi di trasmissione inter-reparto. L'MLST ha evidenziato la predominanza di ST80 (CC17), insieme alla presenza di cloni emergenti come ST1478 e ST2164, caratterizzati da profili MDR estesi. Per *S. aureus*, la presenza di ceppi meticillino-resistenti (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) e la coesistenza di cloni responsabili di infezioni ospedaliere e comunitarie evidenziano la complessità della loro gestione. La PFGE ha mostrato un'elevata eterogeneità con 21 cluster distinti, mentre la ricerca dei geni di resistenza ha confermato la presenza di *mecA* nel 97,1% dei ceppi. Sono stati identificati otto *spa* types, tra cui T002, T008 e T022 sono risultati prevalenti (35,3%, 29,4% e 11,8%, rispettivamente). Solo quattro ceppi (12,1%), tutti appartenenti allo *spa type* T008, hanno mostrato la presenza del gene *PVL*. I risultati ottenuti evidenziano la necessità di rafforzare i programmi di sorveglianza e le strategie di *infection control*, includendo lo studio dell'epidemiologia molecolare, al fine di limitare la diffusione dei patogeni MDR nei reparti a maggior rischio. Un approccio integrato è uno strumento essenziale per identificare tempestivamente ceppi ad elevata virulenza e supportare interventi mirati, contribuendo a migliorare la gestione delle ICA e preservare l'efficacia delle terapie antibiotiche.

1. Premessa

L'antibiotico-resistenza rappresenta una delle principali emergenze di sanità pubblica a livello globale, con conseguenze significative sia dal punto di vista clinico, determinando l'aumento della mortalità e lo sviluppo di complicanze, sia sul piano economico, per l'incremento dei costi sanitari legati alla gestione di infezioni difficili da trattare. La diffusione di batteri multiresistenti limita drasticamente le opzioni terapeutiche, rendendo spesso inefficaci i trattamenti convenzionali. Tale quadro delinea una situazione allarmante negli ambienti ospedalieri in Italia, come in molti altri Paesi, dove le Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA) rappresentano una sfida clinica rilevante.

Tra i microrganismi maggiormente coinvolti nelle ICA, quelli appartenenti al gruppo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ed *Enterobacter* spp.) sono noti per la loro capacità di "sfuggire" all'azione degli antibiotici. In particolare, *P. aeruginosa*, *E. faecium* ed *S. aureus* risultano tra i più frequentemente isolati in ambito ospedaliero. La loro capacità di sviluppare meccanismi complessi di resistenza agli antibiotici e fattori di virulenza ne favorisce la sopravvivenza, la diffusione e la persistenza. Inoltre, l'abilità nel formare biofilm su superfici e dispositivi medici complica la gestione ed il controllo delle infezioni nosocomiali.

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza, di natura multifattoriale e in continua evoluzione, richiede un approccio globale e coordinato, che integri attività di sorveglianza microbiologica, ricerca molecolare, gestione clinica e politiche di prevenzione. In questo contesto si inserisce il Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025, che ribadisce l'importanza di strategie integrate e multidisciplinari basate sull'approccio "One Health", per il contenimento della resistenza antimicrobica nell'uomo, negli animali e nell'ambiente.

Il PNCAR sottolinea, inoltre, il ruolo cruciale della sorveglianza epidemiologica nell'individuazione precoce e nel monitoraggio della diffusione dei patogeni resistenti, essendo uno strumento indispensabile per seguire la diffusione dei ceppi resistenti, identificare i geni responsabili e caratterizzare la diversità genetica, al fine di ottimizzare le strategie di prevenzione e trattamento.

Il lavoro di tesi si inserisce in questo scenario, focalizzandosi sulla caratterizzazione molecolare di ceppi di *P. aeruginosa*, *E. faecium* e *S. aureus* isolati in ambito ospedaliero nella Regione Molise, fornendo dati di epidemiologia molecolare, utili per comprendere la diffusione e i meccanismi di resistenza dei microrganismi nel contesto regionale, con possibili confronti a livello nazionale e internazionale.

2. Introduzione

2.1 L'antibiotico-resistenza

2.1.1 Definizione, impatto clinico e socio-economico

L'antimicrobico-resistenza (AMR, "*Antimicrobial Resistance*") è definita come la capacità intrinseca o acquisita da parte di un microrganismo di sopravvivere e proliferare in presenza di uno o più antibiotici che, in condizioni normali, ne inibirebbero la crescita (ECDC, 2025a). L'AMR rappresenta una strategia di difesa naturale sviluppata dai microrganismi nei confronti dell'azione degli antibiotici, che sopravvivono alla pressione selettiva dei trattamenti, continuando a moltiplicarsi e diffondersi (WHO, 2023a).

Storicamente, i primi studi incentrati sul ruolo determinante dei batteri come agenti patogeni furono avviati nella seconda metà del XIX secolo da Louis Pasteur e Robert Koch, i quali ricercarono le cause della mortalità associata alla sepsi (Lepenos T et al., 2024). In questo contesto, si inserisce anche il contributo pionieristico di Vincenzo Tiberio, medico e ricercatore italiano che già nel 1895, ben prima della scoperta ufficiale della penicillina, intuì l'azione antibatterica di alcune muffe. Sebbene i suoi studi, pubblicati nel lavoro "*Sugli estratti di alcune muffe*" (Annali di Igiene Sperimentale), siano stati ignorati dalla comunità scientifica del tempo, anticiparono di oltre trent'anni le scoperte di Alexander Fleming (Varotto E et al., 2025). Infatti, solo nel 1928, quest'ultimo identificò e descrisse la penicillina, segnando l'inizio dell'era moderna degli antibiotici e aprendo la strada a rivoluzionari progressi in medicina (Chhabra S et al., 2024). L'introduzione di questi farmaci permise il trattamento efficace di numerose infezioni batteriche, riducendo drasticamente la mortalità per patologie considerate letali. Tuttavia, l'uso eccessivo e inappropriato degli antibiotici ha contribuito, nel tempo, alla selezione e alla diffusione di ceppi resistenti (Muteeb G et al., 2023), richiamando l'attenzione globale sull'urgenza di adottare strategie coordinate di sorveglianza e contenimento (Salam MA et al., 2023).

Attualmente l'AMR rappresenta una minaccia rilevante per la salute pubblica, non solo per la sua diffusione globale, ma anche per le sue implicazioni cliniche, sociali ed economiche (Antimicrobial Resistance Collaborators, 2022). Questa emergenza ha causato una crisi senza precedenti nell'efficacia dei trattamenti terapeutici, compromettendo anche la gestione di infezioni batteriche comunemente considerate semplici e prefigurando il rischio concreto di un ritorno a un'epoca pre-antibiotica, in cui infezioni ordinarie potevano risultare fatali (Khan RT et al., 2024).

L'AMR è stata classificata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) al quinto posto tra i dieci pericoli per la salute mondiale (WHO, 2019c), evidenziando come il tempo a disposizione per l'efficacia di questi farmaci si stia rapidamente esaurendo.

Nel 2021, l'AMR ha contribuito in modo significativo alla mortalità globale, con circa 1,2 milioni di decessi direttamente attribuibili a infezioni da patogeni resistenti e 4,95 milioni di morti complessivamente associati a tali infezioni. In assenza di misure efficaci, si stima un aumento costante della mortalità legata all'AMR fino al 2050, con una proiezione di oltre 8 milioni di decessi annui, potenzialmente superiori a quelli causati dal cancro, che renderebbe tale fenomeno una delle principali cause di morte a livello globale (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024). Secondo il rapporto dell'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), ogni anno in Europa si registrano oltre 670.000 infezioni causate da batteri resistenti agli antibiotici, con circa 33.000 decessi direttamente attribuibili a queste infezioni. Tra i Paesi più colpiti, l'Italia presenta il numero più elevato di decessi correlati, con oltre 12.000 vittime annuali, a conferma di un quadro epidemiologico nazionale particolarmente critico (WHO Regional Office for Europe, 2022a).

L'AMR costituisce, quindi, una crisi silente in progressiva evoluzione, caratterizzata da un incremento costante delle infezioni e da una ridotta efficacia delle misure attualmente adottate. Recenti aggiornamenti dell'ECDC (ECDC, 2025b) evidenziano che l'Unione Europea non è in linea con quattro dei cinque obiettivi target fissati per il 2030, in quanto l'incidenza delle infezioni del flusso ematico da *Klebsiella pneumoniae* resistente ai carbapenemi è aumentata di oltre il 60% rispetto al 2019; le infezioni da *Escherichia coli* resistenti alle cefalosporine di terza generazione risultano in aumento; il consumo complessivo di antibiotici è cresciuto nel 2024, contrariamente all'obiettivo di riduzione del 20% e la quota di antibiotici del gruppo "Access" dell'OMS, come definito dalla classificazione AWaRe, rimane stabile intorno al 60%, al di sotto del target del 65%.

Fattori concomitanti, quali l'invecchiamento demografico, la trasmissione transfrontaliera di patogeni, lacune nei programmi di prevenzione e controllo delle infezioni (*Infection Prevention and Control*, IPC) e una *pipeline* limitata di nuovi antimicrobici contribuiscono a consolidare il fenomeno. Dal punto di vista clinico, infatti, la crescente prevalenza di ceppi multiresistenti (MDR), estensivamente resistenti (XDR) e pan-resistenti (PDR) limita drasticamente le opzioni terapeutiche disponibili, spesso costringendo al ricorso ad antibiotici di ultima linea, che risultano spesso inefficaci (Tängdén T et al., 2025). Infatti, per i batteri Gram-negativi resistenti ai carbapenemi classificati come patogeni a priorità critica, si prevede che i trattamenti futuri presenteranno una scarsa trattabilità (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024).

Questo determina un aumento significativo del rischio di fallimento terapeutico, che può aggravare il decorso delle infezioni, aumentare la mortalità e prolungare i tempi di degenza ospedaliera, con un impatto diretto sulla qualità di vita del paziente e sulla sostenibilità dei sistemi sanitari (Nelson RE et al., 2022; Barmpouni M et al., 2023; Ciapponi A et al., 2023).

L'AMR colpisce, in particolare, le categorie vulnerabili come anziani, pazienti oncologici, immunocompromessi e portatori di patologie croniche, nei quali le infezioni possono rapidamente evolvere in quadri gravi quali sepsi, shock settico e insufficienza multiorgano, richiedendo spesso il ricovero in terapia intensiva (Theodorakis N et al., 2024; Liu C et al., 2026; Bazaid AS et al., 2022; Kwok WC et al., 2025; Leone M et al., 2023; Kumar NR et al., 2024).

Inoltre, poiché questo fenomeno riduce la risposta ai trattamenti convenzionali, rischia di compromettere l'efficacia e la sicurezza di interventi fondamentali di chirurgia, di trapianti e chemioterapia (Long DR et al., 2024; So M et al., 2022; Ntim OK et al., 2025).

L'impatto economico dell'AMR rappresenta un onere globale di proporzioni considerevoli, essendo stato associato, nel 2019, a costi ospedalieri globali pari a circa 693 miliardi di dollari e a perdite di produttività stimate in quasi 194 miliardi di dollari. Secondo le proiezioni, entro il 2050 si potrebbero registrare fino a 1,91 milioni di decessi direttamente attribuibili all'AMR e circa 8,22 milioni di decessi associati (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024).

Il *burden* economico dipende da diversi fattori, tra cui la necessità di trattamenti più lunghi e di test diagnostici aggiuntivi, di terapie di seconda o terza linea, il prolungamento dei ricoveri ospedalieri e il ricorso a farmaci più costosi (Poudel AN et al., 2023; Naylor NR et al., 2025).

Questi fattori contribuiscono complessivamente a rallentare lo sviluppo economico e a indebolire la sicurezza sanitaria globale, soprattutto nei Paesi a basso e medio reddito, dove le risorse disponibili per contrastare l'AMR sono più limitate. In questi contesti, interventi di sanità pubblica come il rafforzamento delle pratiche di IPC, l'accesso universale a servizi idrici, igienici e sanitari e l'adozione di politiche vaccinali efficaci rappresentano strategie fondamentali per ridurre il carico di malattia associato all'AMR e contenerne i costi (Lewnard JA et al., 2024).

Dal punto di vista sociale l'AMR genera conseguenze rilevanti, in quanto la diffusione di infezioni difficili da trattare riduce la fiducia dei cittadini nei sistemi sanitari e accentua le disuguaglianze, poiché le popolazioni con minore accesso a cure adeguate risultano maggiormente esposte a complicanze e mortalità. Inoltre, tali infezioni comportano un impatto significativo sulla qualità di vita dei pazienti e delle famiglie, con ricoveri prolungati, isolamento e un aumento del carico assistenziale (Shutt AE et al., 2025).

L'AMR incide negativamente anche sulla sfera lavorativa, determinando maggior assenteismo, minore produttività e costi indiretti per famiglie e imprese. Infine, la limitata consapevolezza della popolazione sull'uso degli antibiotici ostacola l'adozione di comportamenti appropriati, contribuendo ad amplificare questo fenomeno (Keenan K et al., 2025; Ferraz MP, 2024).

2.1.2 Cause, diffusione e approccio “One Health”

L'AMR è un fenomeno complesso che ha origine da processi microbiologici e molecolari alla base della capacità dei microrganismi di sopravvivere all'azione degli antimicrobici. La comprensione dei meccanismi di resistenza è cruciale per sviluppare strategie di trattamento efficaci, progettare nuovi farmaci, monitorare l'insorgenza di minacce emergenti e guidare gli sforzi di *stewardship* antimicrobica (Bo L et al., 2024).

In base alla modalità di sviluppo, si distinguono tre principali forme di resistenza:

- Resistenza intrinseca (o naturale), naturalmente presente in alcune specie batteriche, indipendentemente dalla precedente esposizione all'antibiotico e non correlata al processo di trasferimento genico orizzontale (*Horizontal Gene Transfer*, HGT); deriva spesso dall'assenza del bersaglio dell'antibiotico o da caratteristiche strutturali innate, come la bassa permeabilità della membrana esterna dovuta ai lipopolisaccaridi (LPS) nei batteri Gram-negativi o l'attività naturale delle pompe di efflusso;
- Resistenza acquisita, che si sviluppa attraverso mutazioni genetiche, o più frequentemente, mediante l'acquisizione di geni di resistenza da altri microrganismi, che avviene principalmente tramite HGT;
- Resistenza adattativa, una forma transitoria indotta da condizioni ambientali sfavorevoli (stress, stato di crescita, pH, concentrazioni ioniche o esposizione a livelli sub-inibitori di antibatterici), che comporta modificazioni fenotipicamente reversibili (Belay WY et al., 2024).

Tra i meccanismi che favoriscono il fenomeno dell'HGT e la trasmissione della resistenza mediante coniugazione, trasformazione e trasduzione, rivestono un ruolo centrale gli elementi genetici mobili (*Mobile Genetic Elements*, MGEs) quali plasmidi, integroni e trasposoni (Liu G et al., 2022; Oliveira M et al., 2024).

La diffusione dell'AMR è il risultato di un insieme complesso di cause interconnesse, che coinvolgono non solo il settore umano, ma anche quello animale, ambientale e agricolo (Tang KWK et al., 2023). L'uso inappropriato ed eccessivo di antibiotici rappresenta la principale causa dell'insorgenza e della diffusione. In ambito clinico, tra i fattori più rilevanti si annoverano l'inappropriatezza prescrittiva, l'automedicazione, l'interruzione precoce delle terapie, nonché l'uso di antibiotici ad ampio spettro (Aslam B et al., 2021).

In ambito zootecnico, gli antimicrobici vengono frequentemente impiegati non solo a fini terapeutici, ma anche per scopi profilattici o come promotori della crescita, contribuendo in modo significativo alla pressione selettiva nei confronti di batteri commensali e patogeni. Questa pratica è particolarmente diffusa nei Paesi a basso e medio reddito, dove la somministrazione routinaria di antibiotici negli allevamenti avviene spesso in assenza di prescrizione e senza adeguata

consapevolezza delle implicazioni legate all'AMR (Di KN et al., 2021). L'uso di antimicrobici in ambito veterinario rappresenta una significativa fonte di pressione selettiva per lo sviluppo di ceppi resistenti che possono essere trasmessi all'uomo attraverso la catena alimentare, il contatto diretto con animali o l'ambiente contaminato (Aslam B et al., 2021; Graham DW et al., 2019).

Quest'ultimo rappresenta un importante veicolo per la diffusione dell'AMR in quanto il frequente rilascio di residui di antibiotici, metaboliti e batteri resistenti attraverso le acque reflue ospedaliere, industriali e agricole, contribuisce alla selezione e disseminazione di geni di resistenza. In particolare, gli impianti di depurazione delle acque reflue, pur svolgendo una funzione essenziale di contenimento, possono fungere da *hotspot* per la diffusione di geni di resistenza in un contesto ad alta densità microbica e pressioni selettive ambientali (Nguyen AQ et al., 2021; Zhao F et al., 2023).

In risposta alla crescente minaccia posta dall'AMR, si è resa necessaria l'adozione di un approccio “*One Health*”, il quale rappresenta una strategia integrata, multisettoriale e interdisciplinare, che riconosce e promuove la cooperazione tra il settore umano, animale e ambientale, sottolineando come la salute di ciascun comparto dipenda strettamente dagli altri (WHO Regional Office for Europe, 2024b).

Tali politiche si articolano attraverso interventi coordinati a livello globale, come il *Global Action Plan on AMR* adottato nel 2015 (WHO, 2015d), che si fondava su specifici obiettivi strategici, quali l'aumento della consapevolezza e della comprensione dell'AMR attraverso campagne formative; il potenziamento delle conoscenze tramite attività di sorveglianza e ricerca scientifica; il contenimento dell'incidenza delle infezioni attraverso l'implementazione delle pratiche di igiene, sanificazione e prevenzione; l'ottimizzazione dell'uso degli antimicrobici sia in medicina umana che veterinaria; la promozione di investimenti sostenibili nella ricerca e nello sviluppo di nuovi farmaci, vaccini, strumenti diagnostici e interventi alternativi, adattati alle esigenze specifiche dei singoli Paesi.

L'attuazione di questi obiettivi è stata guidata da Organizzazioni internazionali di riferimento, tra cui l'OMS, l'Organizzazione Mondiale per la Sanità Animale (WOAH, World Organization for Animal Health), l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations) e, più recentemente, il Programma delle Nazioni Unite per l'Ambiente (UNEP, United Nations Environment Programme).

Le istituzioni coinvolte hanno definito congiuntamente il “*One Health Joint Plan of Action 2022–2026*” (FAO, UNEP, WHO, WOAH; 2022) agendo in sinergia nell'ambito dell'alleanza, sostenendo un approccio integrato alla prevenzione e gestione delle problematiche sanitarie globali e ponendo l'accento sulla costruzione di sistemi più resilienti e sull'attuazione coordinata di interventi a livello locale, regionale e globale.

Nonostante l'approccio "*One Health*" rappresenti un paradigma innovativo e promettente per il contrasto all'AMR, la sua implementazione risulta ancora ostacolata da numerose criticità di natura sia strutturale, per la mancanza di un coordinamento istituzionale e normativo, sia operativa, per l'assenza di meccanismi di monitoraggio standardizzati e interconnessi, che culturale, a causa della disparità nella consapevolezza e nella formazione degli operatori coinvolti (Booton RD et al., 2021). A livello europeo, il contrasto all'AMR è stato rafforzato da una serie di iniziative strategiche che si fondano sull'approccio "*One Health*". Tra queste, spicca il Piano d'Azione dell'UE "*One Health*" contro l'AMR del 2017, che delinea oltre settanta azioni riguardanti la salute umana, la salute animale e l'ambiente e i cui progressi sono stati regolarmente monitorati (Commissione Europea, 2017). Esso è stato recentemente integrato dalla raccomandazione del Consiglio del 13 giugno 2023 (*Council of the European Union*, 2023), che estende il suddetto piano a tutte e tre le dimensioni dello spettro "*One Health*" al fine di conseguire una risposta efficace contro l'AMR in tutta l'UE.

A livello nazionale, l'Italia ha adottato il Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025 (Ministero della Salute, 2023), che rappresenta l'evoluzione del precedente (PNCAR 2017-2020), articolandosi in quattro aree orizzontali (formazione, comunicazione, ricerca e cooperazione) e tre pilastri verticali (sorveglianza integrata, prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza e uso appropriato degli antibiotici).

Tra i suoi obiettivi strategici si evidenziano il rafforzamento della prevenzione e della sorveglianza delle ICA, sia in ambito ospedaliero che comunitario; lo sviluppo di una sorveglianza nazionale coordinata sull'uso degli antibiotici e sulla resistenza, secondo l'approccio "*One Health*"; la promozione dell'uso appropriato degli antimicrobici in medicina umana e veterinaria; il sostegno alla ricerca e all'innovazione nella prevenzione, diagnosi e terapia delle infezioni resistenti; il potenziamento della cooperazione nazionale e internazionale e il miglioramento della consapevolezza pubblica e della formazione degli operatori sanitari e ambientali.

Pur configurandosi come una valida strategia ispirata all'approccio "*One Health*", il PNCAR 2022-2025 presenta tuttavia alcune criticità, quali la frammentazione istituzionale, l'eterogeneità nell'attuazione a livello regionale, l'insufficiente integrazione dei sistemi di sorveglianza e la carenza di indicatori standardizzati di monitoraggio, che rappresentano ostacoli significativi alla piena realizzabilità degli obiettivi prefissati. Tali limiti evidenziano la necessità di un rafforzamento del coordinamento intersettoriale e di un consolidamento delle capacità tecniche e organizzative per garantire un'effettiva implementazione delle azioni previste (ISS, 2022d).

2.1.3 Sfide attuali e strategie di contrasto all'antibiotico-resistenza

L'attuale panorama dell'AMR è caratterizzato da una crescente complessità e le sfide principali rispetto a tale tema coinvolgono molteplici ambiti, che spaziano dalla *governance* sanitaria alla ricerca scientifica, dalla *stewardship* antimicrobica alla consapevolezza della popolazione generale, richiedendo una risposta sistemica, integrata e sostenibile (Ferraz MP, 2024).

In primo luogo, il contrasto efficace all'AMR richiede un modello di *governance* sanitaria multilivello, in grado di coordinare interventi trasversali al settore sanitario, veterinario e ambientale e di coinvolgere attori istituzionali a livello nazionale ed internazionale, unitamente al supporto di un impegno politico costante e di una visione strategica di lungo periodo (Maugeri A et al., 2023).

In tale ottica, risultano centrali l'adozione e l'attuazione di politiche sanitarie pubbliche *evidence-based*, capaci di regolamentare in modo stringente l'uso degli antimicrobici attraverso strumenti normativi efficaci, sistemi di sorveglianza integrati e meccanismi di valutazione dell'impatto delle misure adottate (Pinto Ferreira J et al., 2022).

Un ulteriore ambito critico riguarda il rafforzamento della *stewardship* antimicrobica, intesa come l'insieme delle azioni e delle politiche sanitarie volte a garantire un uso prudente, razionale e responsabile degli antimicrobici. Con il termine "*antimicrobial stewardship*" si intende un approccio collaborativo e multidisciplinare che mira proprio a garantire l'uso ottimale degli agenti antimicrobici, in termini di scelta, dosaggio, via di somministrazione e durata della terapia, al fine di massimizzarne l'efficacia clinica, ridurre gli effetti collaterali e, soprattutto, limitare la selezione di microrganismi resistenti (Majumder MAA et al., 2020).

I programmi di *stewardship* antibiotica (*Antimicrobial Stewardship Programs*, ASP), promossi da una stretta collaborazione tra professionisti sanitari, microbiologi, specialisti in malattie infettive, medici, infermieri, agricoltori, veterinari e farmacisti clinici, prevedono una gestione attiva e continua dell'uso degli antimicrobici sia in ambito ospedaliero che territoriale attraverso l'implementazione di interventi *evidence-based*. Le azioni concrete previste da tali programmi comprendono la revisione periodica delle terapie antimicrobiche sulla base dei risultati microbiologici e della risposta clinica; la valutazione sistematica dell'appropriatezza prescrittiva; la formazione continua del personale sanitario in materia di resistenze, linee guida aggiornate e buone pratiche prescrittive; l'adozione di protocolli terapeutici standardizzati, in accordo con le più recenti evidenze scientifiche e adattabili ai contesti locali e, infine, l'utilizzo di sistemi informativi clinici in grado di supportare il processo decisionale e monitorare l'andamento delle prescrizioni (WHO, 2019e).

In contesti ospedalieri, la presenza di *team* dedicati alla *stewardship* antimicrobica, adottando l'approccio del *Prospective Audit and Feedback* (PAF) noto anche come revisione post-prescrizione,

ha dimostrato di ridurre l'uso inappropriato di antibiotici ad ampio spettro, migliorare gli esiti clinici e diminuire l'incidenza di infezioni da patogeni multiresistenti (Giamarellou H et al., 2023).

In ambito territoriale, dove si registra la quota più alta di prescrizioni antibiotiche, è cruciale sensibilizzare anche i medici di medicina generale e i pediatri di libera scelta affinché adottino criteri diagnostici rigorosi prima di avviare una terapia antimicrobica (Zetts RM et al., 2020; Donà D et al., 2020). Inoltre, gli ASP svolgono un ruolo cruciale nel settore veterinario e agroalimentare, con lo scopo di promuovere pratiche sostenibili, ridurre l'uso profilattico e terapeutico non necessario e incoraggiare misure alternative come la vaccinazione, il miglioramento delle condizioni igieniche e la biosicurezza (Umber JK et al., 2021).

In Italia, le iniziative di “*antimicrobial stewardship*” sono state promosse e implementate attraverso linee guida elaborate da importanti società scientifiche italiane, tra cui il Gruppo Italiano per la Stewardship Antimicrobica (GISA), a supporto di programmi strutturati per un uso appropriato degli antimicrobici e per l'adozione di misure di controllo delle infezioni, come l'utilizzo di test diagnostici rapidi. Particolare attenzione viene dedicata alla formazione continua degli operatori sanitari, riconoscendo l'importanza dell'approccio “*One Health*” come strategia integrata per contrastare efficacemente l'AMR (Tiseo G et al., 2022).

Un ulteriore elemento imprescindibile è rappresentato dall'investimento nella ricerca scientifica e nell'innovazione tecnologica, che costituiscono il motore per lo sviluppo di nuovi antimicrobici, per il potenziamento della diagnostica avanzata e per l'elaborazione di strategie terapeutiche alternative. Nonostante sia stato evidenziato un progressivo aumento del numero di antimicrobici in fase di sperimentazione clinica, vi è un'urgente necessità di sviluppare nuovi agenti innovativi capaci di sostituire farmaci diventati ormai inefficaci (WHO, 2024f).

La crescente difficoltà nell'identificazione di nuove molecole efficaci contro i patogeni multiresistenti impone un ripensamento dei modelli di incentivazione alla ricerca, con il coinvolgimento attivo di enti pubblici, università, industrie farmaceutiche e fondazioni private (Agenzia Italiana del Farmaco). In questo contesto, si stanno affermando modelli di finanziamento *push and pull*, volti rispettivamente a sostenere la fase di ricerca e sviluppo e a garantire un ritorno economico sostenibile per i produttori, anche in presenza di un uso limitato dei nuovi farmaci per motivi di *stewardship* (Anderson M et al., 2023).

Parallelamente, la *Diagnostic Stewardship*, intesa come l'impiego di tecnologie diagnostiche rapide e accurate, riveste un ruolo strategico nel migliorare la precisione prescrittiva e ridurre l'uso empirico degli antimicrobici, in quanto favorisce scelte terapeutiche mirate, limitando il ricorso alla somministrazione di antibiotici ad ampio spettro (Zakhour J et al., 2023).

L'integrazione di tali strumenti nei percorsi clinici e nei sistemi informativi sanitari rappresenta una sfida organizzativa e tecnologica, ma anche un'opportunità per rendere più efficiente e sostenibile la gestione delle infezioni (Singh HK et al., 2024).

Un'ulteriore sfida rilevante è rappresentata dalla persistenza di una sorveglianza ancora incompleta e disomogenea. Nonostante i progressi compiuti a livello nazionale ed europeo, permangono ancora criticità nei flussi informativi, nella raccolta sistematica dei dati e nella loro armonizzazione tra i diversi settori (umano, veterinario e ambientale), che compromettono la possibilità di condurre analisi epidemiologiche integrate e di attuare pienamente l'approccio "*One Health*" (Mori V et al., 2025).

Un ulteriore pilastro nella prevenzione dell'AMR è rappresentato dall'adozione di pratiche avanzate di IPC, tra cui la promozione della vaccinazione come strumento chiave per ridurre l'incidenza di infezioni batteriche e, di conseguenza, la necessità di trattamento antibiotico (Ho CS et al., 2025).

Infine, è fondamentale promuovere la sensibilizzazione della popolazione generale attraverso campagne di educazione sanitaria mirate, al fine di aumentare la consapevolezza sull'uso appropriato degli antibiotici, contrastare la tendenza all'autoprescrizione e promuovere comportamenti responsabili (Kosiyaporn H et al., 2020).

2.2 Le Infezioni Correlate all'Assistenza (ICA)

2.2.1 Definizione, importanza clinica e fattori di rischio

La crescente diffusione dell'AMR è considerata come una delle principali sfide per la sanità pubblica, con un impatto rilevante in ambito ospedaliero. In questo contesto, le ICA rappresentano una delle principali vie attraverso cui i microrganismi resistenti si trasmettono e si selezionano, rendendo le strategie di controllo ancora più complesse (Ayobami O et al., 2022).

Esse si definiscono come infezioni dovute a batteri, funghi, virus o altri agenti patogeni meno comuni, che possono verificarsi in qualsiasi contesto assistenziale e che al momento dell'ingresso nella struttura o prima dell'erogazione dell'assistenza non erano manifeste clinicamente, né erano in incubazione (ISS, 2021a). Secondo la definizione dell'ECDC, un'infezione è considerata correlata all'assistenza quando insorge dopo almeno 48 ore dal ricovero, oppure entro 30 giorni da un intervento chirurgico o 90 giorni in caso di impianto di dispositivi protesici (ECDC, 2024f).

I fattori di rischio associati allo sviluppo delle ICA sono molteplici, spesso interconnessi, e tra i più rilevanti vi è l'utilizzo di dispositivi medici invasivi, come cateteri venosi centrali o urinari a permanenza e ventilatori meccanici, che rappresentano una via d'ingresso privilegiata per i microrganismi patogeni (Dadi NCT et al., 2021; Murni IK et al., 2022).

Altri determinanti significativi includono la durata prolungata del ricovero, l'esposizione a procedure chirurgiche complesse, la terapia antibiotica inappropriata o protratta nel tempo e lo stato immunitario compromesso del paziente (Sartelli M et al., 2024).

Inoltre, il rischio di ICA aumenta considerevolmente nei reparti ad alta intensità di cura, come le unità di terapia intensiva, dove l'elevata presenza di pazienti critici, l'ampio utilizzo di antibiotici e l'esecuzione di procedure invasive rappresentano condizioni favorevoli alla trasmissione dei patogeni, inclusi ceppi multiresistenti (ECDC, 2025e).

Fattori organizzativi e strutturali svolgono anch'essi un ruolo chiave, come la carenza di personale sanitario e la scarsa aderenza alle misure di igiene e prevenzione, in particolare l'igiene delle mani, che resta uno degli strumenti più efficaci e al contempo trascurati nel controllo delle infezioni (Alshagrawi S et al., 2024; Mouajou V et al., 2022).

Infine, la complessità delle interazioni tra i fattori di rischio, unita alla crescente diffusione dell'AMR, richiedono un approccio integrato e multidisciplinare, che includa la sorveglianza attiva, il monitoraggio continuo, l'implementazione di protocolli di prevenzione personalizzati e la formazione continua del personale sanitario (Delpy L et al., 2024).

2.2.2 Tipologie principali di ICA

Le ICA rappresentano la complicanza più frequente e grave associata all'assistenza sanitaria. Si distinguono in esogene, se trasmesse da persona a persona o tramite gli operatori e l'ambiente, ed endogene, se causate da batteri presenti all'interno dell'organismo.

Le ICA possono manifestarsi con diverse forme cliniche, a seconda della sede anatomica coinvolta, del tipo di procedura sanitaria eseguita e delle caratteristiche del paziente (Salzo A et al., 2021).

Le tipologie principali riconosciute dai sistemi di sorveglianza sono:

- Infezioni del tratto urinario (*Urinary Tract Infections*, UTI): rappresentano una delle forme più comuni, con una prevalenza del 19,2% delle ICA in ambito ospedaliero nei paesi UE/EEA (ECDC, 2024f). Tra queste, una quota significativa (43-56%) è direttamente associata all'uso di cateteri vescicali a permanenza (*Catheter-Associated Urinary Tract Infections*, CAUTI) (Werneburg GT, 2022). Le CAUTI sono frequentemente causate da batteri gram-negativi enterici e cocchi gram-positivi, tra cui *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *Candida spp.* nei pazienti immunocompromessi o sottoposti a terapia antibiotica prolungata (Gambrill B et al., 2024). La crescente incidenza di ceppi MDR, come quelli produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (*Extended-Spectrum Beta-Lactamases*, ESBL) o resistenti ai carbapenemi, complica ulteriormente la loro gestione terapeutica (ECDC, 2025c).

Il rischio di sviluppare batteriuria aumenta con la durata del cateterismo e una quota significativa di pazienti può andare incontro a conseguenze gravi come pielonefrite, batteriemia e sepsi, con tassi di mortalità che, nei casi più gravi, possono variare dal 10% al 30% (Hooton TM et al., 2009).

- Infezioni del sito chirurgico (*Surgical Site Infections*, SSI): rappresentano una delle principali complicanze post-operatorie e costituiscono circa il 20% di tutte le ICA, con un'incidenza variabile (1-30%) a seconda del tipo di procedura chirurgica e dei fattori correlati al paziente (Ripabelli G et al., 2023; Rezaei AR et al., 2025). Le ISC si verificano nella sede dell'incisione chirurgica entro 30 giorni dall'intervento o entro 90 giorni per le infezioni profonde e di organo/spazio, in caso di impianto di dispositivi protesici (ISS, 2022b). Le ISC costituiscono una causa significativa di morbosità, prolungamento della degenza e riammissioni ospedaliere (Mengistu DA et al., 2023). I patogeni più frequentemente isolati includono *S. aureus*, inclusi i ceppi resistenti alla meticillina, *P. aeruginosa* e batteri gram-negativi enterici (Pinchera B et al., 2022).

Numerosi fattori possono aumentare il rischio di ISC, tra cui la durata prolungata dell'intervento chirurgico, la scarsa asepsi intraoperatoria, l'obesità, il diabete, l'immunosoppressione, l'uso

inappropriato di profilassi antibiotica e la presenza di dispositivi impiantabili o drenaggi (Rezaei AR et al., 2025).

- Infezioni delle vie respiratorie inferiori (Lower Respiratory Tract Infections, LRTI): soprattutto in pazienti ricoverati in reparti di terapia intensiva e includono polmonite nosocomiale e polmonite associata a ventilazione meccanica (*Ventilator-Associated Pneumonia*, VAP) come forme più frequenti e gravi, con un impatto significativo sulla morbilità, sulla durata della degenza e sulla mortalità ospedaliera (Rodríguez A et al., 2025). La VAP si sviluppa, generalmente, dopo almeno 48 ore di intubazione e ventilazione meccanica ed è causata dalla colonizzazione microbica delle vie respiratorie inferiori e favorita da fattori come l'aspirazione di secrezioni orofaringee, l'igiene orale inadeguata e la compromissione delle difese immunitarie (Modi AR et al., 2020).

I patogeni più frequentemente isolati sono batteri gram-negativi come *A. baumannii*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, e gram-positivi come *S. aureus* meticillino-resistente (Mastrogianni M et al., 2023).

La presenza di ceppi MDR complica la gestione terapeutica, richiedendo spesso l'uso di antibiotici di ultima generazione e strategie empiriche basate su linee guida specifiche. Le complicanze delle LRTI includono insufficienza respiratoria acuta, sindrome da distress respiratorio acuto, sepsi e dipendenza prolungata dalla ventilazione meccanica.

Queste condizioni determinano un prolungamento della degenza in terapia intensiva, un aumento dei costi sanitari e della mortalità, che può superare il 30% nei casi più gravi (Bardají-Carrillo M et al., 2024).

- Infezioni del torrente ematico correlate a catetere venoso centrale (Central Venous Catheter-Related Bloodstream Infections, CVC-BSI): rappresentano una delle forme più gravi di ICA e si verificano quando i microrganismi colonizzano la superficie interna o esterna del catetere venoso centrale (CVC), penetrando nel torrente ematico e causando un'infezione sistemica (Pitiriga V et al., 2020). Secondo una recente revisione sistematica, la prevalenza media di CVC-BSI nei reparti di terapia intensiva è di circa 4,9 episodi per 1.000 giorni-catetere, che superano i 7.6 episodi in contesti ad alta complessità assistenziale (de Grooth HJ et al., 2024). Le CVC-BSI sono spesso causate da *S. aureus* (inclusi ceppi MRSA), *S. epidermidis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Candida spp.*, soprattutto nei pazienti immunocompromessi o sottoposti a terapia antibiotica prolungata. I principali fattori predisponenti includono: durata prolungata del cateterismo, tecniche di inserzione non sterili, mancata igiene del sito di inserzione, assenza di *bundle* assistenziali per la gestione del CVC, immunosoppressione e comorbidità multiple (Rajandra A et al., 2025). Le CVC-BSI rappresentano un indicatore sensibile della qualità dell'assistenza nei

reparti ad alta intensità di cura e l'insorgenza è spesso correlata a eventi evitabili e, pertanto, rientra tra le infezioni target nei programmi di sorveglianza e prevenzione (Dadi NCT et al., 2021).

- Infezioni gastrointestinali causate da *Clostridioides difficile* (*Clostridioides difficile* Infections, CDI): batterio anaerobio, sporigeno e gram-positivo, fa parte del microbiota intestinale in alcuni individui, ma può diventare patogeno in condizioni di disbiosi, spesso indotta dall'uso di antibiotici ad ampio spettro. Secondo l'ECDC, le CDI costituiscono circa il 50% delle infezioni gastrointestinali nosocomiali in Europa e sono responsabili di un importante *burden* clinico e assistenziale (ECDC, 2025g).

Le manifestazioni cliniche variano da forme lievi di diarrea acquosa a quadri gravi come colite pseudomembranosa, megacolon tossico, perforazione intestinale e sepsi. I tassi di mortalità associati possono superare il 10% nei pazienti fragili, con recidiva fino al 20-30% dopo il primo episodio (Gawey BJ et al., 2023).

- Infezioni della cute e dei tessuti molli associate a dispositivi invasivi: si manifestano frequentemente nei pazienti portatori di dispositivi medici a lungo termine, come drenaggi chirurgici, gastrostomie, tracheostomie e cateteri venosi periferici a lungo termine. I principali agenti patogeni coinvolti includono *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacteriaceae*, e *Pseudomonas spp.* I fattori predisponenti includono la lunga durata di permanenza del dispositivo, tecniche di inserzione non sterili e scarsa igiene del sito (Mishra A et al., 2024).

2.2.3 Meccanismi di insorgenza e diffusione

L'insorgenza e la diffusione delle ICA derivano da un insieme complesso di fattori biologici, ambientali, clinici e organizzativi interconnessi. Queste infezioni non sono eventi casuali, ma il risultato di dinamiche ben definite che coinvolgono microrganismi patogeni, vulnerabilità del paziente, uso di dispositivi medici e pratiche assistenziali (Sandu AM et al., 2025).

Il primo stadio dell'infezione è l'ingresso del microrganismo nell'ospite, che avviene frequentemente attraverso barriere corporee compromesse (ferite chirurgiche, mucose danneggiate, lesioni cutanee) oppure mediante dispositivi medici invasivi (cateteri venosi, drenaggi, ventilatori, PEG, tracheostomie). Questi strumenti favoriscono la colonizzazione microbica e rappresentano superfici ideali per la formazione di biofilm (Mangalea MR et al., 2024), strutture tridimensionali composte da comunità microbiche inglobate in una matrice extracellulare, che conferiscono ai microrganismi una resistenza elevata agli antibiotici e una protezione contro il sistema immunitario, rendendo l'infezione persistente e difficile da eradicare (Bouhrour N et al., 2024).

Patogeni come *Acinetobacter* spp., *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* sono in grado di sopravvivere per lungo tempo su superfici inanimate, dispositivi mobili e strumenti diagnostici portatili. Questa capacità di resistenza ambientale facilita la trasmissione anche in assenza di contatto diretto, rendendo la sanificazione ambientale e la corretta gestione dei dispositivi elementi essenziali nel controllo delle ICA (Denissen J et al., 2022).

La colonizzazione può avere origine esogena, attraverso contatto diretto con operatori sanitari o indiretto tramite superfici, strumenti contaminati, *droplets* e aerosol, oppure endogena, quando il microbiota residente del paziente viene alterato da terapie antibiotiche prolungate, immunosoppressione o comorbidità croniche (Gastmeier P, 2020).

La diffusione è amplificata dal trasferimento orizzontale di geni di resistenza (HGT), che consente ai microrganismi di acquisire rapidamente fattori di virulenza e resistenza, generando popolazioni eterogenee altamente adattabili. Questo fenomeno è particolarmente rilevante nei patogeni del gruppo ESKAPE, noti per la capacità di persistere in forma subclinica, colonizzare superfici e dispositivi e originare focolai epidemici difficilmente controllabili (Kelly JB et al., 2024).

L'insorgenza delle ICA è favorita da condizioni cliniche del paziente quali compromissione immunitaria (oncologici, trapiantati, pazienti in terapia immunosoppressiva), presenza di comorbidità multiple (diabete, broncopneumopatia cronica ostruttiva, insufficienza renale), degenza prolungata, procedure invasive ripetute ed esposizione ad antibiotici ad ampio spettro (Antonelli A et al., 2024). La movimentazione dei pazienti tra reparti, le procedure eseguite al letto, l'utilizzo di dispositivi condivisi e i trasferimenti da altre strutture sanitarie (RSA, lungodegenze) favoriscono l'introduzione e la circolazione di ceppi MDR. Il *continuum* ospedale-territorio rappresenta un ecosistema

interconnesso in cui microrganismi resistenti possono circolare e ristabilirsi rapidamente, alimentando cicli di trasmissione difficili da interrompere (Flores-Treviño S, 2025). Inoltre, le ICA determinano un incremento dell'impiego di antimicrobici e, parallelamente, l'esposizione a trattamenti empirici ad ampio spettro favorisce l'espansione di ceppi resistenti (Šuljagić V et al., 2025).

La complessità dei processi alla base dell'insorgenza e diffusione delle ICA richiede un approccio sistemico e integrato, supportato da programmi strutturati di IPC, audit periodici, sorveglianza microbiologica, *stewardship* antibiotica e gestione ottimizzata dei percorsi di cura. Solo una visione multidimensionale, che includa anche l'approccio “*One Health*”, può garantire un controllo efficace e sostenibile delle ICA nel lungo periodo (Puro V et al., 2022).

2.2.4 Epidemiologia delle ICA a livello globale, europeo ed italiano

A livello mondiale, le ICA figurano tra gli eventi avversi più frequenti dell'ospedalizzazione. Si stima che nei Paesi ad alto reddito circa 7 pazienti ogni 100 ricoverati contraggano almeno un'ICA, mentre nei Paesi a basso reddito il dato sale a 10 su 100. Di questi, circa il 10% sperimenta un esito infausto, con mortalità attribuibile all'infezione (Abban MK et al., 2023; Sandu AM et al., 2025).

Le categorie di ICA più frequentemente riportate includono, secondo i *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), VAP, infezioni del circolo sanguigno legate a cateteri venosi centrali (*Central Line-Associated Bloodstream Infections*, CLABSI), CAUTI e SSI (CDC, 2025a).

Una metanalisi globale recente ha stimato una prevalenza complessiva di ICA dello 0,14%, sebbene nei Paesi a basso reddito la prevalenza stimata raggiunga il 0,32%, mentre nei Paesi ad alto reddito si attesti attorno allo 0,06% (Raoofi S et al., 2023).

Il rischio di contrarre un'ICA aumenta con l'età: la prevalenza nei pazienti over 85 raggiunge l'11,5% rispetto al 7,4% nei pazienti con meno di 65 anni (Cristina ML et al., 2021). Questo trend è coerente con una maggiore fragilità clinica, un'elevata presenza di comorbidità e un'esposizione prolungata a dispositivi medici e terapie antibiotiche.

Il principale microrganismo isolato in questo tipo di infezioni è *E. coli*, seguito da stafilococchi coagulasi-negativi, *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Raoofi S et al., 2023). Le infezioni più comuni sono quelle da ferita e la prevalenza più elevata di ICA è stata segnalata nei reparti dove vengono effettuati trapianti, seguiti dalle terapie intensive neonatali e dalle terapie intensive (Raoofi S et al., 2023). Inoltre, numerosi fattori intrinseci quali diabete mellito, stato di immunosoppressione, temperatura corporea superiore o uguale a 38°C, ed estrinseci come durata dell'intervento chirurgico, reintervento, uso di cefalosporine, durata di utilizzo di catetere venoso centrale, ricovero in terapia intensiva, durata di degenza in terapia intensiva e uso di ventilazione meccanica sono risultati significativamente associati al rischio di sviluppare ICA (Rodríguez-Acelas AL et al., 2017).

In Europa, l'epidemiologia delle ICA è monitorata sistematicamente dall'ECDC tramite rilevazioni di prevalenza puntuale (*Point Prevalence Survey*, PPS) negli ospedali per acuti e indagini nelle strutture di assistenza a lungo termine (*Healthcare Associated infections and antimicrobial use in European Long-Term Care Facilities*, HALT).

Secondo l'ultimo PPS (2022–2023), condotto in 28 Paesi UE/SEE su oltre 293.000 pazienti, la prevalenza di almeno un'ICA è risultata del 7,1%, che dopo validazione si è attestata all'8,0% (ECDC, 2024f).

Inoltre, il 26% delle infezioni era già presente al momento dell'ammissione, mentre il 43,3% era correlato a una precedente degenza nello stesso ospedale, il 24,1% proveniva da altre strutture

sanitarie residenziali e il 9,7% aveva origine non nota, suggerendo forti elementi di circolazione intraospedaliera e inter-struttura (ECDC, 2024f).

Le tipologie più frequenti di ICA sono risultate: infezioni delle basse vie respiratorie (29,3%), con un significativo contributo di COVID-19, infezioni urinarie (19,2%), infezioni del sito chirurgico (16,1%), infezioni del circolo sanguigno (11,9%) e gastrointestinali (9,5%), di cui oltre il 60% dovuto a *Clostridioides difficile*.

La prevalenza delle ICA è risultata più elevata nel reparto di terapia intensiva (20,5%, rispetto a 7,3% in reparti con specialità chirurgiche o 7,7% per medicina), confermando il ruolo critico delle procedure invasive nelle dinamiche di diffusione nosocomiale.

I microrganismi maggiormente isolati sono stati: *Escherichia coli* (12,7%), *Klebsiella* spp. (11,7%, di cui 9,4% *K. pneumoniae*), *Enterococcus* spp. (10%), SARS-CoV-2 (9,5%), *S. aureus* (9%), *C. difficile* (8%), *P. aeruginosa* (7,9%), stafilococchi coagulasi-negativi (5,8%), *Candida* spp. (4,7%), *Proteus* spp. (3,2%), *Acinetobacter* spp. (3,2%) e *Enterobacter* spp. (3%). Inoltre, l'analisi ha evidenziato livelli di resistenza significativi in diversi patogeni di interesse clinico. In particolare, la resistenza alla meticillina è stata rilevata nel 23,7% degli isolati di *S. aureus*, mentre la resistenza alla vancomicina ha interessato il 15,6% degli *Enterococcus* spp.

Tra gli Enterobatteri, la resistenza alle cefalosporine di terza generazione ha raggiunto il 34,7%, con valori più elevati nei ceppi di *K. pneumoniae*. La resistenza ai carbapenemi è stata osservata nel 9,3% degli Enterobatteri, con una prevalenza più alta in *K. pneumoniae*. Percentuali particolarmente critiche di resistenza ai carbapenemi sono emerse anche in altri patogeni, tra cui *P. aeruginosa* (29,7%) e *A. baumannii* (82,9%).

Parallelamente, le indagini HALT offrono un quadro complementare: nell'ultimo studio (HALT-4, 2023–2024), su 61.045 residenti in 18 Paesi UE/SEE, la prevalenza di ICA è risultata del 3,1%. Le infezioni più comuni sono state quelle delle vie urinarie (34,3%), respiratorie (27,3%) e cutanee (23,9%). Tuttavia, solo il 20% delle infezioni aveva una conferma microbiologica, sottolineando limiti nelle pratiche diagnostiche nelle LTCF (ECDC, 2025d).

I patogeni più frequenti sono stati *E. coli* (32,6%), SARS-CoV-2 (14,1%), *K. pneumoniae* (9,8%), *S. aureus* (7,9%), *Proteus mirabilis* (6,8%), *P. aeruginosa* (5,2%), *Enterococcus faecalis* (3,3%), *Enterobacter cloacae* (1,6%), *Providencia* spp. (1,6%), *C. difficile* (1,4%) e *Klebsiella* spp. (1,4%). Infine, un recente studio di sorveglianza longitudinale che ha coinvolto oltre 3.000 residenti di 65 strutture socio-sanitarie in nove Paesi europei nel periodo 2022–2023 ha evidenziato che, oltre la metà dei residenti ha sviluppato almeno un episodio di ICA durante i 12 mesi di sorveglianza, corrispondente a un tasso di incidenza di 1,8 per 1.000 giorni-residente (Ricchizzi E et al., 2025).

I decessi in cui un'ICA è stata identificata come causa principale o contributiva hanno rappresentato oltre il 20% del totale, principalmente correlati a infezioni respiratorie, infezioni delle vie urinarie e COVID-19. Le stesse infezioni respiratorie e urinarie hanno mostrato i tassi di incidenza più elevati (rispettivamente 1,1 e 0,8 per 1.000 giorni-residente), rappresentando inoltre la quota maggiore di ospedalizzazioni associate (Ricchizzi E et al., 2025).

Nel contesto europeo, l'Italia si colloca tra i Paesi maggiormente interessati da tale fenomeno. Nell'ultimo PPS del 2022-2023, è infatti risultata il secondo Paese europeo per numero assoluto di casi di ICA segnalati e il quinto per prevalenza complessiva, comunque superiore alla media UE/SEE (Vicentini C et al., 2025).

I pazienti italiani hanno mostrato una degenza più lunga, maggiore gravità delle condizioni di base del paziente, maggior uso di dispositivi invasivi e ricorso a procedure chirurgiche rispetto alla media europea, confermando un profilo di rischio più elevato (Vicentini C et al., 2025).

Questo quadro è in larga parte giustificato dalla particolare struttura demografica del Paese, dato che l'Italia presenta una delle popolazioni più anziane al mondo (Rapporto ISTAT 2025), dunque maggiormente vulnerabile alle ICA e più frequentemente colpita da patogeni multiresistenti.

Il PPS è stato condotto su 19.740 pazienti in 58 ospedali e la prevalenza di pazienti con almeno un'ICA è stata del 9,8% (ECDC, 2024f). Di queste infezioni, il 78,1% erano di nuova acquisizione durante la degenza. Le unità di terapia intensiva hanno presentato la prevalenza più elevata (21,3%), seguita dai reparti di geriatria (13,7%), medicina (10,7%), chirurgia (9,3%), riabilitazione (6%), pediatria (2,7%), psichiatria (2,1%) e ostetricia/ginecologia (2%).

Riguardo la tipologia di infezioni, il quadro è stato simile a quello europeo, con il 34% di polmoniti o infezioni delle basse vie respiratorie (di cui un'alta percentuale legata a COVID-19), 18% di infezioni del torrente circolatorio (inclusi i cateteri), 17% di infezioni urinarie, 11% di ISC e 8% di infezioni del tratto gastrointestinale (incluse le infezioni da *C. difficile*). Tra i microrganismi isolati, sono risultati più frequenti: SARS-CoV-2, *Klebsiella* spp., *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *C. difficile*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp. e *Proteus* spp.

Anche l'utilizzo di antimicrobici è risultato superiore alla media europea, infatti il 44,7% dei pazienti ricoverati ha ricevuto almeno un antimicrobico al momento della rilevazione, valore che colloca l'Italia al settimo posto in Europa. Ancora più elevata è la proporzione di uso di antimicrobici ad ampio spettro (59,2%), la più alta tra i Paesi analizzati (ECDC, 2024f).

Questi dati riflettono non solo il *burden* clinico delle infezioni, ma anche le crescenti pressioni assistenziali connesse alle attività di prevenzione, alle strategie terapeutiche e al controllo della resistenza antimicrobica.

L'epidemiologia delle ICA a livello globale, europeo e nazionale mostra un fenomeno persistente e in progressiva evoluzione, aggravato dall'emergere e dalla diffusione di ceppi multiresistenti che evidenzia la necessità di interventi mirati nei contesti assistenziali, considerando l'AMR come parte integrante e non come fenomeno separato nelle strategie di prevenzione.

2.2.5 Impatto delle ICA sulla sanità pubblica

Le ICA rappresentano una delle principali sfide per garantire la sicurezza del paziente a livello globale, con ricadute significative non solo sugli esiti clinici individuali, ma anche sull'organizzazione e sull'efficienza dei sistemi sanitari. Esse determinano un peggioramento degli *outcome* clinici, un aumento del rischio di complicanze e di ulteriori infezioni. Le ICA prolungano la degenza ospedaliera e aumentano la necessità di risorse, generando pressione sui reparti, sulla disponibilità di personale e sulla capacità di gestione dei pazienti critici (WHO, 2024k).

A livello globale, si stima che circa il 10% dei pazienti ricoverati acquisisca almeno un'ICA, con tassi più elevati nei Paesi a basso o medio reddito. La presenza di microrganismi resistenti agli antibiotici contribuisce ad aggravare ulteriormente il quadro clinico, con circa un terzo dei patogeni responsabili di ICA resistenti e una stima globale di 136 milioni di casi associati a resistenze antimicrobiche ogni anno (WHO, 2024k).

L'impatto economico delle ICA è rilevante e multidimensionale. I costi diretti derivano da degenze più lunghe, trattamenti più complessi, procedure diagnostiche aggiuntive e riallocazione di risorse ospedaliere. I costi indiretti includono perdita di produttività per pazienti, disabilità residua e ricoveri aggiuntivi. Infine, i costi intangibili riguardano la riduzione della qualità della vita dei pazienti e delle famiglie, nonché la compromissione della fiducia nel sistema sanitario (Tchouaket EN et al., 2024). In Italia, i dati del PPS 2022–2023 stimano più di 400.000 casi annuali di ICA selezionate (polmoniti, infezioni urinarie, infezioni del torrente circolatorio, infezioni del sito chirurgico e infezioni da *C. difficile*), con circa 20.000 decessi e un *burden* complessivo di 564,8 DALY (*disability-adjusted life year*, numero di anni persi a causa della malattia, per disabilità o morte prematura) per 100.000 abitanti, valori superiori alle stime UE/SEE precedenti (ECDC, 2025d).

Un'analisi economica condotta su ospedali italiani ha evidenziato un aumento del costo medio di ricovero del 53,4% per i pazienti con ICA (Orlando S et al., 2024).

Le ICA hanno importanti implicazioni sociali, che vanno oltre la struttura sanitaria. Esse determinano stress psicologico per pazienti e operatori sanitari, contribuiscono ad amplificare le disuguaglianze in termini di salute e incidono sulla produttività lavorativa (Asghar S et al., 2025). La crescente diffusione di microrganismi multiresistenti accentua questi effetti, rendendo più complessa la gestione clinica, aumentando la mortalità e riducendo le opzioni terapeutiche disponibili (Sandu AM et al., 2025).

I dati ECDC 2024 indicano, infatti, un aumento del consumo antibiotico del 2% in UE e del 3% in Italia rispetto al 2019, con conseguente pressione selettiva sui ceppi resistenti (ECDC, 2025h). Tra questi, *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi mostra un'incidenza in aumento sia in Europa sia in

Italia, sottolineando l'insufficienza degli interventi attuali e la necessità di potenziare le strategie di *stewardship* antibiotica e le misure di IPC.

Solo attraverso sistemi di sorveglianza strutturati, formazione continua del personale sanitario, gestione ottimizzata dei percorsi assistenziali e riduzione mirata del consumo di antibiotici è possibile contenere l'impatto clinico, economico e sociale delle ICA nel lungo periodo.

2.3 I microrganismi ESKAPE

2.3.1 Ruolo clinico e ambientale dei microrganismi ESKAPE nelle ICA

Le ICA rappresentano una delle sfide più rilevanti per i sistemi sanitari contemporanei, soprattutto in un contesto di crescente diffusione di ceppi batterici multiresistenti. In questo scenario, il gruppo ESKAPE, acronimo che identifica *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* ed *Enterobacter* spp., assume un ruolo centrale e sottolinea la peculiare capacità di questi microrganismi di “sfuggire” (*escape*) all’azione degli antibiotici e ai comuni meccanismi di controllo delle infezioni (De Oliveira DMP et al., 2020).

Gli ESKAPE sono accomunati dalla capacità di eludere l’azione delle principali classi di antibiotici e di adattarsi efficacemente agli ambienti ospedalieri, colonizzando pazienti vulnerabili e dispositivi medici. La loro pericolosità deriva non solo dall’elevata patogenicità, ma soprattutto dalla rapidità con cui sviluppano e diffondono multiresistenze, rendendo spesso inefficaci le terapie convenzionali e complicando la gestione clinica (Teng J et al., 2023).

Tra i microrganismi ESKAPE di maggiore impatto sulla sanità pubblica figurano *P. aeruginosa*, *E. faecium* ed *S. aureus*, come evidenziato da *WHO Priority Pathogen List 2024* (WHO, 2024l). In questa classificazione, *P. aeruginosa* ed *E. faecium* sono collocati tra i patogeni di priorità critica, rispettivamente per la marcata resistenza ai carbapenemi e per la diffusa resistenza ai glicopeptidi, condizioni che riducono drasticamente le opzioni terapeutiche disponibili. *S. aureus*, invece, rientra tra i patogeni ad alta priorità, soprattutto in relazione alla diffusione globale dei ceppi MRSA.

P. aeruginosa si distingue come uno dei principali patogeni opportunisti in ambito ospedaliero, essendo responsabile di una quota significativa di VAP, infezioni urinarie e batteriemie, con decorso spesso severo nei pazienti critici (Tenover FC et al., 2022). Secondo il report *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net 2023), *P. aeruginosa* presenta un’incidenza stimata di batteriemie resistenti a carbapenemi pari a 2,01 per 100.000 abitanti nell’UE/EEA. Inoltre, nel 2023, il 32,2% degli isolati invasivi di *P. aeruginosa* segnalati è risultato resistente ad almeno uno dei gruppi antibiotici monitorati (carbapenemi, piperacillina-tazobactam, fluorochinoloni, ceftazidime, aminoglicosidi). Tra questi, la percentuale di resistenza è risultata più elevata per i carbapenemi (18,6 %), seguiti da piperacillina-tazobactam (18,5 %) e fluorochinoloni (17,9 %) (ECDC, 2025g). Nel 2023, la resistenza più elevata a livello nazionale è stata osservata per piperacillina-tazobactam (22,1%), seguita da ceftazidime (17,8%), fluorochinoloni (16,0%), carbapenemi (16,0%) e aminoglicosidi (3,8%) (Iacchini S et al., 2024). Dal punto di vista ambientale, *P. aeruginosa* presenta abilità nel persistere su superfici umide e in circuiti idrici, colonizzando rubinetti, docce e dispositivi con componenti acquosi, che ne facilita la diffusione nosocomiale (Lombardi A et al., 2025).

E. faecium, in particolare ceppi resistenti alla vancomicina (VRE), rappresenta oggi una delle principali criticità ospedaliere. Esso tende a colonizzare stabilmente il tratto gastrointestinale dei pazienti, spesso in maniera silente, e può dare origine a batteriemie, infezioni urinarie e complicazioni intra-addominali, soprattutto in individui sottoposti a trattamenti antibiotici prolungati o procedure invasive (Eichel VM et al., 2023). Secondo il report EARS-Net 2023, la resistenza alla vancomicina in *E. faecium* ha mostrato un trend in aumento rispetto agli anni precedenti (ECDC, 2024i). Analogamente, in Italia si continua a registrare un progressivo e preoccupante aumento della resistenza alla vancomicina in *E. faecium*, con valori che sono passati dall'11,1% nel 2015 al 32,5% nel 2023. La situazione appare ancora più critica in Molise, con una percentuale di resistenza pari al 46,2%, collocando la regione tra le aree con i livelli più elevati di VRE a livello nazionale (Iacchini S et al., 2024). *E. faecium* è in grado di sopravvivere su superfici ospedaliere per lunghi periodi, favorendo la trasmissione indiretta, principalmente attraverso mani, camici e dispositivi mobili. L'abilità di persistenza del patogeno facilita la formazione di cluster caratterizzati da una trasmissione prolungata e di difficile contenimento (Macesic N et al., 2025).

S. aureus è uno dei patogeni gram-positivi più versatili, responsabile di un ampio spettro di infezioni, incluse quelle del sito chirurgico, batteriemie, infezioni protesiche, polmoniti. La diffusione dei ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti (MRSA) è associata a infezioni di maggiore gravità rispetto a quelle causate da ceppi meticillino-sensibili (MSSA), con un aumento del rischio di ricovero in terapia intensiva, prolungata degenza e tassi di mortalità più elevati (Camacho-Cruz J et al., 2022). Storicamente, le infezioni da MRSA sono state associate all'ambiente ospedaliero, causate da ceppi definiti *Hospital-Acquired MRSA* (HA-MRSA) con resistenze multiple e diffuse principalmente attraverso il contatto con personale sanitario o dispositivi medici invasivi.

Negli ultimi decenni, tuttavia, è stata osservata una crescente diffusione di *Community-Acquired MRSA* (CA-MRSA), ossia ceppi acquisiti in contesti comunitari, responsabili di infezioni cutanee e dei tessuti molli in soggetti sani, senza precedenti esposizioni ospedaliere.

Essi si distinguono per la resistenza a un numero inferiore di antibiotici non β -lattamici rispetto agli HA-MRSA, presenza di fattori di virulenza, come la tossina leucocidina *Panton-Valentine* (PVL), che favorisce la formazione di ascessi e necrosi cutanee e presenza di MGE di dimensioni ridotte, che ne facilitano la trasmissione (Tsouklidis N et al., 2020).

Ad oggi, la tradizionale distinzione tra HA-MRSA e CA-MRSA risulta meno netta, in quanto ceppi acquisiti in comunità possono essere comunque responsabili di focolai ospedalieri (Biggs HM et al., 2025).

Secondo il report EARS-Net 2023, l'incidenza di infezioni del torrente circolatorio da MRSA nell'UE/EEA è stimata di 4,64 casi ogni 100.000 abitanti (ECDC, 2024i). Nonostante un trend

decescente rispetto al 2019, la sua circolazione resta significativa. In Italia, le stime dell'ISS mostrano un andamento variabile della percentuale di resistenza di *S. aureus* alla meticillina negli ultimi anni. Dopo la riduzione rilevata nel 2021, con un valore pari al 30,5%, il trend decrescente si è consolidato nel 2023, quando la resistenza è diminuita al 26,6%. Tuttavia, l'analisi a livello regionale evidenzia significative differenze: il Molise figura tra le regioni con i più elevati livelli di resistenza (38,6%) per *S. aureus* resistente alla meticillina/oxacillina (Iacchini S et al., 2024).

Pazienti e operatori possono essere colonizzati con *S. aureus* soprattutto a livello nasale e cutaneo, creando serbatoi interni. La sua elevata capacità di persistenza nell'ambiente, in particolare su superfici e dispositivi medici, favorisce una trasmissione continua all'interno delle strutture sanitarie (van der Schoor AS et al., 2023).

Nell'insieme, *P. aeruginosa*, *E. faecium* e *S. aureus* dimostrano come le ICA derivino da fattori interconnessi, che comprendono vulnerabilità del paziente, presenza di dispositivi invasivi e contaminazione degli ambienti assistenziali.

2.3.2 Meccanismi di resistenza agli antibiotici

La resistenza agli antibiotici è un fenomeno multifattoriale, determinato da molteplici meccanismi biologici che riflettono la straordinaria capacità adattativa dei microrganismi. I determinanti genetici che la sostengono possono essere localizzati sul cromosoma batterico, su plasmidi, oppure veicolati da elementi mobili come trasposoni e integroni, favorendo una rapida diffusione tra ceppi e specie diverse (Bhat BA et al., 2023). Questo dinamismo genetico, unito alla pressione selettiva esercitata dall'uso eccessivo di antimicrobici in ambito clinico, veterinario e ambientale, ha portato alla comparsa di ceppi multiresistenti che rappresentano oggi una delle principali minacce alla salute pubblica (Ballash GA et al., 2024).

I meccanismi di resistenza possono essere ricondotti a diverse strategie principali, spesso coesistenti nello stesso microrganismo:

- Inattivazione o alterazione del farmaco: molti batteri producono enzimi capaci di neutralizzare l'attività degli antibiotici. Le β -lattamasi e le carbapenemasi, ad esempio, idrolizzano l'anello β -lattamico, rendendo inefficaci penicilline, cefalosporine e carbapenemi. Altri enzimi, come le *aminoglycoside-modifying enzymes* (AMEs) facilitano l'acetilazione, la fosforilazione o l'adenilazione degli aminoglicosidi, portando a farmaci modificati con affinità ridotta per il loro bersaglio. Inoltre, acetiltransferasi e fosfotransferasi sono in grado di inattivare il cloramfenicolo attraverso modificazioni chimiche specifiche. La produzione di tali enzimi è particolarmente problematica perché spesso codificata da plasmidi, che possono essere trasferiti orizzontalmente tra batteri diversi, accelerando la diffusione della resistenza (Belay WY et al., 2024).
- Modifica del sito target dell'antibiotico: la presenza di mutazioni o alterazioni enzimatiche nel sito bersaglio impedisce all'antibatterico di legarsi efficacemente, oppure attraverso la sostituzione o l'elusione del bersaglio (*target replacement* o *bypass*). Un esempio emblematico di resistenza per sostituzione del bersaglio è rappresentato da MRSA, che produce la proteina *Penicillin-Binding Protein* alterata (PBP2a) caratterizzata da un'affinità notevolmente ridotta per tutti i β -lattamici (ad eccezione delle cefalosporine e carbapenemi di ultima generazione). Analogamente, i VRE facilitano la sostituzione del bersaglio del glicopeptide, ovvero il gruppo terminale della parete cellulare da D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Lac dei precursori del peptidoglicano, riducendo l'efficacia di legame della vancomicina. La resistenza ai fluorochinoloni, invece, è un classico esempio di alterazione del sito bersaglio mediata da mutazione. Infatti, mutazioni a carico della DNA girasi e della topoisomerasi IV conferiscono resistenza a questa classe di antibiotici, mentre modifiche della subunità ribosomiale 23S sono responsabili della resistenza ai macrolidi (Belay WY et al., 2024).

- Riduzione dell'accumulo intracellulare del farmaco: questo meccanismo riduce la concentrazione effettiva dell'antibiotico all'interno della cellula, intervenendo sull'ingresso o sull'espulsione del farmaco. I batteri Gram-negativi possono mutare o ridurre l'espressione delle porine (come OprD in *P. aeruginosa*), che sono i canali principali per l'ingresso di antibatterici idrofili (come β -lattamici e fluorochinoloni), limitando così l'assorbimento. Parallelamente, l'attivazione di pompe di efflusso (come MexAB-OprM in *P. aeruginosa* o NorA in *S. aureus*) consente di espellere attivamente diverse classi di antibiotici, generando resistenze multiple (Halawa EM et al., 2024).
- Formazione di biofilm: alcuni batteri aderiscono a superfici biotiche o abiotiche (cateteri, protesi, tubi endotracheali) e producono una matrice extracellulare composta da polisaccaridi, proteine, lipidi e DNA, che ostacola la penetrazione degli antibiotici e crea microambienti poveri di nutrienti che inducono uno stato di tolleranza. I batteri all'interno del biofilm possono comunicare tramite *quorum sensing*, coordinando la produzione di fattori di resistenza e la dispersione di cellule verso nuovi siti. In ambito sanitario, biofilm persistenti sono frequentemente associati a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* (Halawa EM et al., 2024).
- Mobilità genetica e diffusione intersettoriale: i batteri possono acquisire geni di resistenza tramite plasmidi, integroni e trasposoni. Questi elementi mobili favoriscono il trasferimento orizzontale di determinanti genetici tra specie diverse, creando ceppi multiresistenti che possono diffondersi non solo in ospedale, ma anche nella comunità e nell'ambiente. La presenza di geni come *blaKPC*, *blaNDM*, *mecA* o *vanA* in acque reflue, allevamenti e superfici ambientali dimostra come la resistenza sia un fenomeno globale (Halawa EM et al., 2024).

Un esempio della complessità dei meccanismi di resistenza nei Gram-negativi non fermentanti è rappresentato da *P. aeruginosa*, batterio opportunisto dotato di molteplici strategie di sopravvivenza, tra cui bassa permeabilità di membrana, iper-espressione di pompe di efflusso e capacità di formare biofilm (Avakh A et al., 2023).

Ceppi di *P. aeruginosa* noti come CRPA (*Carbapenem-Resistant Pseudomonas aeruginosa*) non rispondono ai comuni antibiotici β -lattamici, inclusi penicilline, cefalosporine di terza generazione e carbapenemi (Schwartz B et al., 2024). Questa resistenza determina infezioni più severe, con un aumentato rischio di ricovero in terapia intensiva e un tasso di mortalità significativamente superiore rispetto alle infezioni sostenute da ceppi sensibili. Storicamente, tali infezioni erano prevalentemente associate all'ambiente ospedaliero, in particolare nei reparti di terapia intensiva e nei pazienti sottoposti a ventilazione meccanica o portatori di dispositivi invasivi. Tuttavia, negli ultimi anni è stata evidenziata la diffusione di *P. aeruginosa* multiresistente anche in contesti comunitari (Xie X et al., 2024).

La caratteristica che distingue i ceppi CRPA è la produzione di carbapenemasi di classe B (metallo- β -lattamasi, come *blaVIM*, *blaIMP*, *blaNDM*) e di classe D (*blaOXA-type*), che idrolizzano l'anello β -lattamico rendendo inefficaci carbapenemi e penicilline (Martínez-Zavaleta MG et al., 2023).

A questo si aggiungono mutazioni nelle porine (in particolare *oprD*), che riducono l'ingresso del farmaco nella cellula e l'iper-espressione di β -lattamasi cromosomiche AmpC (*ampC*) (Xie X et al., 2024).

Parallelamente, l'attivazione di pompe di efflusso come MexAB-OprM e MexXY-OprM consente di espellere attivamente diverse classi di antibiotici, generando resistenze multiple (Avakh A et al., 2023). La resistenza ai fluorochinoloni è mediata da mutazioni nei geni *gyrA* e *parC*, che codificano rispettivamente le subunità delle topoisomerasi II e IV (Kherroubi L et al., 2024), mentre gli aminoglicosidi possono essere inattivati da enzimi modificanti l'antibiotico codificati dai geni *aac*, *ant* e *aph* (Schwartz B et al., 2024).

Un ulteriore elemento cruciale è la capacità di *P. aeruginosa* di formare biofilm su superfici biotiche e abiotiche (cateteri, tubi endotracheali, circuiti idrici). Il biofilm ostacola la penetrazione degli antibiotici e crea microambienti che favoriscono la tolleranza, rendendo le infezioni croniche e recalcitranti. Questo meccanismo, unito alla mobilità genetica dei determinanti di resistenza, contribuisce alla diffusione di ceppi multiresistenti sia in ospedale che in comunità (Olivares E et al., 2020).

Oltre ai bacilli Gram-negativi multiresistenti, anche i cocci Gram-positivi, in particolare VRE ed MRSA, contribuiscono in modo significativo al fenomeno di resistenza antibiotica grazie a meccanismi specifici di modifica del bersaglio e adattamento della parete cellulare.

Per VRE si intendono ceppi di *E. faecium* che non rispondono ai comuni antibiotici glicopeptidici, come la vancomicina e la teicoplanina. La caratteristica che distingue i ceppi VRE è la presenza di geni *van* (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*), che codificano per ligasi capaci di modificare il terminale della parete cellulare da D-Ala-D-Ala a D-Ala-D-Lac o D-Ala-D-Ser, riducendo drasticamente l'affinità della vancomicina per il suo bersaglio (Radford-Smith DE et al., 2025). Il gene *vanA*, in particolare, è localizzato su plasmidi e trasposoni mobili, favorendo il trasferimento orizzontale della resistenza tra ceppi e specie diverse (Sobkowiak A et al., 2025).

Inoltre, il gene *vanA* è inserito all'interno di un complesso trasponibile chiamato Tn1546, che può essere trasferito da un ceppo portatore a un altro, contribuendo alla diffusione della resistenza ai glicopeptidi. Questo elemento genetico contiene, oltre ai geni *van*, ulteriori determinanti di resistenza e regioni regolatorie che modulano l'espressione del fenotipo resistente. La mobilità di Tn1546 e di altri trasposoni analoghi rappresenta uno dei principali fattori che hanno favorito la rapida diffusione dei VRE a livello globale (Raddaoui A et al., 2024).

Alcuni ceppi VRE presentano, inoltre, resistenze concomitanti a linezolid, dovute a mutazioni nella subunità ribosomiale 23S o alla presenza del gene *optrA*, e a daptomicina, per modificazioni della membrana cellulare (Wang Q et al., 2025).

Inoltre, la resistenza ai β -lattamici è principalmente associata ad alterazioni del gene *PBP5* che conferiscono ridotta sensibilità ai β -lattamici (Hunashal Y et al., 2023). La resistenza ad altre classi antibiotiche, come i fluorochinoloni, può derivare da mutazioni nei geni *gyrA* e *parC*, mentre pompe di efflusso come *emeA* contribuiscono a una multiresistenza, che limita notevolmente le opzioni terapeutiche, rendendo necessario l'impiego di farmaci come linezolid o daptomicina (Mirzaei M et al., 2023).

Nei ceppi di MRSA, la resistenza ai β -lattamici è mediata principalmente dal gene *mecA*, che codifica per la proteina PBP2a, caratterizzata da una bassa affinità per la maggior parte delle penicilline semisintetiche, con eccezione di ceftarolina e ceftobiprololo (Lade H et al., 2023; Jiao F et al., 2023). Il gene *mecA* è localizzato all'interno di un elemento genetico mobile denominato *SCCmec* (*staphylococcal cassette chromosome mec*), che ne consente il trasferimento tra ceppi e favorisce la diffusione della resistenza. *SCCmec* è un elemento di dimensioni variabili (21–60 kb) e comprende due componenti principali: il complesso *mec*, che contiene i geni *mecA*, *mecC*, *mecD* o *mecB* e i relativi elementi regolatori, e il complesso *ccr*, che facilita l'integrazione e l'estrazione di *SCCmec* dal cromosoma ospite.

Le regioni J di *SCCmec*, che si trovano tra i complessi, possono contenere determinanti di resistenza aggiuntivi e sequenze regolatorie (Lakhundi S et al., 2018).

Oltre al gene *mecA* sono stati isolati altri omologhi che conferiscono lo stesso tipo di resistenza;

- *mecC* (69% di omologia), isolato sia in infezioni umane che in animali (García-Álvarez L et al., 2011);
- *mecB* (62% di omologia), isolato in Giappone da pollo e da tampone naso faringeo di un paziente ricoverato in cardiologia asintomatico (Becker K et al., 2014);
- *mecD* (61% di omologia), isolato solo in animali, possiede la caratteristica di essere resistente a tutta la famiglia delle penicilline e alle cefalosporine anti-MRSA (Ceftarolina e Ceftobiprololo) (Schwendener S et al., 2022).

Oltre ai β -lattamici, alcuni ceppi MRSA hanno sviluppato resistenze ad altre classi di antibiotici. La resistenza ai glicopeptidi può essere conseguenza di modificazioni nei geni regolatori della sintesi della parete cellulare, mentre la resistenza a macrolidi, lincosamidi e streptogramine B è mediata dai geni *ermA*, *ermC* o dalle pompe di efflusso *msrA* (Lade H et al., 2023). La resistenza a tetracicline e fluorochinoloni, invece, deriva dai geni *tetK*, *tetM* e da mutazioni nei geni target *gyrA* e *griA* (Brdová D et al., 2024).

La resistenza di *S. aureus* agli antibiotici è stata osservata già pochi anni dopo l'introduzione della penicillina: nel 1942 venne isolato il primo ceppo resistente (Lade H et al., 2023). Per contrastare il fenomeno, negli anni '50 furono sintetizzate le penicilline semisintetiche, ma nel 1961 in Inghilterra fu identificato il primo ceppo di MRSA (Jevons MP, 1961). Se inizialmente l'epidemia era confinata in Europa, dagli anni Ottanta la diffusione è diventata globale, trasformando MRSA in una delle principali minacce infettive a livello mondiale.

2.3.3 Meccanismi di virulenza

I fattori di virulenza comprendono l'insieme delle caratteristiche strutturali, molecolari e funzionali che consentono ai microrganismi di colonizzare un ospite, superare le sue difese e provocare danno tissutale. Questi meccanismi includono non solo tossine ed enzimi citotossici, ma anche strategie più sottili di adattamento, modulazione immunitaria e persistenza in ambienti ostili (Leitão JH, 2020). In molti batteri opportunisti, la patogenicità deriva dalla combinazione di più elementi coordinati, che intervengono in diverse fasi dell'infezione: adesione alle superfici, acquisizione di nutrienti, interferenza con la risposta immunitaria dell'ospite e sopravvivenza in microambienti sfavorevoli (Dyląg M et al., 2024).

Tra i meccanismi più rilevanti figurano sistemi di secrezione specializzati, enzimi proteolitici, modifiche della superficie cellulare e molecole redox-attive che permettono ai batteri di eludere il riconoscimento immunitario (Wang Y et al., 2023). Un ruolo centrale nella persistenza microbica è svolto dai processi che culminano nella formazione del biofilm, che conferisce maggiore tolleranza agli antibiotici e riduce l'efficacia delle difese immunitarie, contribuendo alla cronicità delle infezioni (Ramírez-Larrota JS et al., 2022).

P. aeruginosa è caratterizzato da elevata versatilità metabolica, capacità di sopravvivere in ambienti ostili e una notevole dotazione di fattori di virulenza che consentono l'instaurarsi di infezioni (Jurado-Martín I et al., 2021). Le sue strategie patogenetiche comprendono la produzione di tossine, enzimi extracellulari, pigmenti redox-attivi e sistemi di secrezione altamente specializzati che provocano lesione tissutale ed evasione della risposta immunitaria (Chadha J et al., 2022).

Inoltre, il sistema di secrezione di tipo III (*T3SS*) è un complesso altamente specializzato mediante il quale *P. aeruginosa* trasferisce direttamente specifiche proteine effettrici (ExoS, ExoT, ExoU ed ExoY) nelle cellule dell'ospite, che interferiscono con processi cellulari cruciali, come l'organizzazione del citoscheletro, la sopravvivenza cellulare e le funzioni immunitarie, indebolendo la capacità dell'ospite di eliminare il microrganismo e favorendone la sopravvivenza e la diffusione (Zhang X et al., 2025). A questo si aggiungono enzimi proteolitici, tra cui le elastasi LasA e LasB, proteasi e fosfolipasi C, capaci di degradare la matrice extracellulare, immunoglobuline, citochine e molecole del complemento, promuovendo infiammazione e danno tissutale (Swain J et al., 2025).

I pigmenti fenazinici, in particolare la piocianina, generano stress ossidativo nei neutrofili e negli epitelii respiratori, compromettendo la funzione ciliare e favorendo la colonizzazione persistente, come osservato nei pazienti con fibrosi cistica (Zhang X et al., 2025; Moradali MF et al., 2017).

Per evadere la risposta immunitaria, *P. aeruginosa* modifica il Lipopolisaccaride (LPS), produce molecole che degradano citochine infiammatorie, esprime flagellina variabile e rilascia vescicole di

membrana esterna (OMVs) che sequestrano gli anticorpi e alterano l'attivazione del complemento (Swain J et al., 2025).

Tradizionalmente considerato un commensale intestinale, *E. faecium* è oggi uno dei principali patogeni associati alle ICA. Pur non producendo tossine come *S. aureus* o *P. aeruginosa*, presenta numerosi fattori di virulenza e adattamento che ne aumentano la patogenicità.

Tra i principali determinanti figurano adesine di superficie come Acm (*collagen-binding adhesin*) e Scm, che favoriscono adesione a cellule epiteliali, collagene e fibronectina. Altri fattori, come EfaA, SagA e pili di tipo sortase-dipendente, contribuiscono all'adesione, alla modulazione dell'infiammazione e alla colonizzazione persistente dell'intestino (Lanka S et al., 2024).

Fattori specifici includono:

- *esp* (*enterococcus surface protein*), che favorisce l'adesione a superfici e la formazione di biofilm persistenti (Ghazvinian M et al., 2024);
- *asa1* (*aggregation substance*), che facilita aggregazione batterica e trasferimento coniugativo di plasmidi (Gök ŞM et al., 2020);
- *Acm*, che consente adesione al collagene nei tessuti danneggiati, favorendo endocarditi e infezioni profonde (Lanka S et al., 2024).

E. faecium evade la risposta immunitaria grazie alla produzione di superossido dismutasi, attività catalasica e sistemi di detossificazione dei radicali, mentre la parete ricca di acidi teicoici e lipoteicoici induce una risposta infiammatoria blanda (Ruhel R et al., 2024). L'elevata plasticità genomica, associata all'acquisizione di materiale genetico tramite plasmidi e trasposoni (es. Tn1546), aumenta la resistenza a stress ambientali e terapeutici (Hashimoto Y et al., 2023).

S. aureus è uno dei principali microrganismi associati a infezioni comunitarie e correlate all'assistenza, dotato di numerosi meccanismi patogenetici. Questi comprendono la produzione di proteine in grado di superare le giunzioni aderenti (tossina α) e enzimi idrolitici come lipasi, nucleasi, ureasi, ialuronato chinasi e serino-proteasi i quali, pur avendo un ruolo nel metabolismo batterico, possono contribuire direttamente alla patogenicità (Cheung GYC et al., 2021). Inoltre, il batterio esprime importanti enzimi come coagulasi e stafilochinasi, che svolgono ruoli complementari nella modulazione della risposta dell'ospite e nella diffusione batterica (Touaitia R et al., 2025).

La coagulasi è strettamente legata alla capacità di *S. aureus* di sopravvivere all'interno dell'ospite e di instaurare infezioni localizzate in quanto converte il fibrinogeno plasmatico in fibrina, favorendo la formazione di coaguli attorno alle cellule batteriche che permettono al batterio di evadere la fagocitosi da parte dei neutrofili e di stabilizzare microcolonie nei tessuti infetti.

La stafilochinasi è, invece, un enzima che attiva il plasminogeno plasmatico, convertendolo in plasmina, una proteasi che degrada la fibrina dei coaguli, facilitando la diffusione dei batteri nei tessuti circostanti e l'invasione di nuovi siti (Touaitia R et al., 2025).

Tra le tossine prodotte da *S. aureus*, vi sono l'enterotossina, responsabile di intossicazioni alimentari (Zhang J et al., 2022), la tossina epidermolitica, implicata nella sindrome epidermica acuta (Tamborino A et al., 2025), la tossina dello shock tossico, causa della sindrome da shock tossico stafilococcica (Atchade E et al., 2024) e *PVL*, una leucocidina citolitica particolarmente rilevante nelle infezioni da CA-MRSA (Hussain K et al., 2022; Pipitò L et al., 2025). Altre leucocidine bicomponenti, come LukED e LukAB/HlgAB, contribuiscono alla lisi di leucociti e altre cellule immunitarie, incrementando l'evasione della risposta immunitaria (Di Bella S et al., 2025).

Un ulteriore elemento di virulenza è la proteina A, codificata dal gene *spa*, che inibisce l'opsonizzazione batterica e formando un *camouflage coat* di immunoglobuline aspecifiche, legate in modo non selettivo alla regione Fc delle IgG e alla regione Fab delle IgM. Questo meccanismo funziona anche come superantigene per i linfociti B, inducendone l'apoptosi e deviando la risposta immunitaria da parte di altri fattori di virulenza (Bear A et al., 2023).

S. aureus possiede numerose proteine di adesione alla matrice extracellulare (MSCRAMMs), che favoriscono l'adesione a collagene, fibronectina e fibrinogeno, promuovendo colonizzazione, formazione di biofilm e resistenza all'eliminazione da parte dei neutrofili (Pickens CI et al., 2022). Per modulare ulteriormente la risposta immunitaria, il batterio produce proteine come SCIN (*Staphylococcal complement inhibitor*), CHIPS (*chemotaxis inhibitory protein*) ed Efb (*extracellular fibrinogen-binding protein*), che interferiscono, rispettivamente, con l'attivazione del complemento e la chemiotassi dei neutrofili (Di Bella S et al., 2025).

Altri enzimi degradativi come ialuronidasi, proteasi seriniche e metalloproteasi, facilitano la diffusione tissutale e modulano l'infiammazione. Infine, la regolazione della virulenza è coordinata da sistemi globali come agr (accessory gene regulator) e sarA, che modulano l'espressione di tossine, proteine di adesione e biofilm, permettendo al batterio di adattarsi alle diverse fasi dell'infezione, sia acute che croniche (Cheung GYC et al., 2021).

2.3.4. Biofilm e persistenza

I biofilm sono comunità microbiche organizzate in aggregati racchiusi in una matrice extracellulare polimerica, che garantisce protezione dai fattori ambientali e dai trattamenti antimicrobici. La loro formazione costituisce una strategia di persistenza fondamentale per numerosi patogeni opportunisti, consentendo la colonizzazione delle superfici, la resistenza alla fagocitosi e la modulazione della risposta immunitaria dell'ospite (Vestby LK et al., 2020).

In ambito ospedaliero i biofilm rappresentano una fonte rilevante di ICA, sviluppandosi su dispositivi invasivi quali cateteri venosi centrali, periferici o urinari, ventilatori meccanici, tubi endotracheali, pompe per nutrizione parenterale, incubatrici neonatali e superfici cliniche (Mishra A et al., 2024). La loro presenza favorisce infezioni persistenti, cronicità e trasmissione tra pazienti, soprattutto neonati e soggetti immunocompromessi. La colonizzazione di cateteri, circuiti respiratori e incubatrici incrementa il rischio di sepsi, VAP e infezioni croniche (Bouhrour N et al., 2024; Ben-Amram H et al., 2024).

Tra i patogeni più rilevanti, *P. aeruginosa* rappresenta una minaccia significativa nei reparti ad alto rischio, in particolare nelle Terapie Intensive Neonatali (TIN), dove i pazienti presentano fragilità intrinseche dovute a sistemi immunitari immaturi e condizioni cliniche complesse (Baltogianni M et al., 2023; Crivaro V et al., 2009). In tali contesti, la colonizzazione di incubatrici, cateteri e circuiti respiratori aumenta il rischio di VAP e sepsi, determinando esiti clinici gravi e difficilmente gestibili (Tzialla C et al., 2024).

Questo patogeno, infatti, è in grado di persistere sulle superfici ambientali grazie alla produzione di pigmenti fenazinici, come la piocianina, che favoriscono la resistenza allo stress ossidativo e la sopravvivenza ambientale (Mudaliar SB et al., 2024). Inoltre, l'attivazione dei sistemi di *quorum sensing* (Las, Rhl e Pqs) coordina l'espressione di geni coinvolti nella formazione del biofilm, nella produzione di tossine e nella regolazione della virulenza, contribuendo così alla sua elevata capacità di colonizzazione (Raya J et al., 2025).

L'alginato e altri polisaccaridi extracellulari contribuiscono alla formazione di una matrice densa che limita la penetrazione degli antibiotici, mentre le vescicole extracellulari sequestrano molecole antimicrobiche e veicolano enzimi degradativi (Tuon FF et al., 2022). Inoltre, la presenza di fenotipi persistenti, ovvero cellule batteriche che entrano in uno stato metabolico dormiente o rallentato, riduce l'efficacia degli antibiotici, poiché molte terapie agiscono su batteri in fase di crescita attiva. Questa caratteristica rende i biofilm generati da *P. aeruginosa* particolarmente resistenti e difficili da eradicare (Reynolds D et al., 2021).

Anche *E. faecium* può generare biofilm, poiché sfrutta adesine di superficie come Acm, Scm ed esp, che promuovono adesione e aggregazione batterica, favorendo biofilm densi e persistenti anche su

superfici ospedaliere (Lanka S et al., 2024). Oltre a queste proteine, un ruolo fondamentale è svolto dall'autolisina AtlAEfm, che contribuisce alla formazione del biofilm attraverso la localizzazione superficiale di Acm e il rilascio di DNA extracellulare, elementi chiave per la stabilità della matrice biofilmica (Paganelli FL et al., 2013). La proteina esp, in particolare, è cruciale per la formazione di biofilm compatti e difficili da eradicare. La resistenza intrinseca agli antibiotici, amplificata dalla protezione offerta dal biofilm, rende *E. faecium* un patogeno di difficile gestione clinica, soprattutto nei contesti ospedalieri ad alta intensità di cura (Ghazvinian M et al., 2024).

La formazione del biofilm in *S. aureus* è un processo multifattoriale che coinvolge diverse componenti strutturali e regolatorie. Nella fase di adesione iniziale, le proteine di superficie appartenenti alla famiglia delle MSCRAMMs, come le *fibronectin-binding proteins* (FnBPs), i *clumping factors* (ClfA, ClfB) e la *collagen-binding protein* (Cna), favoriscono l'attacco alle superfici (Peng Q et al., 2022). Successivamente, il polisaccaride intercellulare adesivo (PIA/PNAG), codificato dal locus *icaADBC*, promuove l'aggregazione batterica e la stabilità della matrice biofilmica. Altri fattori, come la *biofilm-associated protein* (Bap) e la proteina di superficie SasG, contribuiscono alla coesione cellulare e alla maturazione del biofilm. Inoltre, il DNA extracellulare derivante dalla lisi di cellule batteriche, rappresenta un elemento strutturale essenziale per la compattezza della matrice (Yu J et al., 2024). La regolazione di questi processi è mediata dal sistema di *quorum sensing* agr, che controlla l'espressione di geni coinvolti nella produzione di tossine e nella dispersione del biofilm (Vinodhini V et al., 2024). La combinazione di questi fattori rende il biofilm di questo patogeno altamente resistente agli antibiotici e responsabile di infezioni difficili da trattare, soprattutto in pazienti portatori di dispositivi medici (Beenken KE et al., 2025).

In generale, la combinazione di biofilm e resistenza intrinseca agli antibiotici rende questi patogeni particolarmente insidiosi, richiedendo strategie di prevenzione e controllo mirate. Pertanto, la gestione delle infezioni biofilm-correlate nei reparti ospedalieri, e in particolare in quelli ad alto rischio, rappresenta una sfida cruciale, imponendo la necessità di approcci terapeutici innovativi e di una rigorosa sorveglianza epidemiologica.

3. Sorveglianza e strategie di prevenzione e controllo

3.1 Sorveglianza microbiologica e molecolare

La sorveglianza dei patogeni antibiotico-resistenti rappresenta un pilastro imprescindibile per il controllo delle ICA e per la gestione appropriata delle terapie. Questo approccio consente non solo di monitorare la diffusione di ceppi resistenti e di identificare precocemente focolai epidemici, ma anche di definire linee guida terapeutiche basate su evidenze aggiornate e di sviluppare strategie di prevenzione e controllo mirate (Innocenti T et al., 2024). La sorveglianza, infatti, costituisce uno strumento essenziale per ridurre morbilità e mortalità associate alle ICA, garantendo un uso più razionale degli antibiotici e contrastando il fenomeno dell'AMR (Takaya S et al., 2020).

Le metodiche impiegate spaziano dalle tecniche microbiologiche convenzionali agli approcci molecolari avanzati, il sequenziamento genomico e l'analisi metagenomica (Djordjevic SP et al., 2024). L'integrazione di dati fenotipici e genotipici permette di ottenere un quadro più completo della resistenza e della virulenza dei microrganismi, facilitando l'individuazione di determinanti genetici di resistenza e la tracciabilità delle catene di trasmissione (Muntean MM et al., 2022). In questo modo, la sorveglianza non si limita alla sola identificazione dei patogeni, ma diventa un processo dinamico di analisi epidemiologica e di supporto decisionale per la clinica (Lappan R et al., 2024).

Nei contesti ospedalieri, la sorveglianza assume particolare rilevanza nei reparti ad alto rischio, dove la raccolta sistematica di campioni clinici (sangue, urine, secrezioni respiratorie) e ambientali (superfici, dispositivi medici, incubatrici) consente di individuare precocemente la presenza di patogeni multiresistenti. Inoltre l'analisi accurata dei profili di AMR non solo guida le terapie empiriche, ma contribuisce anche a prevenire la trasmissione crociata tra pazienti e superfici ospedaliere, riducendo il rischio di focolai epidemici (Sartelli M et al, 2024).

Infine, la sorveglianza si integra con programmi di *antimicrobial stewardship*, che promuovono l'uso appropriato degli antibiotici e la formazione del personale sanitario.

In Italia, la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza è affidata al sistema AR-ISS (Antibiotico-Resistenza coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità), attivo dal 2001. L'AR-ISS è un sistema di sorveglianza sentinella, basato su una rete di laboratori selezionati che inviano annualmente i dati relativi agli isolati clinici di patogeni di rilevanza epidemiologica. La partecipazione dei laboratori è volontaria, ma le Regioni hanno il compito di ampliare la rete per garantire una rappresentatività adeguata (Epicentro, 2024b).

Attualmente, il protocollo AR-ISS prevede il monitoraggio di 8 specie batteriche (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. pneumoniae*), ma l'analisi epidemiologica si concentra su 6 combinazioni specie/antibiotico (MRSA, VRE, *E. coli*

resistente alle cefalosporine di terza generazione, *K. pneumoniae*/*P. aeruginosa*/*A. baumannii* resistenti ai carbapenemi) di particolare rilevanza clinica (Epicentro, 2024b).

L'AR-ISS utilizza protocolli standardizzati per garantire l'omogeneità dei dati e la loro comparabilità a livello nazionale ed europeo. L'ultima versione del protocollo AR-ISS (febbraio 2024) ha introdotto alcune novità rilevanti come l'inclusione dei dati provenienti da campioni di urine, oltre a sangue e liquor; l'allineamento con il PNCAR 2022-2025 e l'armonizzazione con le reti di sorveglianza europee ed internazionali.

A livello europeo, la rete EARS-Net, coordinata dall'ECDC, permette di confrontare i dati tra i diversi Paesi membri, favorendo una visione integrata e comparativa della diffusione dei patogeni multiresistenti (ECDC, 2025h).

Su scala globale, l'OMS ha istituito la rete GLASS (*Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*), che promuove la raccolta standardizzata di dati sulla resistenza antimicrobica e facilita la cooperazione internazionale (WHO, 2025m).

Negli ultimi anni, la sorveglianza dei patogeni antibiotico-resistenti si sta progressivamente orientando verso un approccio "*One Health*". Questo modello consente di monitorare la diffusione della resistenza non solo nei contesti ospedalieri, ma anche nelle comunità, negli allevamenti e negli ecosistemi naturali, dove l'uso improprio o eccessivo di antimicrobici può favorire l'emergenza e la trasmissione di ceppi multiresistenti (Cella E et al., 2023). L'integrazione dei dati provenienti da fonti diverse (cliniche, veterinarie e ambientali) permette di ottenere una visione più completa e di sviluppare strategie di prevenzione e contenimento coordinate, in linea con le raccomandazioni dell'OMS e delle principali reti di sorveglianza internazionali.

L'indagine microbiologica rappresenta il primo livello di sorveglianza, in quanto consente di ottenere informazioni tempestive sulla circolazione dei patogeni e sullo stato della loro resistenza antibiotica. La sorveglianza microbiologica dei patogeni antibiotico-resistenti permette l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione fenotipica dei microrganismi. Questo approccio si basa sull'analisi diretta dei campioni, con l'obiettivo di determinare la presenza di microrganismi patogeni, definirne il profilo di suscettibilità agli antimicrobici e valutarne l'eventuale coinvolgimento in focolai epidemici (Kaprou GD et al., 2021).

Questi dati alimentano i sistemi di sorveglianza nazionali e internazionali, contribuendo alla definizione degli indicatori epidemiologici e alla valutazione dell'impatto della resistenza antimicrobica nei diversi *setting* assistenziali (Lim C et al., 2021).

Dal punto di vista operativo, la sorveglianza microbiologica si distingue per alcuni vantaggi fondamentali quali la rapidità di ottenimento dei risultati, soprattutto nei laboratori dotati di piattaforme automatizzate e MALDI-TOF; la capacità di fornire test funzionali, indispensabili per

valutare la reale risposta del microrganismo alle terapie farmacologiche; costi relativamente contenuti rispetto alle tecniche molecolari (Uzuriaga M et al., 2024); criteri interpretativi dei risultati standardizzati a livello internazionale, in base alle linee guida EUCAST e CLSI (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2025; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2025).

Tuttavia, presenta anche alcuni limiti: richiede tempi di incubazione variabili, talvolta incompatibili con la gestione di infezioni gravi e non consente la distinzione di ceppi clonali in caso di cluster epidemici, rendendo necessaria l'integrazione con metodiche molecolari (Yang B et al., 2024).

La coltura batterica costituisce la fase preliminare della sorveglianza microbiologica, in quanto consente l'isolamento del patogeno e la valutazione delle sue caratteristiche iniziali. Il campione viene seminato su terreni selettivi, arricchiti o differenziali, scelti in base al sospetto clinico e al tipo di matrice biologica (Bonnet M et al., 2019).

La crescita su specifici terreni permette di osservare caratteristiche macroscopiche quali morfologia e dimensione della colonia, colore e produzione di pigmenti, presenza di emolisi, viscosità o consistenza, crescita selettiva o inibizione in presenza di specifici agenti (Bonnet M et al., 2019).

Una volta ottenute colonie isolate, l'identificazione può essere eseguita mediante:

- test biochimici tradizionali (ad es. fermentazione di zuccheri, attività enzimatiche, metabolismo di substrati) (Hafezi A et al., 2024);
- sistemi automatizzati (es. *VITEK*, *BD Phoenix*, *MicroScan*), che combinano reazioni biochimiche e algoritmi interpretativi (Hong JS et al., 2019);
- spettrometria di massa MALDI-TOF MS, attualmente lo standard per l'identificazione rapida, che permette la determinazione del profilo proteico batterico in pochi minuti con elevata accuratezza (Calderaro A et al., 2024).

La determinazione della suscettibilità agli antimicrobici (*Antimicrobial Susceptibility Testing*, AST) rappresenta una fase cruciale della sorveglianza microbiologica, in quanto consente di definire il fenotipo di resistenza dei ceppi isolati e di guidare i clinici nella scelta della terapia più appropriata. L'AST permette, inoltre, l'identificazione precoce di ceppi MDR, XDR o PDR, contribuendo all'attivazione tempestiva delle misure di controllo delle infezioni (Elbehiry A et al., 2025).

La sorveglianza molecolare rappresenta un livello avanzato per il monitoraggio dei patogeni antibiotico-resistenti. A differenza dell'approccio fenotipico, le tecniche molecolari permettono l'identificazione dei determinanti genetici di resistenza, l'analisi della variabilità genetica e la tracciabilità delle catene di trasmissione con un'elevata risoluzione (Banerjee R et al., 2023).

L'introduzione di metodiche di genotipizzazione e del sequenziamento ha migliorato la sorveglianza, consentendo di identificare precocemente geni di resistenza emergenti o nuovi cloni (Sherry NL et al., 2025), distinguere ceppi clonali in focolai nosocomiali, anche quando i metodi fenotipici non

rilevano differenze (Djordjevic SP et al., 2024). Inoltre, esse consentono di riconoscere eventi di trasferimento orizzontale di plasmidi o altri elementi genetici mobili, fondamentali per la diffusione delle resistenze (Sherry NL et al., 2025), ricostruire le dinamiche evolutive e spaziali dell'infezione mediante analisi filogenetiche, integrare i dati genomici con informazioni cliniche, ambientali e microbiologiche per sviluppare mirate strategie di controllo.

Dal punto di vista operativo, la sorveglianza molecolare permette di superare alcuni limiti delle metodiche tradizionali, tra cui tempi per la coltura, l'impossibilità di tipizzare ceppi correlati e la difficoltà di rilevare resistenze criptiche o non espresse fenotipicamente. Infine, l'analisi genomica e le piattaforme di nuova generazione rappresentano oggi lo standard più avanzato per la caratterizzazione dei patogeni, poiché consentono un livello di discriminazione superiore tra ceppi e un'analisi più approfondita dei determinanti genetici di resistenza e virulenza (Elbehiry A et al., 2025).

La PFGE o elettroforesi su gel in campo pulsato rappresenta una delle metodiche di tipizzazione molecolare più consolidate e largamente applicate per la caratterizzazione di numerosi batteri. Per oltre due decenni è stata considerata il *gold standard* negli studi epidemiologici, grazie all'elevato potere discriminante e alla possibilità di confrontare direttamente più profili genetici ottenuti tra laboratori differenti (Besser J, 2015; Sammarco ML et al., 2014).

Questa metodica si basa sulla digestione del DNA batterico con enzimi di restrizione, che tagliano il genoma in pochi frammenti grandi, i quali vengono successivamente separati tramite un sistema di elettroforesi a campo pulsato. A differenza della normale elettroforesi su gel, la PFGE sfrutta un campo elettrico che cambia direzione a intervalli regolari, consentendo la migrazione differenziata di frammenti ad alto peso molecolare che, in un campo elettrico costante, non riuscirebbero a separarsi efficacemente. Il risultato finale è la generazione di un profilo di bande, o pulsotipo, caratteristico per ciascun ceppo (Neoh HM et al., 2019). L'interpretazione dei pulsotipi richiede l'uso di software dedicati, come *BioNumerics* o *GelCompare*, i quali permettono di digitalizzare le immagini dei gel, identificare automaticamente le bande e calcolare il peso molecolare dei frammenti. L'analisi della similarità tra profili viene effettuata tramite algoritmi di *cluster analysis* basati su coefficienti di correlazione.

Nella maggior parte degli studi epidemiologici, per stabilire l'appartenenza dei ceppi allo stesso cluster si considera un *cut-off* di similarità dell'80%. L'interpretazione dei pulsotipi può risultare complessa, poiché piccoli eventi genetici, ad esempio inserzioni, delezioni, mutazioni puntiformi o mobilitazione di elementi trasponibili, possono alterare il numero o la posizione delle bande prodotte. Per ridurre il rischio di interpretazioni errate, è spesso raccomandato l'utilizzo di più enzimi in parallelo, soprattutto nelle indagini su focolai ospedalieri.

Tecniche per la tipizzazione a più elevata risoluzione includono *Multilocus Sequence Typing* (MLST) o *Whole Genome Sequencing* (WGS), soprattutto quando l'analisi coinvolge cluster complessi o ceppi appartenenti a specie caratterizzate da elevata plasticità genetica (Neoh HM et al., 2019).

La tecnica MLST rappresenta una metodica di tipizzazione molecolare utilizzata per la caratterizzazione di cloni batterici in ambito epidemiologico (Ibik YE et al., 2023). Si basa sull'amplificazione e il successivo sequenziamento di geni *housekeeping*, altamente conservati (Khdhiri M et al., 2024). L'utilizzo di geni relativamente stabili conferisce alla metodica un potere discriminante adeguato e, soprattutto, la possibilità di confronto tra laboratori e piattaforme differenti, poiché le sequenze ottenute possono essere archiviate in database internazionali facilmente accessibili.

Ogni variante allelica identificata viene codificata con un numero; la combinazione di questi numeri costituisce il profilo allelico, dal quale si ricava l'assegnazione di un *Sequence Type* (ST), anch'esso identificato da un numero univoco. Gli ST possono essere ulteriormente raggruppati in complessi clonali (*Clonal Complexes, CC*), definiti sulla base della similarità allelica e utili per descrivere relazioni evolutive tra ceppi strettamente correlati.

L'adozione di un sistema numerico standardizzato consente di confrontare agevolmente i dati a livello globale e ha portato allo sviluppo di database online, come PubMLST (*Multi-Locus Sequence Typing. PubMLST database*. <https://pubmlst.org/multilocus-sequence-typing>), che consente di identificare rapidamente ST noti, nuovi profili allelici o cloni epidemici di rilevanza clinica. L'assegnazione dei ceppi a ST o complessi clonali specifici permette, inoltre, di monitorare la diffusione di ceppi spesso associati a elevata resistenza antimicrobica o adattamento all'ambiente ospedaliero.

L'MLST offre importanti vantaggi, tra cui la grande riproducibilità, la facilità di interpretazione e la possibilità di confrontare ceppi provenienti da contesti geografici diversi. A differenza della PFGE, che produce pulsotipi soggetti a variazioni tecniche, l'MLST genera dati stabili e indipendenti dalle condizioni sperimentali, favorendo un approccio comparativo altamente affidabile. Inoltre, la natura sequenziale dei dati consente analisi filogenetiche più robuste e la ricostruzione dell'evoluzione clonale su scale temporali ampie.

Tuttavia, l'MLST mostra alcune limitazioni: poiché l'analisi si concentra su una porzione relativamente piccola del genoma (circa 3–4 kb complessivi), il suo potere discriminante risulta talvolta insufficiente, soprattutto nelle indagini di focolai nosocomiali che coinvolgono ceppi quasi identici (Glasgow HL et al., 2025). In tali contesti, la tecnica non consente di rilevare microvarianti emergenti, né di distinguere ceppi appartenenti allo stesso *lineage*, rendendo necessaria l'integrazione con approcci a più alta risoluzione, come il WGS (Schürch AC et al., 2018).

Nonostante tali limiti, la metodica è ampiamente utilizzata per studi epidemiologici su larga scala, per il monitoraggio dei cloni epidemici e per la definizione della struttura popolazionale delle principali specie batteriche associate alle ICA.

In questo contesto, tecniche di nuova generazione come il WGS rappresentano oggi lo strumento più innovativo per la sorveglianza molecolare, consentendo di analizzare l'intero genoma batterico, identificare mutazioni puntiformi, elementi genetici mobili, determinanti di resistenza e relazioni clonali con elevata risoluzione. La sua integrazione nei programmi di sorveglianza permetterebbe di ricostruire con elevata precisione le catene di trasmissione, distinguere ceppi quasi identici e monitorare l'evoluzione dei cloni MDR nel tempo, migliorando significativamente la capacità di risposta ai focolai ospedalieri.

Alcuni limiti ne ostacolano l'adozione routinaria. I costi di sequenziamento, pur in progressiva diminuzione, rimangono superiori rispetto alle metodiche tradizionali, soprattutto quando applicati a un numero elevato di isolati. A ciò si aggiungono i costi infrastrutturali legati alla necessità di piattaforme di sequenziamento, software bioinformatici avanzati e sistemi di archiviazione per la gestione di grandi volumi di dati genomici. Inoltre, l'interpretazione dei risultati richiede competenze bioinformatiche specialistiche e personale adeguatamente formato. Infine, la standardizzazione delle *pipeline* analitiche e la comparabilità inter-laboratorio rappresentano ancora una sfida, rendendo necessario un coordinamento nazionale e internazionale per garantire l'armonizzazione dei dati.

3.2 Strategie di prevenzione e controllo

La prevenzione e il controllo delle ICA richiedono un approccio multilivello e integrato, capace di combinare dimensioni cliniche, organizzative e tecnologiche all'interno di una *governance* strutturata e coordinata (Anello P et al., 2025). La crescente complessità dei percorsi assistenziali, unita alla diffusione di microrganismi multiresistenti, rende indispensabile l'istituzione di sistemi dedicati all'IPC, quali comitati aziendali, *infection control nurse* ed epidemiologi ospedalieri.

Tali figure assicurano la pianificazione, l'implementazione e la valutazione delle misure preventive, favorendo l'armonizzazione delle procedure e garantendo una risposta tempestiva in presenza di eventi avversi o focolai epidemici. Una *governance* efficace si fonda, inoltre, sull'impiego di indicatori, strumenti essenziali per identificare criticità, monitorare l'impatto degli interventi e allocare in modo appropriato le risorse (WHO, 2023g).

All'interno di questo modello di *governance*, l'adozione rigorosa delle precauzioni standard costituisce il livello fondamentale di protezione, poiché esse rappresentano il nucleo delle strategie IPC che devono essere applicate universalmente, indipendentemente dalla diagnosi del paziente. Tra queste, l'igiene delle mani costituisce il pilastro fondamentale (WHO, 2025h).

Le precauzioni aggiuntive (da contatto, *droplets* e aerosol) rappresentano il secondo livello di controllo e devono essere utilizzate quando le precauzioni standard non sono sufficienti a impedire la trasmissione del microrganismo. Quindi, devono essere attivate sulla base della valutazione del rischio e mantenere un elevato grado di flessibilità, con protocolli da attivare in caso di cluster epidemici o di diffusione di patogeni ad alta trasmissibilità (Epicentro, 2025a). La loro corretta applicazione assume un'importanza fondamentale nei reparti ad alta intensità assistenziale, dove il rischio di amplificazione della trasmissione è accentuato.

In questo quadro, i *bundle* rappresentano strumenti operativi concreti che traducono le linee guida e le raccomandazioni basate sull'evidenza in pratiche integrate e misurabili, contribuendo in modo diretto alla riduzione del rischio di trasmissione dei patogeni e al miglioramento degli esiti clinici dei pazienti.

Tuttavia, l'efficacia dei *bundle* richiede un monitoraggio sistematico della *compliance*, *feedback* immediati agli operatori e *audit* periodici, ovvero un coinvolgimento multiprofessionale che possa garantire la reale sostenibilità degli esiti nel lungo periodo (Molina García A et al., 2022).

Anche la sanificazione ambientale richiede un approccio strutturato e controllato, che prevede l'aderenza rigorosa ai protocolli di *cleaning* e *disinfection*, il monitoraggio continuo e il coinvolgimento attivo del personale al fine di tradurre le procedure in una reale riduzione delle ICA.

A tal proposito, superfici ad alto contatto e dispositivi mobili, come pompe infusionali, letti, tablet e

strumenti diagnostici portatili, sono riconosciuti come vettori di trasmissione microbica e richiedono particolare attenzione, poiché spesso trascurati nei protocolli tradizionali (WHO, 2021i).

Sebbene ancora poco diffuse a livello nazionale, l'introduzione di tecnologie innovative, tra cui sistemi UV-C e tecniche di disinfezione con perossido di idrogeno nebulizzato, offre un supporto rilevante nei reparti ad alto rischio e durante focolai epidemici. Contestualmente, la crescente sensibilità verso la sostenibilità impone l'adozione di prodotti e metodi di disinfezione a ridotto impatto ambientale, purché vengano mantenuti standard elevati di efficacia microbiologica (Ishikawa K et al., 2025).

In continuità con le strategie di sanificazione ambientale, le strategie di “*antimicrobial stewardship*” rappresentano uno strumento essenziale nell'ambito delle misure di IPC, poiché contribuiscono in maniera determinante a ridurre la pressione selettiva che alimenta la diffusione di ceppi resistenti. Oltre alla razionalizzazione delle terapie antimicrobiche e alla sorveglianza dei consumi, crescente attenzione è riservata alla “*diagnostic stewardship*”, che promuove l'appropriatezza delle richieste microbiologiche e l'impiego di metodiche diagnostiche rapide per ottimizzare la scelta terapeutica sin dalle fasi iniziali dell'infezione. L'integrazione tra microbiologi, farmacisti e clinici consentirebbe di migliorare l'appropriatezza prescrittiva, ridurre i costi sanitari e abbreviare la durata delle degenze (Peri AM et al., 2024).

Un ulteriore pilastro essenziale nel controllo delle ICA è rappresentato dalla sorveglianza microbiologica. Accanto ai sistemi tradizionali di sorveglianza attiva e passiva, si sta affermando un modello di sorveglianza integrata, basato sull'interoperabilità dei dati con reti regionali e nazionali, che consenta di individuare precocemente ceppi epidemici, tracciare catene di trasmissione e identificare nuovi meccanismi di resistenza (ISS, 2024c).

La sorveglianza ambientale, che include l'analisi di acque, superfici e aria, completa le attività cliniche, consentendo l'identificazione di *reservoir* nascosti e la valutazione dell'efficacia delle procedure di sanificazione.

Parallelamente, la formazione continua rappresenta una condizione imprescindibile per assicurare l'efficacia delle strategie IPC. In particolare, le metodologie formative innovative, come simulazioni *in situ* e programmi di *e-learning* si sono dimostrati efficaci nel migliorare l'aderenza alle pratiche preventive e nel favorire il coinvolgimento attivo del personale (WHO, 2019j).

Nel complesso, la prevenzione e il controllo delle ICA devono essere collocati in una visione sistemica che integri i principi dell'approccio “*One Health*”. La diffusione di microrganismi resistenti tra ospedale, comunità e ambiente dimostra che soltanto strategie integrate e collaborazioni intersettoriali possono produrre un impatto significativo e sostenibile (Graham SB et al., 2023).

4. Obiettivi

L'AMR rappresenta una delle principali emergenze sanitarie globali, con importanti conseguenze cliniche, sociali ed economiche. L'uso eccessivo e inappropriato di antibiotici in medicina umana, veterinaria e zootecnia ha favorito la selezione e la diffusione di microrganismi MDR, capaci di compromettere l'efficacia delle terapie e di diffondersi attraverso catene di trasmissione complesse che coinvolgono l'uomo, gli animali e l'ambiente. In tale scenario, le ICA rivestono un ruolo cruciale, poiché responsabili di elevata mortalità e spesso associate a patogeni del gruppo ESKAPE, noti per la loro capacità di sviluppare resistenze multiple e di persistere nell'ambiente ospedaliero (Oliveira M et al., 2024).

Secondo i dati dell'EARS-Net e dell'ISS, l'Italia presenta tassi di resistenza tra i più elevati in Europa per diversi patogeni, soprattutto verso carbapenemi e glicopeptidi (Iacchini S et al., 2023). In questo contesto, anche la regione Molise mostra criticità significative, con livelli di resistenza superiori alla media nazionale per alcuni microrganismi di rilevanza clinica. Tra questi, *P. aeruginosa*, *E. faecium* e *S. aureus* sono tra i principali patogeni responsabili di ICA, poiché caratterizzati da elevata capacità di sviluppo di multiresistenze e di persistenza ambientale. Comprendere l'impatto di tali infezioni e caratterizzare i ceppi è essenziale per sviluppare strategie di controllo efficaci e ridurre la diffusione di cloni epidemici.

In questo ambito, la sorveglianza epidemiologica gioca un ruolo chiave; secondo l'OMS, essa è definita come “un esercizio continuo di raccolta, analisi e interpretazione dei dati relativi alla distribuzione e diffusione delle malattie e dei fattori ad esse correlati, sufficientemente completo e accurato da permettere interventi efficaci di controllo e prevenzione” (WHO, 2023b). Un sistema di sorveglianza efficace consente, quindi, di monitorare l'evoluzione della resistenza, identificare rapidamente focolai e guidare l'adozione di misure mirate di prevenzione e contenimento.

Il lavoro di tesi ha come obiettivo generale lo studio dell'antibiotico-resistenza e, in particolare, la caratterizzazione biomolecolare di ceppi isolati in ambito ospedaliero, con particolare riferimento ai determinanti di resistenza e ai *pattern* di diffusione clonale.

In dettaglio, gli obiettivi sono stati quelli di:

- caratterizzare, mediante antibiogramma, gli isolati batterici in base al profilo di resistenza (resistotipo) e determinazione della MIC per diversi antibiotici;
- determinare, mediante PCR, la prevalenza dei determinanti genici implicati nella resistenza a glicopeptidi, aminoglicosidi, macrolidi e ampicillina per *E. faecium* e alla meticillina per *S. aureus*;
- determinare, mediante PCR, la prevalenza dei geni coinvolti nei meccanismi di virulenza in *E. faecium* e in *S. aureus*;

- analizzare, attraverso PFGE, RAPD-PCR ed ERIC-PCR, le relazioni tra ceppi umani e isolati da superfici ambientali ed individuare la presenza di cluster per *P. aeruginosa*;
- analizzare, attraverso PFGE, le relazioni clonali tra ceppi umani di *E. faecium* e *S. aureus*;
- descrivere, mediante MLST, la distribuzione dei cloni circolanti ed emergenti in *P. aeruginosa* e *E. faecium* per un confronto con i dati a livello nazionale ed internazionale.

Lo studio intende, quindi, contribuire alla comprensione dei meccanismi di diffusione della resistenza, al rafforzamento dei sistemi di sorveglianza e alla definizione di strategie per ridurre l'incidenza di ICA sostenute da patogeni MDR. La finalità ultima è quella di fornire strumenti utili all'implementazione di interventi di controllo efficaci e stimolare future linee di ricerca in un'ottica integrata e interdisciplinare coerente con il paradigma "*One Health*".

5. Materiali e Metodi

5.1 Isolamento e selezione dei ceppi di *P. aeruginosa*, *E. faecium* e *S. aureus*

Nello studio dell'antibiotico-resistenza sono stati analizzati 33 ceppi di *P. aeruginosa* (Tabella 1), 31 di *E. faecium* (Tabella 2) e 34 di *S. aureus* (Tabella 3) raccolti nell'ambito del sistema di sorveglianza sentinella “*Alert organisms*” attivato presso il Presidio Ospedaliero (PO) *hub* “A. Cardarelli” di Campobasso, Molise, Italia.

I ceppi di *P. aeruginosa* sono stati isolati a luglio-agosto 2022, quelli di *E. faecium* tra novembre 2022 e febbraio 2024, mentre i ceppi di *S. aureus* fanno riferimento al periodo ottobre 2023-ottobre 2024. Riguardo *P. aeruginosa*, quattro ceppi umani sono stati isolati dal reparto di Terapia Intensiva Neonatale (TIN), provenienti da campioni quali tampone auricolare, nasale, oculare e coltura da catetere ombelicale. Ulteriori 15 ceppi clinici sono stati raccolti nello stesso periodo da pazienti (53% maschi, età media $69 \pm 18,1$ anni, range 21-89 anni) ricoverati in diversi reparti, soprattutto in terapia intensiva (UTI) (n=4, 21,1%), ortopedia e medicina interna (n=2, 10,5% ciascuno).

A seguito degli isolamenti in TIN, è stato condotto un campionamento ambientale sia all'interno della TIN, sia in sala parto mediante l'utilizzo di piastre *Replicate Organism Direct Agar Contact* (RODAC) e tamponi superficiali, concentrandosi particolarmente sui punti critici del percorso dalla sala parto alla TIN. Per il controllo microbiologico, sono stati impiegati terreni selettivi e differenziali specifici per *P. aeruginosa*: *Pseudomonas Agar Base CM0559* (OXOID, Milano, Italia) e *Pseudomonas Agar P-King Medium A* (Biolife, Milano, Italia). Inoltre, è stato utilizzato un terreno non selettivo, *Nutrient Agar* (Biolife, Milano, Italia), per la conta microbica totale.

Tutti i terreni di coltura sono stati integrati con lecitina di soia, un agente neutralizzante per residui dei disinfettanti dopo i trattamenti di sanificazione. Le piastre sono state trasportate al laboratorio in condizioni di refrigerazione e successivamente incubate a 37°C overnight. Sono stati, quindi, isolati complessivamente quattordici ceppi ambientali di *P. aeruginosa*, dei quali 10 da TIN e 4 dalla sala parto.

Per *E. faecium*, sono stati inclusi 26 ceppi umani (84%) isolati dall'ospedale *Hub* di Campobasso, mentre i restanti 5 (16%) dall'ospedale *spoke* di Isernia. I ceppi sono stati isolati da pazienti (65% maschi, età media $63 \pm 22,2$ anni, range 0-90 anni) soprattutto da tamponi rettali (n=22, 70,9%) e urinocolture da catetere vescicale (n=4, 12,9%) e ricoverati nei reparti UTI (n=16, 53,3%), medicina donne (n=4, 13,3%), anestesia (n=3, 10,0%) e TIN (n=2, 6,7%) del PO *hub*, mentre tutti i ceppi dall'ospedale *spoke* sono stati isolati in UTI. I ceppi di *S. aureus* provenienti dal PO *hub*, sono stati ottenuti principalmente da emocolture (aerobi/anaerobi/miste/da CVC/pediatrie) (n=15, 44,1%), broncoaspirato (n=5, 14,7%) e ulcere (n=4, 11,8%). Tali ceppi sono stati isolati da pazienti ricoverati

perlopiù in malattie infettive (n=6; 17,7%), seguiti da nefrologia e medicina donne (n=5; 14,7% ciascuno).

Tutti gli isolati sono stati raccolti e rigenerati presso i Laboratori della Cattedra di Igiene dell'Università degli Studi del Molise su piastre di Tryptic Soy Agar (Biolife, Milano, Italy), successivamente incubate a 37°C overnight.

Tabella 1: Caratteristiche dei pazienti da cui sono stati isolati ceppi di *P. aeruginosa* presso il PO *hub*

Codice	Età	Sesso	Data Prelievo	Sede prelievo	Reparto
PaH1	71	M	04/07/2022	Urinocoltura da CV	Urologia
PaH2	0	M	02/07/2022	Tampone auricolare	TIN
PaH3	71	M	21/07/2022	Urinocoltura	Nefrologia
PaH4	60	M	18/07/2022	Emocoltura da CVC	UTI
PaH5	89	F	29/07/2022	Urinocoltura da CV	Malattie infettive
PaH6	67	M	01/08/2022	Broncoaspirato	UTI
PaH7	21	M	04/08/2022	Ferita	Ortopedia
PaH8	43	F	08/08/2022	Ulcera	Pronto Soccorso
PaH9	66	F	18/08/2022	Urinocoltura	Riabilitazione
PaH10	63	F	18/08/2022	Urinocoltura	Medicina
PaH11	87	F	19/08/2022	Deiscenza	Chirurgia vascolare
PaH12	0	M	22/08/2022	Tampone nasale	TIN
PaH13	0	F	19/08/2022	Catetere ombelicale	TIN
PaH14	76	M	18/08/2022	Broncoaspirato	UTI
PaH15	0	M	24/08/2022	Tampone oculare	TIN
PaH16	83	M	10/08/2022	CVC	Medicina
PaH17	83	F	11/08/2022	Urinocoltura da CV	Cardiologia
PaH18	85	F	12/08/2022	Ferita chirurgica	Ortopedia
PaH19	62	M	16/08/2022	Broncoaspirato	UTI
PaE1	/	/	21/07/2022	Sifone lavandino	Sala parto
PaE2	/	/	21/07/2022	Rubinetto	TIN
PaE5	/	/	21/07/2022	Sifone lavandino	Sala parto
PaE7	/	/	21/07/2022	Lavandino	TIN
PaE8	/	/	21/07/2022	Sifone lavandino	Sala parto
PaE9	/	/	21/07/2022	Lavandino	TIN
PaE12	/	/	21/07/2022	Fasciatoio	TIN
PaE13	/	/	21/07/2022	Lavandino	Sala parto
PaE14	/	/	22/08/2022	Filtro rubinetto	TIN
PaE15	/	/	12/08/2022	Scarico lavandino	TIN
PaE16	/	/	12/08/2022	Scarico lavandino	TIN
PaE17	/	/	12/08/2022	Scarico lavandino	TIN
PaE18	/	/	12/08/2022	Scarico lavandino	TIN
PaE19	/	/	25/08/2022	Sifone lavandino	TIN

Tabella 2: Caratteristiche dei pazienti da cui sono stati isolati ceppi di *E. faecium* presso PO *hub* e ospedale *Spoke* (rispettivamente di Campobasso e Isernia)

Codice	Età	Sesso	Data Prelievo	Sede prelievo	Reparto	Ospedale
VREfm12	70	M	28/11/2022	Urinocoltura da CV	UTI	<i>Hub</i>
VREfm26	53	M	22/11/2022	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm45	82	M	02/02/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm52	78	F	03/02/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Spoke</i>
VREfm56	49	M	10/02/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm58	69	F	08/02/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Spoke</i>
VREfm63	59	M	13/02/2023	Liquido addominale	Urologia	<i>Hub</i>
VREfm71	90	M	20/02/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Spoke</i>
VREfm72	67	M	22/02/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm74	74	M	23/02/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Spoke</i>
VREfm78	41	F	03/03/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm84	75	F	02/03/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm86	53	M	06/03/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm91	41	F	06/03/2023	Urinocoltura da CV	UTI	<i>Hub</i>
VREfm92	64	M	12/03/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Spoke</i>
VREfm95	41	F	06/03/2023	Urinocoltura da CV	UTI	<i>Hub</i>
VREfm133	80	M	26/04/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm 143	1	F	17/05/2023	Cannula orotracheale	Patologia neonatale	<i>Hub</i>
VREfm145	82	M	15/05/2023	Tampone rettale	Medicina donne	<i>Hub</i>
VREfm147	72	M	15/05/2023	Tampone rettale	Medicina donne	<i>Hub</i>
VREfm150	74	M	09/05/2023	Tampone rettale	Chirurgia donne	<i>Hub</i>
VREfm189	49	M	13/06/2023	Tampone rettale	Medicina donne	<i>Hub</i>
VREfm204	79	F	01/07/2023	Emocoltura aerobi	Medicina uomini	<i>Hub</i>
VREfm269	0	F	26/08/2023	Emocoltura pediatrica	Patologia neonatale	<i>Hub</i>
VREfm328	67	M	02/11/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm348	69	M	20/11/2023	Urinocoltura da CV	UTI	<i>Hub</i>
VREfm392	69	M	27/12/2023	Tampone rettale	UTI	<i>Hub</i>
VREfm410	89	F	23/01/2024	Emocoltura anaerobi	Medicina donne	<i>Hub</i>
VREfm425	83	M	06/02/2024	Tampone rettale	Anestesia	<i>Hub</i>
VREfm426	83	F	13/02/2024	Tampone rettale	Anestesia	<i>Hub</i>
VREfm440	83	M	21/02/2024	Tampone rettale	Anestesia	<i>Hub</i>

Tabella 3: Caratteristiche dei pazienti da cui sono stati isolati ceppi di *S. aureus* presso il PO Hub

Codice	Età	Sesso	Data Prelievo	Sede prelievo	Reparto
MRSA_317	74	F	12/10/23	Ulcera	Malattie infettive
MRSA_331	56	M	10/11/23	Ascesso	Chirurgia uomini
MRSA_335	87	F	08/11/23	Emocoltura aerobi	Malattie infettive
MRSA_353	66	F	21/11/23	Emocoltura	Nefrologia
MRSA_358	57	M	01/12/23	Ulcera	Dialisi
MRSA_375	55	M	04/01/24	Ulcera	Medicina donne
MRSA_385	68	M	23/12/23	Emocoltura aerobi	Chirurgia generale
MRSA_387	76	M	22/12/23	Emocoltura	Nefrologia
MRSA_390	0	M	28/12/23	Emocoltura pediatrica	Patologia neonatale
MRSA_391	74	M	27/12/23	Espettorato	Nefrologia
MRSA_405	66	M	19/01/24	Urinocoltura da CV	Nefrologia
MRSA_409	1	M	17/01/24	Tampone nasale	Patologia neonatale
MRSA_422	72	M	09/02/24	Broncoaspirato	Malattie infettive
MRSA_437	57	M	22/02/24	Broncoaspirato	Anestesia
MRSA_444	59	M	28/02/24	Ferita	Malattie infettive
MRSA_501	74	M	15/05/24	Deiscenza	Chirurgia vascolare
MRSA_458	0	F	21/03/24	Emocoltura anaerobi	Medicina donne
MSSA_461	92	F	23/03/24	Emocoltura anaerobi	Medicina donne
MRSA_477	71	M	07/05/24	Secrezione	Ortopedia donne
MRSA_481	33	F	02/05/24	Emocoltura da CVC	Malattie infettive
MRSA_527	61	M	03/06/24	Broncoaspirato	Anestesia
MRSA_540	75	F	26/06/24	Ulcera	Malattie infettive
MRSA_554	71	M	02/07/24	Broncoaspirato	Neurologia
MRSA_559	79	M	08/07/24	Emocoltura aerobi	Pronto soccorso
MRSA_705	75	F	30/09/24	Emocoltura da CVC	Medicina donne
MRSA_706	78	M	30/09/24	Broncoaspirato	UTI
MRSA_516	28	M	30/05/24	Esame colturale raccolta	ORL
MRSA_564	79	M	21/07/24	Emocoltura aerobi	Pronto soccorso
MRSA_583	79	M	02/08/24	Emocoltura aerobi	Nefrologia
MRSA_585	93	F	30/07/24	Emocoltura anaerobi	Pronto soccorso
MRSA_590	73	F	02/08/24	Esame colturale da CVC	Medicina donne
MRSA_717	51	F	17/11/24	Emocoltura anaerobi	Pronto soccorso
MRSA_726	55	M	30/10/24	Emocoltura anaerobi	Medicina interna
MRSA_730	52	M	26/10/24	Liquido pleurico	Dialisi

5.2 Test di suscettibilità agli antibiotici

La valutazione della suscettibilità agli antibiotici nei ceppi selezionati è stata effettuata in collaborazione con i Laboratori di Microbiologia del PO *Hub* usando *BD Phoenix™ Automated Microbiology System* (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, United States), che ha permesso di determinare la MIC di ciascun antibiotico. È da sottolineare che non tutti i ceppi sono stati testati per lo stesso *panel* di antibiotici; pertanto, la suscettibilità verso un antibiotico è stata calcolata in relazione al numero dei ceppi per i quali esso è stato testato.

Per la valutazione della suscettibilità agli antibiotici nei ceppi ambientali di *P. aeruginosa* è stata impiegata la metodica Kirby-Bauer, come alternativa al metodo standard di microdiluizione in brodo (Wang Q et al., 2020). La suscettibilità dei ceppi ambientali è stata valutata esclusivamente verso amoxicillina-acido clavulanico (30 µg, OXOID), trimetoprim (5 µg, OXOID), ciprofloxacina (5 µg, OXOID) e ceftazidime (30 µg, OXOID), poiché tali antibiotici erano disponibili al momento dello studio ed erano stati testati anche per gli isolati umani. I dischetti di antibiotici sono stati posti su piastre di Mueller–Hinton Agar (Biolife, Italia), inoculate con sospensione batterica standardizzata a 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml) e incubate a 37 °C per 24 h con successiva misurazione dell'alone di inibizione. I risultati sono stati interpretati in base ai *breakpoint* stabiliti per le diverse combinazioni di microrganismo e di antibiotico dall'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2023), quindi classificati nelle categorie di "Sensibile" (S) se i ceppi vengono inibiti *in vitro* da una concentrazione di antibiotico che suggerisce una forte probabilità di successo clinico; "Intermedio" (I) per i ceppi per i quali il successo terapeutico non è prevedibile e "Resistente" (R) per i ceppi che sono inibiti *in vitro* da una concentrazione di antibiotico tale da suggerire una forte probabilità di fallimento terapeutico.

5.3 Estrazione del DNA

Il DNA è stato estratto utilizzando Maxwell® 16 *Cell DNA Purification* (Promega, Milan, Italy) mediante il kit di purificazione *Cell Purification Cat#AS1010*. Il metodo permette l'estrazione simultanea di 16 campioni in soli 40 minuti, sfruttando le capacità della silice di adsorbire il materiale genetico. Il protocollo di estrazione è costituito da diverse fasi: lisi del campione; legame degli acidi nucleici a particelle di silice magnetizzata; separazione delle particelle legate da altri componenti cellulari; eluizione degli acidi nucleici. La sospensione batterica è stata sottoposta a lisi prima dell'estrazione. È stato, quindi, effettuato il prelievo di un'ansata di patina microbica da piastre di Trypton Soy Agar (TSA), precedentemente incubate overnight, in seguito risospesa in 300 µl di soluzione, contenente 260 µl di Buffer di lisi L6 (Tiocianato Guanidina + TRIS HCl pH 6.4 0,1M, EDTA 0,2M pH 8, Triton) e 40 µl di Proteinasi K (20 mg/ml) (IBI Shelton Scientific, Milano). Successivamente, la sospensione è stata incubata a 65°C per 10 minuti. Per la lisi completa della membrana esterna, la sospensione è stata riscaldata a 100°C per 10 minuti e centrifugata a 12.000 rpm per 1 minuto. Il protocollo di estrazione prevede di posizionare le cartucce disponibili per l'estrazione, una per ciascun ceppo, su un rack numerato, per poi rimuovere il sigillante ed eseguire le seguenti operazioni:

- trasferire la sospensione ottenuta dalla fase di lisi (circa 300 µl) nel pozzetto #1 della cartuccia, contrassegnato da un codice identificativo;
- posizionare un pistone (“*plunger*”) nel pozzetto #7 di ciascuna cartuccia;
- accendere lo strumento e usare il cursore “*Run*” per effettuare una corsa di purificazione e selezionare il metodo e il tipo di campione da cui estrarre il DNA (*Cell* in questo caso);
- aprire lo sportello dello strumento e premere “*Run/Stop*” per estendere la piattaforma verso l'esterno, al fine di posizionare correttamente le cartucce, ciascuna contenente un pistone;
- in ogni postazione, numerata da 1 a 16, predisporre un tubo di eluizione, contenente 300 µl del buffer di eluizione, incluso nel kit;
- premere “*Run/Stop*” per permettere alla piattaforma di ritirarsi verso l'interno e chiudere lo sportello per permettere l'inizio del processo di estrazione.

Quando la purificazione è stata completata, il monitor LCD mostra un messaggio per indicare che il processo è terminato e quindi:

- premere “*Run/Stop*” per portare in avanti la piattaforma dello strumento;
- rimuovere i tubi di eluizione dalla piattaforma dello strumento e posizzionarli nel rack magnetico, che permette di far precipitare le particelle sul fondo del tubo;
- trasferire i campioni da ciascun tubo di eluizione in tubi sterili;
- rimuovere le cartucce ed i pistoni ed eliminarli.

5.4 Protocolli di ERIC-PCR e RAPD-PCR per *P. aeruginosa*

Nei ceppi di *P. aeruginosa* l'analisi della diversità genetica è stata anche condotta mediante saggi ERIC-PCR e RAPD-PCR. Le reazioni di ERIC-PCR sono state allestite in un volume finale di 25 µL, contenente 6 µL di DNA, 1X PCR Master Mix (Promega Corporation) e 1 µM dei primer ERIC1-F ed ERIC2-R (Tabella 4) in base a protocolli precedentemente descritti (Stehling EG et al., 2010; Hematzadeh A e Haghkhah M, 2021), con alcune modifiche alle condizioni di amplificazione (95°C per 5 min; 35 cicli: 95°C per 40 s, 40°C per 1 min e 72°C per 1,5 min; 72°C per 7 min).

Le amplificazioni di RAPD-PCR sono state eseguite in un volume finale di 25 µL contenente 1 µL di DNA, 1X PCR Master Mix (Promega Corporation) e 4 µM del primer RAPD-272 o RAPD-208, secondo metodiche precedentemente descritte (Emaneini M et al., 2019; Hematzadeh A e Haghkhah M, 2021), con modifiche alle condizioni di amplificazione (94°C per 2 min; 35 cicli: 94°C per 30 s, 30°C per 30 s e 72°C per 2 min; 72°C per 10 min).

Tabella 4: Primer utilizzati per ERIC-PCR e RAPD-PCR

Primer	Sequenza (5'-3')	Riferimento bibliografico
ERIC1-F	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC	Stehling EG et al., 2010
ERIC2-R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Stehling EG et al., 2010
RAPD-272	AGCGGGCCAA	Emaneini M et al., 2019
RAPD-208	ACGGCCGACC	Emaneini M et al., 2019

I profili ottenuti sono stati visualizzati tramite transilluminatore UV (UVITEC Cambridge, Fire Reader) e analizzati mediante il software *BioNumerics v.5.10* (Applied Maths, Sint Martens Latem, Belgium). I dendrogrammi sono stati costruiti applicando il coefficiente di *Dice* e il metodo *UPGMA*, al fine di valutare le relazioni clonali tra i ceppi.

5.5 Protocolli di PFGE

Il DNA batterico è stato digerito con *SpeI* (Promega Corporation) per *P. aeruginosa* seguendo il protocollo standardizzato (Corona-Nakamura AL et al., 2001) e con *SmaI* (Promega Corporation) per *E. faecium* e *S. aureus*, seguendo il protocollo CDC specifico per microrganismi Gram positivi (CDC, 2025b), apportando alcune modifiche.

Sono state utilizzate specifiche condizioni:

- per *P. aeruginosa*: initial switch time 1 secondo; final switch time 50 secondi; ore di corsa 22; voltaggio 6 V/cm; temperatura 14°C;

-per *E. faecium* e *S. aureus*: initial switch time 5 secondi; final switch time 40 secondi; ore di corsa 24; voltaggio 6 V/cm; temperatura 14°C. I profili di restrizione sono stati analizzati tramite il software *BioNumerics* (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgio), confrontando i frammenti ottenuti con le bande del ladder impiegato (Promega-Markers® Lambda Ladder) e il ceppo di riferimento *Salmonella braenderup*.

I dendrogrammi sono stati generati utilizzando il coefficiente di *Dice* e il metodo *UPGMA*. L'interpretazione è stata eseguita in accordo con i criteri di Tenover (Tenover FC et al., 1995; Sammarco ML et al., 2014), impostando un *cut-off* di similarità del 60% e dell'80% per l'identificazione dei cluster e del 90% e del 95% per la definizione dei pulsotipi, rispettivamente per *P. aeruginosa* e per *E. faecium*/*S. aureus*.

È stato, inoltre, calcolato l'indice di diversità di Simpson (D) per valutare il potere discriminante della metodica attraverso il seguente calcolo:

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj - 1)$$

dove N = numero totale di ceppi analizzati; S = numero totale di sottotipi (pulsotipi); nj = numero totale di ceppi appartenenti al sottotipo (Hunter PR et al. 1988).

5.6 Protocolli di MLST per *P. aeruginosa* e *E. faecium*

Sono stati utilizzati schemi MLST validati, uno specifico per *P. aeruginosa* (Tabella 5) (Curran B et al., 2004) e l'altro per *E. faecium* (Tabella 6) (Homan WL et al., 2002). Entrambi hanno previsto l'amplificazione di 7 geni *housekeeping*, i cui prodotti di PCR sono stati sequenziati con il metodo di *Sanger* (Eurofins Genomics, Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, Germany). L'identificazione dei profili allelici e l'assegnazione del *Sequence Type* (ST) è stata effettuata mediante l'utilizzo della piattaforma *PubMLST* (<https://pubmlst.org/>). È stato, inoltre, calcolato l'indice D per valutare il potere discriminante della metodica MLST.

Tabella 5: Schema MLST per *P. aeruginosa*

Locus	Gene	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare
<i>acsA</i>	Acetil coenzima A sintetasi	F: ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC R: GACATAGATGCCCTGCCCCTTGAT	842 bp
<i>aroE</i>	Shikimato deidrogenasi	F: TGGGGCTATGACTGGAAACC R: TAACCCGGTTTTGTGATTCTCTACA	825 bp
<i>guaA</i>	GMP sintasi	F: CGGCCTCGACGTGTGGATGA R: GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	940 bp
<i>mutL</i>	Proteina di riparazione dei mismatch del DNA	F: CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG R: CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	940 bp
<i>nuoD</i>	NADH deidrogenasi I catena C, D	F: ACCGCCACCCGTAAGTCTG R: TCTCGCCCATCTTGACCA	1042 bp
<i>ppsA</i>	Fosfoenolpiruvato sintasi	F: GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG R: GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG	989 bp
<i>trpE</i>	Antralite sintetasi componente I	F: GCGGCCCGGGTCGTGAG R: CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	811 bp

Tabella 6: Schema MLST per *E. faecium*

Locus	Gene	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare
<i>atpA</i>	ATP sintasi, subunità alfa	F: CGGTTTCATACGGAATGGCACA R: AAGTTCACGATAAGCCACGG	556 bp
<i>ddl</i>	D-alanina:D-alanina ligasi	F: GAGACATTGAATATGCCTTATG R: AAAAAGAAATCGCACCG	465 bp
<i>gdh</i>	Glucosio-6-fosfato deidrogenasi	F: GGC GCACTAAAAGATATGGT R: CCAAGATTGGGCAACTTCGTCCCA	530 bp
<i>purk</i>	Fosforibosilaminoimidazol carbossilasi, subunità ATPasi	F: CAGATTGGCACATTGAAAG R: TTCATTACATATAGCCCG	492 bp
<i>gyd</i>	Glicer aldeide-3-fosfato deidrogenasi	F: CAAACTGCTTAGCTCCAAGGC R: CATTTCGTTGTCATACCAAGC	395 bp
<i>pstS</i>	Trasportatore fosfato ATP-binding cassette	F: TTGAGCCAAGTCGAAGCTGGAG R: CGTGATCACGTTCTACTTCC	583 bp
<i>adk</i>	Adenilato chinasi	F: TATGAACCTCATTTTAATGGG R: GTTGACTGCCAAACGATTTT	437 bp

5.7 Ricerca di geni di resistenza agli antibiotici e virulenza in ceppi di *E. faecium* e *S. aureus*

Nei ceppi di *E. faecium*, è stata effettuata la ricerca dei principali geni coinvolti nella resistenza alla vancomicina (*vanA* e *vanB*), agli amminoglicosidi (*aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa* e *ant(3'')-III*), ai macrolidi (*ermB*) e all'ampicillina (*pbp5*) e dei geni di virulenza *esp* (*enterococcus surface protein*), *asaI* (*aggregation substance*), *ace* (*adhesion to collagen of enterococcus*) e *gelE* (*gelatinase E*) mediante saggi di PCR utilizzando primer specifici (Tabelle 7 e 8), come precedentemente riportato (Shirvani F et al., 2021; Haghi F et al., 2019; Poeta P et al., 2007; Weng PL et al., 2019). L'amplificazione è stata effettuata in reazioni dal volume finale di 25 µL utilizzando 2,5 µl di DNA, 1X Master Mix (Promega Corporation) e primers (Eurofins Genomics, srl, Ebersberg, Germany) utilizzati alla concentrazione di 0,5-1 µM. I geni target sono stati amplificati usando le seguenti condizioni: 94°C per 3 min; 30 cicli: 94°C per 1 min, 50°C /45 s per *vanA*; 55°C /45 s per *vanB*; 51°C/1 min per *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*; 54°C/1 min per *aph(3')-IIIa*; 53°C/1 min per *ant(3'')-III* ed *ermB*; 48°C/1 min per *pbp5*; 50°C/1 min per *asaI*; 52°C/1 min per *ace*; 48 °C/1 min per *gelE*, 72°/1 min; 72°C per 7 min. I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (alla concentrazione di 1-1,5% m/v, TAE buffer 1X a 100 V per 1 h), includendo il ladder di DNA (Promega) da 100 bp. In ogni reazione è stato incluso un controllo negativo e un controllo positivo.

Tabella 7: Primer utilizzati per la ricerca di geni di resistenza in *E. faecium*.

Antibiotico	Gene target	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare	Riferimenti bibliografici
Vancomicina	<i>vanA</i>	F: CATGAATAGAATAAAAAGTTGCAATA R: CCCCTTTAACGCTAATACGATCAA	1 032 bp	Shirvani F et al., 2021
	<i>vanB</i>	F: GTCACAAACCGGAGGCGAGGA R: CCGCCATCCTCCTGCAAAAAA	430 bp	Shirvani F et al., 2021
	<i>aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia</i>	F: CCAAGAGCAATAAGGGCATA R: CACTATCATAACCACTACCG	369 bp	Haghi F et al., 2019
	<i>aph(3')-IIIa</i>	F: GGCTAAAATGAGAATATCACCGG R: CTTTAAAAAATCATACAGCTCGCG	523 bp	Haghi F et al., 2019
Amminoglicosidi	<i>ant(3'')-III</i>	F: TGATTTGCTGGTTACGGTGAC R: CGCTATGTTCTCTTGCTTTTG	284 bp	Haghi F et al., 2019
Macrolidi	<i>ermB</i>	F: CATTTAACGACGAAACTGGC R: GGAACATCTGTGGTATGGCG	425 bp	Portillo A et al., 2000
Ampicillina	<i>pbp5</i>	F: AACAAAATGACAAACGGG R: TATCCTTGGTTATCAGGG	900 bp	Poeta P et al., 2007

Tabella 8: Primer utilizzati per la ricerca di geni di virulenza in *E. faecium*.

Prodotto	Gene target	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare	Riferimenti bibliografici
Enterococcus surface protein	<i>esp</i>	F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGA	510 bp	Weng PL et al., 2019
Aggregation substance	<i>asa1</i>	F: GCACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375 bp	Jovanović M et al., 2023
Adhesion to collagen of enterococcus	<i>ace</i>	F: CAGGCCAACATCAAGCAACA R: GCTTGCCTCGCCTTCTACAA	616 bp	Haghi F et al., 2019
Gelatinase E	<i>gelE</i>	F: TATGACAATGCTTTTTGGGAT R: AGATGCACCCGAAATAATATA	213 bp	Haghi F et al., 2019

Nei ceppi di *S. aureus*, la presenza dei geni di resistenza (*mecA*, *mecC*) e di virulenza (*PVL*) è stata indagata mediante saggi di PCR multiplex, utilizzando primer specifici (Tabella 9), come precedentemente riportato (EURL-AR, 2024).

L'amplificazione è stata effettuata in reazioni dal volume finale di 25 µL, contenente 2 µL di DNA, 1X PCR Master Mix (Promega Corporation) e 0,5 µM di ciascun primer. I geni target sono stati amplificati usando le seguenti condizioni: 94°C per 5 min, seguita da 30 cicli (94°C per 30 sec, 56°C per 1 min e 72°C per 1 min), con una fase finale a 72°C per 10 min. I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio (alla concentrazione del 2,0% m/v, TAE buffer 1X a 100 V per 1 h), includendo un DNA ladder da 50 bp (Promega), un controllo positivo e uno negativo.

Tabella 9: Primer utilizzati per la ricerca di geni di resistenza e virulenza in *S. aureus*.

Gene target	Sequenza (5'-3') dei primer	Peso molecolare	Riferimenti bibliografici
<i>spa</i>	F: TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC R: CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT	180–600 bp	Stegger M et al., 2012
<i>mecA</i>	F: TCCAGATTACAACCTTCACCAGG R: CCACTTCATATCTTGTAACG	162 bp	Stegger M et al., 2012
<i>mecC</i>	F: GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC R: GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC	138 bp	Stegger M et al., 2012
<i>PVL</i>	F: GCTGGACAAACTTCTTGGAATAT R: GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG	83 bp	Stegger M et al., 2012

5.8 *Spa* Typing per *S. aureus*

La tipizzazione del gene *spa* nei ceppi di *S. aureus* è stata effettuata mediante amplificazione e successivo sequenziamento *Sanger* del gene con specifici primers (Forward: TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC; Reverse: CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT), come precedentemente riportato (EURL-AR, 2024).

Successivamente, 5 µL dei prodotti di PCR sono stati caricati su un gel di agarosio al 2% immerso in soluzione di TBE 1X e sottoposti a corsa elettroforetica per 100 minuti a 100 V, utilizzando come riferimento un ladder da 100 bp. Il gel è stato quindi osservato con un transilluminatore a luce UV, evidenziando la presenza di bande comprese tra 180 e 600 bp.

Per l'analisi quantitativa e qualitativa del DNA, è stato utilizzato lo spettrofotometro *NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, Milano, Italia), in grado di analizzare volumi estremamente ridotti (1 µL). Lo strumento fornisce automaticamente la lettura a 260, 280 e 230 nm, determinando la concentrazione del DNA e i rapporti di assorbanza che indicano il grado di purezza del campione.

Il prodotto di PCR è stato poi inviato a *Eurofins Genomics* (Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, Germany) per il sequenziamento. I risultati sono stati interpretati mediante il software *CGE Server spa Typer* (Bartels MD et al., 2014) e confrontati con il server *Ridom Spa Server* (Harmsen D et al., 2003). Per valutare il potere discriminante dello *spa* typing, è stato calcolato l'indice D.

6. Risultati

6.1 *P. aeruginosa*

I principali risultati relativi allo studio condotto sui ceppi di *P. aeruginosa* sono riportati nel lavoro di seguito allegato: Lombardi A, Tamburro M, Sammarco ML, Ripabelli G. Hospital environment as reservoir of *Pseudomonas aeruginosa* in human cases: a molecular epidemiology investigation in a hospital setting in central Italy. *Lett Appl Microbiol.* 2025;78(2):ovaf019. doi:10.1093/lambio/ovaf019.

Hospital environment as reservoir of *Pseudomonas aeruginosa* in human cases: a molecular epidemiology investigation in a hospital setting in central Italy

Adele Lombardi, Manuela Tamburro, Michela Lucia Sammarco, Giancarlo Ripabelli*

Department of Medicine and Health Sciences "Vincenzo Tiberio", University of Molise, Campobasso, Italy

*Corresponding author. Giancarlo Ripabelli, Department of Medicine and Health Sciences "Vincenzo Tiberio", University of Molise, Via De Sanctis, 86100 Campobasso, Italy. E-mail: ripab@unimol.it

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the main causes of hospital infections that are difficult to manage because of multidrug resistance (MDR). The aim of this study was to describe a molecular investigation on 19 clinical and 14 isolates from the environment in the Hub hospital of the Molise region, central Italy. Antimicrobial susceptibility was evaluated using BD Phoenix™ Automated Microbiology System. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with *SpeI*, enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR), and random amplified polymorphic DNA-PCR were performed for genotyping. All 33 *P. aeruginosa* showed MDR phenotype. PFGE had 0.99 discriminatory power, underlining high heterogeneity among the strains. The genetic relatedness between two human isolates (H12 and H15) from neonatal intensive care (NICU) and one environmental strain (E1) collected from siphon of sink in the delivery room was noticeable, as well as between one strain from faucet in NICU (E2) and siphon sink (E5) from delivery room. The link between H12, H15, and E1 strains was corroborated by ERIC-PCR showing epidemiological concordance, although with a lower discriminatory power. The study findings strengthened the critical correlation between clinical *P. aeruginosa* and environment, according to previous molecular surveys on outbreaks occurred in Italy.

Impact Statement

The emergence of antimicrobial resistance, particularly of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa*, represents a critical global public health threat. This study provides findings on the circulation of MDR *P. aeruginosa* in a hospital setting in central Italy during a period of 55 days, particularly in neonatal intensive care where newborns are subject to increased risks of hospital-acquired infections due to immunological immaturity and the need for invasive procedures and prolonged hospital stay. Results contribute to complete the epidemiological framework by enhancing the understanding of *P. aeruginosa* transmission routes, and support literature evidence about microbial dynamics from environmental sources to humans.

Keywords: *P. aeruginosa* infections; environmental contamination; molecular methods; neonatal intensive care; control measures

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is one of the most common causes of severe human infections acquired in the hospital setting leading to significant morbidity and mortality (Spagnolo et al. 2021, Liao et al. 2022, Wood et al. 2023). Considering its ability in the adaptation, survival, and multidrug resistance (MDR), infections can be life-threatening (Moradali et al. 2017).

Globally, *P. aeruginosa* was identified as responsible for more than 920 000 deaths attributable to antimicrobial resistance (AMR) and 3.57 million deaths associated with AMR in 2019 (Antimicrobial Resistance Collaborators 2022). The World Health Organization (WHO) 2017, during 2017, included *P. aeruginosa* in the list of pathogens for which development of new antimicrobial agents was urgently needed, defining the ESKAPE pathogens, including *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species with priority (De Oliveira et al. 2020). In the latest WHO Bacterial Priority Pathogens List, *P. aeruginosa* is included in the high group of antimicrobial resistant bacterial pathogens that could be critical for some populations being

difficult to treat, causing a substantial disease burden (Rello et al. 2019, European Centre for Disease Prevention and Control 2023), showing increased trends in resistance, and for which there are few potential treatments in the development pipeline (World Health Organization 2024). Therefore, the ESKAPE pathogens are still a global problem threatening public health and continue to represent major therapeutic challenges (Miller and Arias 2024).

Worldwide, *P. aeruginosa* in clinical settings is reported as a leading cause of infections, in both developed and developing countries. For example, a study conducted in Africa assessing the distribution of MDR ESKAPE pathogens in a hospital, reported that *P. aeruginosa* accounted for 4.77% of all isolates (Augustine et al. 2023). Moreover, a worrying prevalence of 54% of MDR *P. aeruginosa* was observed through a case-control surveillance study during the period 2008–2012 in five tertiary hospitals in Southern China (Peng et al. 2014).

The latest point prevalence survey in European acute care hospitals promoted by the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) in 2022–2023 reported *P. aeruginosa* as the cause of 7.9% of hospital-acquired infections (HAIs), of which 29.7% of isolates were carbapenem resistant

Received 18 October 2024; revised 10 January 2025; accepted 8 February 2025

© The Author(s) 2025. Published by Oxford University Press on behalf of Applied Microbiology International. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

(European Centre for Disease Prevention and Control 2024). Particularly, the highest percentage of *P. aeruginosa* was observed in Croatia (12.1%), followed by Greece (11.9%), Serbia (11.2%), Bulgaria (11.1%), and Italy 9.1% (European Centre for Disease Prevention and Control 2024).

As revealed by the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network, 14% of European countries in 2021 had percentages of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* equal to or above 50% (European Centre for Disease Prevention and Control 2023). Furthermore, data from National Institute of Health in Italy reported an increasing trend of resistance to carbapenems and high rates of resistance to piperacillin-tazobactam, ceftazidime, fluoroquinolones, and aminoglycosides (Iacchini et al. 2022).

Together with antibiotic resistance, *P. aeruginosa* has other survival mechanisms, including biofilm formation (Maurice et al. 2018), representing a potential site for the transfer of virulence factors and antibiotic resistance, thereby promoting its persistence in the environment (Spagnolo et al. 2015).

Indeed, the transmission from environmental sources to patients and healthcare workers has been previously described (Chia et al. 2020, Büchler et al. 2023). Because of the severe clinical manifestations of infections sustained by *P. aeruginosa* and the ability to cause outbreaks in the hospital setting, the use of molecular typing techniques was proven to be rapidly successful in epidemiological investigations (Selim et al. 2015, Sawa et al. 2020).

The aim of this study was to describe a molecular epidemiology investigation in order to evaluate the genetic relatedness between human *P. aeruginosa* isolates and those recovered from the hospital environment in the Molise region, central Italy, during July–August 2022.

Materials and methods

Clinical and environmental *P. aeruginosa* isolates

This was a non-interventional study, and the main findings were related to strains collected within a surveillance system established in the examined hospital, hence anonymity for patient data was assured. Since the study focused on molecular characterization of bacterial isolates and research did not involve humans, approval from an ethics committee was not required.

Pseudomonas aeruginosa strains were collected within the ‘alert organism’ system, a sentinel surveillance established for detecting and reporting the presence of microorganisms of clinical and epidemiological relevance due to multiple antibiotic resistance profiles and capacity for rapid spread isolated from patients hospitalized or temporarily treated at the *Hub* hospital ‘A. Cardarelli’ in Campobasso, the capital city of Molise region, central Italy.

Four clinical *P. aeruginosa* were isolated from the neonatal intensive care (NICU) during July–August 2022, and were collected from ear swab, nasal swab, umbilical catheter culture, and eye swab. Additional 15 clinical strains were collected in the same period from patients (53% male, mean age 69 ± 18.1 years, range 21–89 years) in other wards, including intensive care unit (21.1%), orthopedics and internal medicine (10.5% each), and urology, nephrology, infectious disease, emergency, rehabilitation, vascular surgery, and cardiology (5.3% each).

Following the isolations in NICU, to assess transmission routes, samplings from environmental sources in this ward

and in the delivery room were carried out. Before proceeding with the sampling, inspections were conducted to identify the pathways followed by patients from the delivery room to NICU, and hygiene and sanitation procedures were indicated to be implemented for reduce the risk of microorganism transmission. Microbiological sampling was performed using Replicate Organism Direct Agar Contact and surface swabs, based on the critical points previously identified.

For microbiological controls, two selective and differential media were used for *P. aeruginosa*, including *Pseudomonas* Agar Base CM0559 (OXOID, Milan, Italy) and *Pseudomonas* Agar P-King Medium A (Biolife, Milan, Italy), and one non-selective medium Nutrient Agar (Biolife) for total microbial count. All media were supplemented with soy lecithin, a neutralizer for disinfectant residues after the sanitation treatments. Surface sampling was performed using the four-quadrant streak technique in accordance with ISO 18593:2004 (International Standards Organization 2004). Plates were immediately transported to the laboratory at refrigerator temperature and incubated at 37°C overnight.

Fourteen *P. aeruginosa* strains were collected, of which 10 from NICU and 4 from delivery room (Table 1). All strains were sub-cultured by streaking on *Pseudomonas* Agar Base (Biolife) and incubated at 37°C overnight, and DNA was extracted using Maxwell® 16 Cell DNA Purification Kit (Promega corporation, Milan, Italy) for the subsequent applications.

Antimicrobial susceptibility testing

The evaluation of antimicrobial susceptibility of clinical isolates was in collaboration with the Hospital Microbiology Laboratory, using BD Phoenix™ Automated Microbiology System (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Sparks, USA). The minimum inhibitory concentrations (MICs) were calculated for the following antibiotics: ertapenem, imipenem, and meropenem; piperacillin, amoxicillin-clavulanate, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, ciprofloxacin, cefalexin, cefepime, cefuroxime, nitrofurantoin, tigecycline, trimethoprim, and levofloxacin. Results were interpreted (Table 2) according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints (EUCAST 2023). MDR profile was associated with an isolate showing resistance to three or four antibiotic classes.

The Kirby–Bauer disk diffusion method was carried out to test antimicrobial susceptibility among 14 environmental strains, showing acceptable performance as alternative to the standard broth microdilution method for *P. aeruginosa* for clinical treatment interpretation (Wang et al. 2020).

The susceptibility of environmental strains was only evaluated for amoxicillin-clavulanic acid (30 µg, OXOID), trimethoprim (5 µg, OXOID), ciprofloxacin (5 µg, OXOID), and ceftazidime (30 µg, OXOID), as these molecules were also tested for human isolates and were available at time of investigation. Antibiotic disks were placed onto Mueller–Hinton Agar plates (Biolife), inoculated with a bacterial suspension adjusted to 0.5 McFarland’s standard (1.5×10^8 UFC/ml) and incubated at 37°C for 24 h. The inhibition zone was measured and interpreted according to the EUCAST guidelines (EUCAST 2023).

Table 1. Clinical isolates, patient data, and characteristics of environmental samples.

Strains	Isolation dates	Clinical isolates				Strains	Environmental isolates		
		Ages	Genders	Samples	Wards		Isolation dates	Samples	Wards
PaH1	04/07/2022	71	M	Bladder catheter	Urology	PaE1	21/07/2022	Siphon sink	Delivery room
PaH2	02/07/2022	0	M	Ear swab	NICU	PaE2	21/07/2022	faucet	NICU
PaH3	21/07/2022	71	M	Urine culture	Nephrology	PaE5	21/07/2022	Siphon sink	Delivery room
PaH4	18/07/2022	60	M	Blood culture	ICU	PaE7	21/07/2022	Sink	NICU
PaH5	29/07/2022	89	F	Bladder catheter	Infectious disease	PaE8	21/07/2022	Siphon sink	Delivery room
PaH6	01/08/2022	67	M	Bronchial aspirate	ICU	PaE9	21/07/2022	Sink	NICU
PaH7	04/08/2022	21	M	Wound culture	Orthopedic	PaE12	21/07/2022	Changing table	NICU
PaH8	08/08/2022	43	F	Ulcer swab	Emergency	PaE13	21/07/2022	Sink	Delivery room
PaH9	18/08/2022	66	F	Urine culture	Rehabilitation	PaE14	22/08/2022	Filter faucet	NICU
PaH10	18/08/2022	63	F	Urine culture	Internal medicine	PaE15	12/08/2022	Sink drain	NICU
PaH11	19/08/2022	87	F	Wound culture	Vascular surgery	PaE16	12/08/2022	Sink drain	NICU
PaH12	22/08/2022	0	M	Nasal swab	NICU	PaE17	12/08/2022	Sink drain	NICU
PaH13	19/08/2022	0	F	Umbilical catheter	NICU	PaE18	12/08/2022	Sink drain	NICU
PaH14	18/08/2022	76	M	Bronchial aspirate	ICU	PaE19	25/08/2022	Sink siphon	NICU
PaH15	24/08/2022	0	M	Eye swab	NICU				
PaH16	10/08/2022	83	M	Central venous catheter	Internal medicine				
PaH17	11/08/2022	83	F	Bladder catheter	Cardiology				
PaH18	12/08/2022	85	F	Wound culture	Orthopedic				
PaH19	16/08/2022	62	M	Bronchial aspirate	ICU				

Table 2. MICs breakpoints for tested antibiotics (EUCAST 2023).

Antibiotics	MIC breakpoints (mg/l)	
	$S \leq$	$R >$
Amoxicillin-clavulanic acid	—	—
Piperacillin	0.001	16
Piperacillin-tazobactam	0.001 ¹	16 ¹
Cefalexin	—	—
Cefepime	0.001	8
Ceftazidime	0.001	8
Cefuroxime iv	—	—
Ertapenem	—	—
Imipenem	0.001	4
Meropenem	2	8
Ciprofloxacin	0.001	0.5
Levofloxacin	0.001	2
Tigecycline	—	—
Nitrofurantoin	—	—
Trimethoprim	—	—

Molecular typing by PFGE, ERIC-PCR, and RAPD-PCR

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *SpeI*-digested bacterial DNA was carried out to examine the relatedness of all isolates, based on the standardized protocol (Corona-Nakamura et al. 2001), with modifications for pulse time from 1 to 50 s over 22 h at 6 V/cm and at 14°C.

Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC-PCR) assays were performed in 25 µl final volume containing 6 µl of DNA template, 1X PCR Master Mix (Promega corporation), 1 µM of each primer, ERIC1-F, and ERIC2-R according to the protocol previously described (Stehling et al. 2010, Hematzadeh and Haghkhah 2021) with modifications for cycling conditions (95°C 5 min, 35 cycles at 95°C for 40 s, 40°C for 1 min, 72°C for 1.5 min, and 72°C for 7 min).

Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR) mixtures (25 µl) contained 1 µl DNA template, 1X PCR Master Mix (Promega corporation), 4 µM RAPD-272, or RAPD-208 primer following the procedure previously reported (Emameini

et al. 2019, Hematzadeh and Haghkhah 2021) with some modifications (94°C 2 min, 35 cycles at 94°C for 30 s, 30°C for 30 s, 72°C for 2 min, and 72°C for 10 min).

PFGE, ERIC-PCR, and RAPD-PCR profiles were analysed under UV light in a gel documentation system (UVITEC Cambridge, Fire Reader). Fingerprints were entered into a database in BioNumerics version 5.10 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), and dendrograms were built using Dice coefficient and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) (Aditi et al. 2017, Nageeb et al. 2021).

Results and discussion

This work reports a case-study based on a molecular epidemiology investigation for 19 clinical and 14 environmental isolates collected in a hospital setting during July–August 2022 in Molise region, central Italy. The rationale for this survey was based upon isolation of four isolates from NICU in the examined hospitals, therefore, to understand the contaminated en-

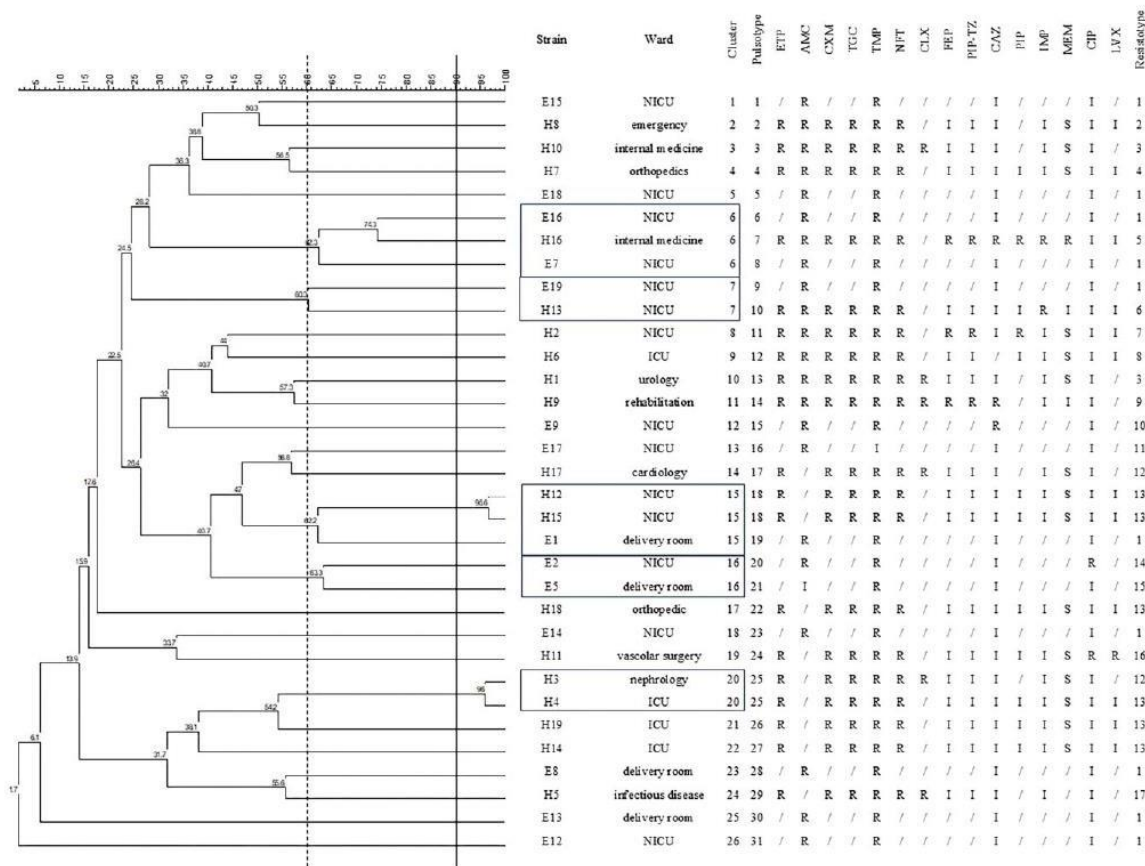


Figure 1. PFGE dendrogram (Dice coefficient) for 33 *P. aeruginosa* isolates. H, human isolate; E, environmental isolate; AMC, Amoxicillin-clavulanate; CXM, Cefuroxime; TGC, Tigecycline; TMP, Trimethoprim; NFT, Nitrofurantoin; CLX, Cefalexin; FEP, Cefepime; PIP-TZ, piperacillin-tazobactam; CAZ, Ceftazidime; PIP, Piperacillin; IMP, Imipenem; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacin; LVX, Levofloxacin; R, resistant; I, intermediate; S, sensitive; and /, untested antibiotic.

vironment sources and the transmission routes. Furthermore, for a deep interpretation of the results, hospital outbreaks of *P. aeruginosa* correlated with environment sources resolved through a molecular approach in Italy were considered.

In our survey, clinical *P. aeruginosa* strains were isolated from patients mostly hospitalized in NICU and ICUs (Table 1), thus among subjects who are mainly exposed to HAIs for immunological immaturity, frailty, invasive procedures and devices, immunosuppression, comorbidity, and increased age (Blot et al. 2022). Due to the ability of *P. aeruginosa* to form biofilm allowing adherence to any surface and persistence (Curran et al. 2018, Maurice et al. 2018, Hadadi-Fishani et al. 2020), potential environmental sources in the health-care settings could be responsible for HAI outbreaks (Cristina et al. 2021), and include water, medical devices not thoroughly cleaned/disinfected or dried, contaminated solutions, and surfaces.

Antibiotic resistance in *P. aeruginosa* represents a global concern, which could be due to genes acquired by horizontal gene transfer, overexpression of efflux pumps, and low outer membrane permeability and the acquisition of chromosomal (Botelho et al. 2019, Mancuso et al. 2023). In our study, clinical isolates showed high levels of resistance to penicillin, tetra-

cyclines, and cephalosporins, supporting the circulation of MDR *P. aeruginosa* in the examined hospital setting. Particularly, all were resistant to ertapenem, amoxicillin-clavulanate, cefuroxime, tigecycline, trimethoprim, and nitrofurantoin. Six (31.6%) isolates were resistant to cefalexin, three (15.7%) to cefepime and to piperacillin-tazobactam, two (10.5%) to ceftazidime, piperacillin and imipenem, and one each (5.2%) to meropenem, ciprofloxacin, and levofloxacin. These findings are in agreement with the most recent Italian data (Iacchini et al. 2022), showing the highest percentage of resistance for piperacillin-tazobactam (23.4%), followed by ceftazidime (19.1%), ciprofloxacin and levofloxacin (18.6% each), imipenem and meropenem (16.4% each), and gentamicin and amikacin (5.7% each).

Antimicrobial susceptibility profiles of environmental *P. aeruginosa* strains correlated with those from human cases, showing resistance to trimethoprim (92.9%), amoxicillin-clavulanate (92.9%), ciprofloxacin (7.14%), and ceftazidime (7.14%).

Pseudomonas aeruginosa possesses a very complex ecology with frequent recombination that creates strains with unique genetic characteristics, in which highly successful epidemic clones could arise (Magalhães et al. 2020). In this context,

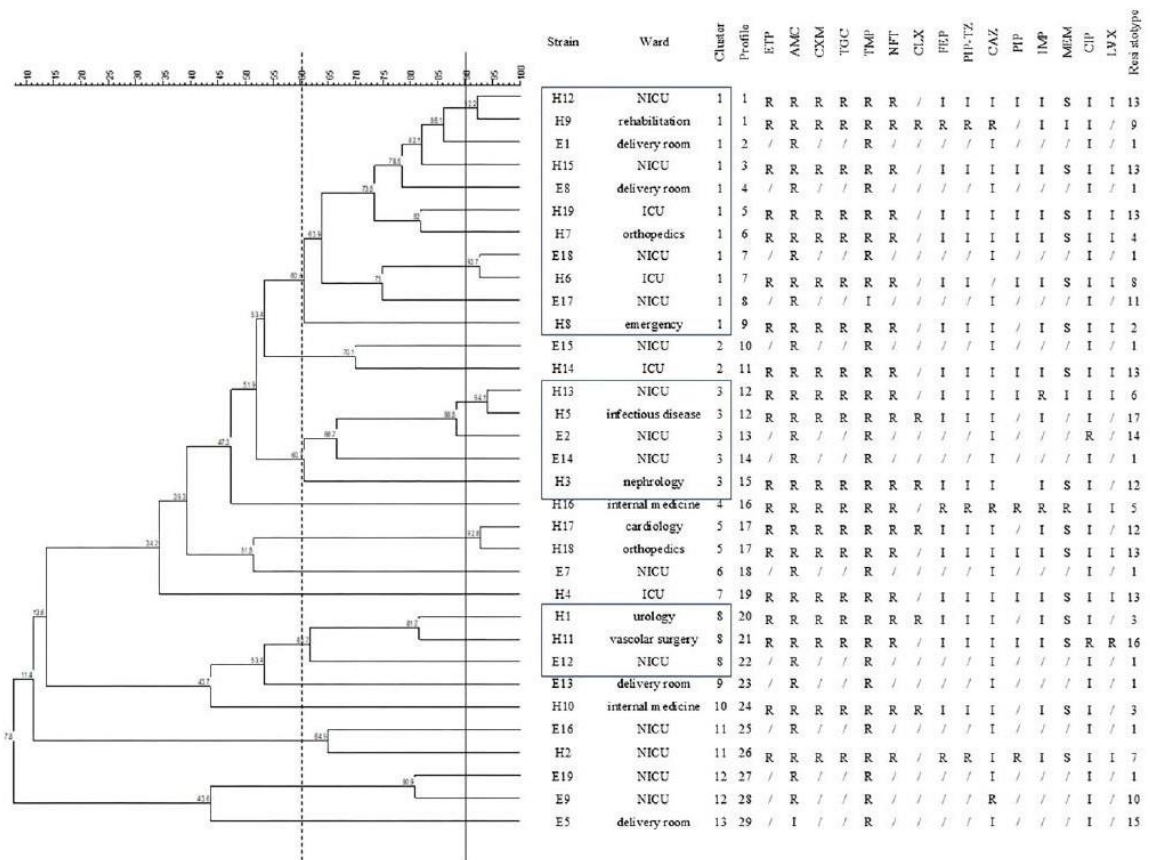


Figure 2. ERIC-PCR dendrogram (Dice coefficient) for 33 *P. aeruginosa* isolates. H, human isolate; E, environmental isolate; AMC, amoxicillin-clavulanate; CXM, Cefuroxime; TGC, Tigecycline; TMP, Trimethoprim; NIT, Nitrofurantoin; CLX, Cefalexin; FEP, Cefepime; PIP-TZ, Piperacillin-tazobactam; CAZ, Ceftazidime; PIP, Piperacillin; IMP, Imipenem; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacin; LVX, Levofloxacin; R, resistant; I, intermediate; S, sensitive; and /, untested antibiotic.

molecular epidemiological investigations have become essential for active surveillance of infections and detection of outbreaks, providing insights on the relatedness of strains, and consequently on the routes of colonization and/or infection.

For DNA fingerprinting of *P. aeruginosa* analysed in the study, three molecular typing methods were applied, including PFGE that has been considered as the 'gold standard' although more recently whole genome sequencing (WGS) is increasingly used. Important clusters were not observed at cut-off of 70%–80% used for similar analyses (Maroui et al. 2017, Karami et al. 2019, Motevasel et al. 2024), therefore the group analysis was carried out considering the similarity level of 60%, according to other reports (Tassios et al. 1998, Mokhtari and Amini 2019). PFGE revealed 26 clusters with the cluster 6 and 15 containing each three isolates of interest (Fig. 1). Cluster 6 included one clinical (H16) isolate from internal medicine ward and two environmental strains from NICU from sink drain and sink (E16 and E7, respectively), while cluster 15 grouped two clinical strains from NICU (H12 and H15, 96.6% similarity), and one environmental isolate from siphon sink of delivery room (E1). Clusters 7, 16, and 20 were represented each by two isolates: one clinical and one environmental isolate from NICU (H13 and E19), two environmental isolates from NICU and delivery room (E2 and E5),

and two clinical strains from nephrology (H3 H4) and ICU (96%), respectively. Although further epidemiological correlations were not found, these results support that PFGE is a molecular typing method with high discriminatory power providing significant insights (Sammarco et al. 2014, Neoh et al. 2019).

Genotyping of *P. aeruginosa* isolated in the hospital setting was also explored by ERIC and RAPD-PCR, being cost effective, readily available, and easy to perform although with discriminatory power, typeability, and reproducibility lower than those of PFGE (Auda et al. 2017). At 60% similarity level, ERIC-PCR showed cluster 1 as the most prevalent ($n = 11$, 33.3%) with seven clinical isolates from NICU and ICU, rehabilitation, orthopedics, and emergency, and four environmental strains from delivery room and NICU (Fig. 2). In addition, cluster 3 grouped three clinical (from NICU, infectious disease, and nephrology wards) and two environmental strains from NICU, and cluster 8 comprised two clinical strains from urology and vascular surgery, and one environmental isolate from NICU.

Based on RAPD-272, dendrogram showed 12 groups (Fig. 3), with cluster 8 as the most common, grouping 17 (51.5%) isolates, of which 94% were clinical with one environmental strain (E8) grouped with a clinical strain from

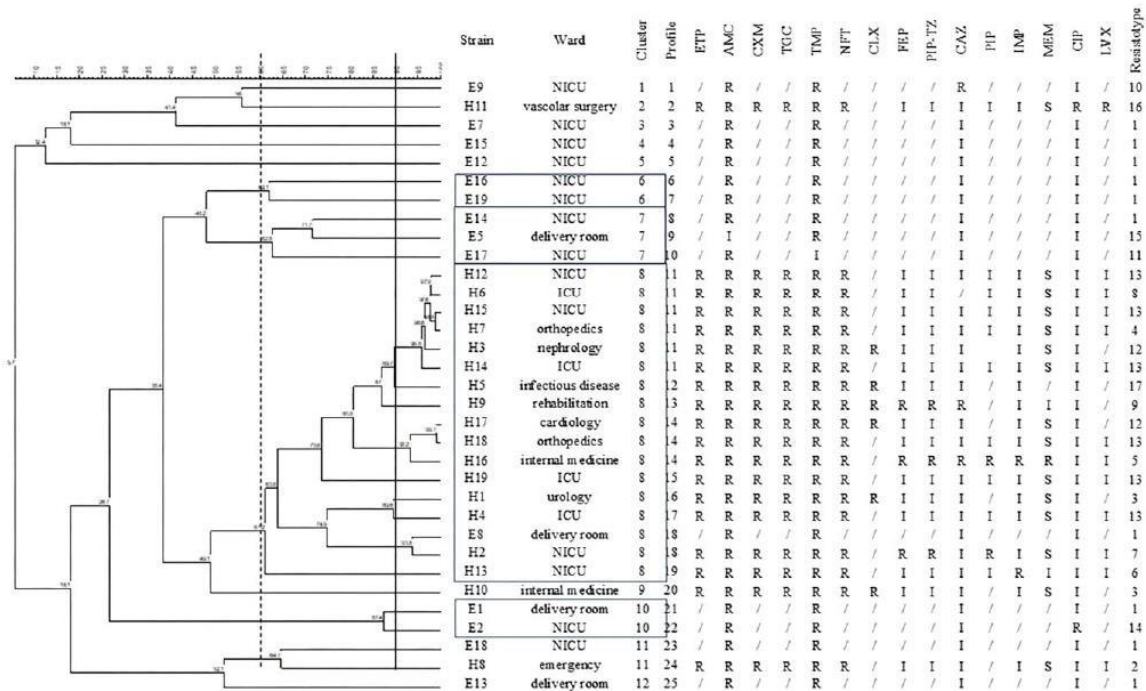


Figure 3. RAPD-PCR dendrogram (Dice coefficient) using primer 272 for 33 *P. aeruginosa* isolates. H, human isolate; E, environmental isolate; AMC, Amoxicillin-clavulanate; CXM, Cefuroxime; TGC, Tigecycline; TMP, Trimethoprim; NPT, Nitrofurantoin; CLX, Cefalexin; FEP, Cefepime; PIP-TZ, Piperacillin-tazobactam; CAZ, Ceftazidime; PIP, Piperacillin; IMP, Imipenem; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacin; LVX, Levofloxacin; R, resistant; I, intermediate; S, sensitive; and /, untested antibiotic.

NICU (H2) (93.8% similarity). Cluster 7 included three environmental isolates (2 from NICU—E14 and E17—and one from delivery room, E5), followed by clusters 6 and 10, with two environmental strains from NICU (E16 and E19), and two from delivery room and NICU (E1 and E2), respectively. RAPD-208 dendrogram showed 11 clusters (Fig. 4): cluster 1 grouped 51.5% ($n = 17$) isolates, including 52.9% from NICU with four clinical (H15, H13, H2, and H12) and five environmental strains (E15, E17, E9, E18, and E2), 11.8% from delivery room (E5 and E8 environmental strains) and ICU (H4 and H6), respectively. Cluster 4 grouped 15.2% isolates from different wards (H17, H18 and H16, and E14 and E1), while clusters 2 and 6 with two strains each (H8 and H9, E19 and H19, respectively). RAPD-PCR with both primers allocated H16 from the internal medicine ward in the same cluster with two clinical strains (H17 and H18) isolated on 10, 11, and 12 August, respectively, from the wards of cardiology and orthopaedics. However, this result was not supported by PFGE, which showed that these isolates belonged to distinct genotypes. Indeed, the analysis of the clinical history of the patients revealed that, although the isolation of the strains occurred in the same period, results from RAPD-PCR did not correlate with their circulation in the hospital.

Even though different number of clusters were generated, PFGE, ERIC-PCR, and RAPD-PCR with both primers showed epidemiological concordance and the clonal relatedness observed through PFGE was supported by ERIC-PCR and RAPD analyses, since they grouped the H12 and H15 isolates from NICU in the same cluster, and both PFGE and ERIC included the environmental strain E1 from delivery room in

the cluster. Moreover, both PFGE and RAPD-208 grouped together E2 and E5 from NICU and delivery room, and H3 and H4 from nephrology and ICU, respectively. The presence of important environmental sources was also indicated by RAPD-208 grouping a clinical strain (H16) from internal medicine ward with the environmental strain (E1) from siphon of sink in the delivery room. Similarly to RAPD-PCR but differently from PFGE, ERIC-PCR grouped H17 and H18 (92.8% similarity) in the same cluster. Although the high similarity of their antimicrobial susceptibility profiles, the consultation of medical records revealed that patients did not move among the two wards during the hospitalization, further supported by PFGE results displaying distinct genotypes for these isolates. Considering that antimicrobial susceptibility profiles and restriction profiles were discrepant, the information related to resistotypes could be only used for an initial screening for the study of *P. aeruginosa* isolates (Freitas and Barth 2004).

Our results and other studies report ERIC-PCR as the most suitable method for *P. aeruginosa* among PCR-based methodologies (Kidd et al. 2011). Moreover, RAPD with both primers could enable successful genotyping (Hafiane and Ravaoari-noro 2011), with RAPD-208 as more discriminatory than RAPD-272 ($D = 0.98$ vs $D = 0.97$, respectively), as previously reported (Saitou et al. 2010).

Although with the highest discriminatory power ($D = 0.99$), PFGE may not represent the method for typing *P. aeruginosa* due to its wide genetic heterogeneity. Thus, a deep investigation through WGS is needed to conclude about the relationship between the environmental sources and clinical strains (Neoh et al. 2019).

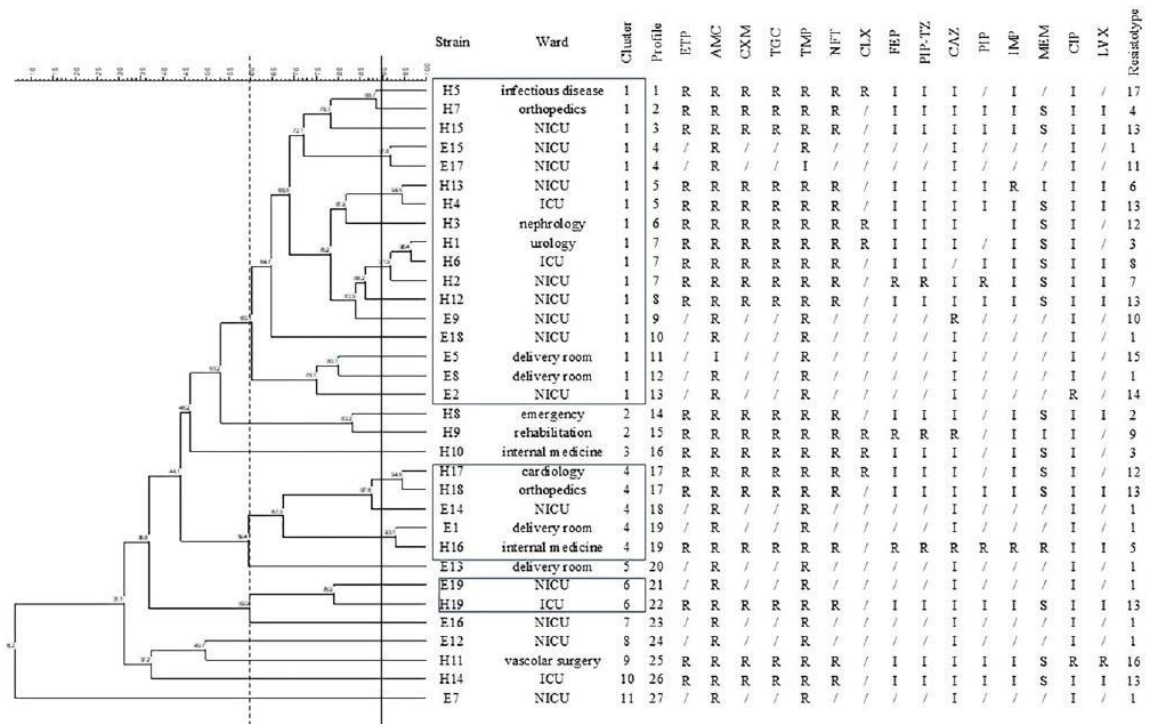


Figure 4. RAPD-PCR dendrogram (Dice coefficient) using primer 208 for 33 *P. aeruginosa* isolates. H, human isolate; E, environmental isolate; AMC, Amoxicillin-clavulanate; CXM, Cefuroxime; TGC, Tigecycline; TMP, Trimethoprim; NFT, Nitrofurantoin; CLX, Cefalexin; FEP, Cefepime; PIP-TZ, Piperacillin-tazobactam; CAZ, Ceftazidime; PIP, Piperacillin; IMP, Imipenem; MEM, Meropenem; CIP, Ciprofloxacin; LVX, Levofloxacin; R, resistant; I, intermediate; S, sensitive; and /, untested antibiotic.

The overall results support the transmission of the bacterial contamination amongst wards, which was likely related to a low adherence to disinfection programmes effective in controlling pathogen colonization and environmental persistence (Beggs et al. 2015). The transmission of *P. aeruginosa* from environmental sources, including sink, drains, faucet through the dispersion of contaminated droplets, or aerosols onto surrounding surfaces in the patient environment has been previously reported (Kotay et al. 2019, Pirzadian et al. 2023). Furthermore, previous studies conducted in Italy largely described the transmission ability of *P. aeruginosa* through environmental sources in causing nosocomial human infections and outbreaks (Orsi et al. 2006, Prospero et al. 2006, Crivaro et al. 2009). In detail, PFGE was used to investigate nosocomial bloodstream infections caused by *P. aeruginosa* in nine patients hospitalized in the neurosurgical intensive care unit of a hospital in Rome, Italy, and the correlation with environmental strains from a plasma-expander solution and tap water was highlighted (Orsi et al. 2006). Indeed, PFGE resolved genomic DNA of seven clinical and six environmental *P. aeruginosa* isolates into three major patterns, with the first including all clinical isolates and isolates from the plasma-expander solution suggesting its role as reservoir, and the second and third patterns in three and two strains, respectively, from water of two different rooms of the ward. An outbreak of *P. aeruginosa* catheter-related bloodstream infection was also described in a medical ward of a teaching hospital in Ancona, central Italy (Prospero et al. 2006). Molecular characterization by PFGE of four clinical isolated from patient blood and

one environmental strain, from the mixture of heparin and saline solution was carried out. The five isolates had identical resistotype and indistinguishable PFGE profile, showing that outbreak was caused by a single clone of *P. aeruginosa*. Molecular epidemiology of *P. aeruginosa* was also explored in 2005–2007 in the NICU of a University hospital in south Italy (Crivaro et al. 2009). PFGE of isolates collected from ninety neonates identified twenty genotypes, with one major pulsotype being isolated from 48 patients. The analysis focused on seven environmental strains as well, isolated from the hand of a nurse and from three sinks, with two PFGE profiles identical to two clinical isolates.

Pseudomonas aeruginosa, as other ESKAPE pathogens, is ubiquitous with enormous ability to survive in different niches, such as humans, plants, animals, soil, and aquatic environments, due to the genetic diversity present in its chromosome (Morales-Espinosa et al. 2024). Indeed, the environment may act as a reservoir for pathogens causing nosocomial infections and/or outbreaks, especially for *P. aeruginosa* able to persist on surfaces for long time. It has been demonstrated that, with the increase in the number of animals testing positive for MDR bacteria, monitoring of ESKAPE pathogens is crucial to understand transmission dynamics, prevent spread and protect public health through a One Health approach (Feuer et al. 2024, Mellace et al. 2024). In this context, biomolecular characterization is essential to fully recognize the genetic relationships between strains from various sources, including clinical and non-clinical samples (Soliman et al. 2024).

The implementation of hygiene measures and personnel behaviors are considered effective control measures for limiting the strains circulation (Rakshit et al. 2023). Indeed, it has been demonstrated in the effectiveness of hand hygiene using alcohol-based solutions, patient cohorting, contact precautions, active surveillance, and environmental cleaning, including water safety, in reducing *P. aeruginosa* spread and, consequently, in managing outbreaks in hospital settings (Karampatakis et al. 2023). After the increasing number of infections caused by *P. aeruginosa* in the study period and considering the molecular epidemiology results, targeted infection control measures were undertaken in the examined hospital, including a review of environmental hygiene procedures with the implementation of sanitization measures and the replacement of washbasins for hand and newborns hygiene with models more technologically suitable for lowering the risk of infection related to practices. Following these measures, a drastic reduction of *P. aeruginosa* isolation was reported.

The study has certain limitations. First, a limited number of *P. aeruginosa* were analysed, which, however, were isolated from a small size hospital in a non-metropolitan area in central Italy. Second, the isolates were collected along a brief timeframe because of the significant reduction of the number of isolations after the rapid implementation of sanitization measures. Moreover, WGS-based typing undoubtedly provides higher discriminatory power, and characterization of the strains could be limited using PFGE, ERIC-PCR, and RAPD-PCR. However, these molecular techniques are less expensive and are still used for the characterization of *P. aeruginosa* isolates with a good typing value (Hematzadeh and Haghighi 2021, Dufkova et al. 2023).

Conclusions

In conclusion, the study supports the critical association between environmental sources and clinical infections by *P. aeruginosa* as revealed through a molecular-based investigation. Although a high genetic heterogeneity was observed, molecular epidemiology approaches were necessary for the characterization of circulating strains and for better understanding the transmission routes and resistance mechanisms, to strengthen the surveillance and implement appropriate prevention and control strategies.

Acknowledgements

The authors acknowledge medical doctors De Dona Roberta, D'Amico Antonio and Viccione Vittorio for their collaboration in the environmental sampling in the hospital.

Author contributions

Adele Lombardi (Data curation [lead], Formal analysis [lead], Investigation [lead], Writing – original draft [equal]), Manuela Tamburro (Conceptualization [lead], Methodology [lead], Project administration [lead], Writing – review & editing [lead]), Michela Lucia Sammarco (Conceptualization [supporting], Writing – review & editing [equal]), and Giancarlo Ripabelli (Supervision [lead], Writing – review & editing [equal])

Conflict of interest: None declared.

Funding

None declared.

Data availability

Data available on request.

References

- Aditi, Shariff M, Chhabra SK et al. Similar virulence properties of infection and colonization associated *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2017;66:1489–98. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000569>
- Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* 2022;400:629–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02653-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02653-2)
- Auda IG, Al-Kadmy IM, Kareem SM et al. RAPD- and ERIC-based typing of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J AOAC Int* 2017;100:532–6. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.16-0267>
- Augustine FF, Mgaya XM, Yahya SA et al. An alarming prevalence of multidrug-resistant (MDR) ESKAPE pathogens and other drug-resistant bacteria isolated from patients with bloodstream infections hospitalized at Muhimbili National Hospital in Dar es Salaam, Tanzania. *Ger J Microbiol* 2023;3:7–15. <https://doi.org/10.51585/gjm.2023.3.0026>
- Beggs C, Knibbs LD, Johnson GR et al. Environmental contamination and hospital-acquired infection: factors that are easily overlooked. *Indoor Air* 2015;25:462–74. <https://doi.org/10.1111/in.a.12170>
- Blot S, Ruppé E, Harbarth S et al. Healthcare-associated infections in adult intensive care unit patients: changes in epidemiology diagnosis prevention and contributions of new technologies. *Intensive Crit Care Nurs* 2022;70:103227. <https://doi.org/10.1016/j.iccn.2022.103227>
- Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—mechanisms epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat* 2019;44:100640. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.07.002>
- Büchler AC, Shahab SN, Severin JA et al. Outbreak investigations after identifying carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review. *Antimicrob Resist Infect Control* 2023;12:28. <https://doi.org/10.1186/s13756-023-01223-1>
- Chia PY, Sengupta S, Kukreja A et al. The role of hospital environment in transmissions of multidrug-resistant Gram-negative organisms. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020;9:29. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-0685-1>
- Corona-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leños-Miranda B et al. Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res* 2001;32:238–42. [https://doi.org/10.1016/S0188-4409\(01\)00267-3](https://doi.org/10.1016/S0188-4409(01)00267-3)
- Cristina ML, Sartini M, Schinca E et al. Evaluation of multidrug-resistant *P. aeruginosa* in Healthcare facility water systems. *Antibiotics* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10121500>
- Crivaro V, Di Popolo A, Caprio A et al. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. *BMC Infect Dis* 2009;9:70. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-70>
- Curran CS, Bolig T, Torabi-Parizi P. Mechanisms and targeted therapies for *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:708–27. <https://doi.org/10.1164/rccm.201705-1043SO>
- De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ et al. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clin Microbiol Rev* 2020;33:e00181–19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- Dufkova K, Bezdicek M, Nykrynova M et al. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* international high-risk clones

- based on high-resolution melting analysis. *Microbiol Spectr* 2023;14:11:e0357122. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03571-22>
- Emaneini M, Kalantar-Neyestanaki D, Jabalameli L *et al.* Molecular analysis and antimicrobial resistance pattern of distinct strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Iran. *Iran J Microbiol* 2019;11:98–107.
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe 2021 Data*. Stockholm: ECDC, 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2021-data>. (3 June 2023, date last accessed).
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Point Prevalence Survey of Healthcare-associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals 2022–2023*. Stockholm: ECDC, 2024. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/healthcare-associated-point-prevalence-survey-acute-care-hospitals-2022-2023.pdf> (15 Decmber 2024, date last accessed).
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0*; 2023. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints. (3 June 2023, date last accessed).
- Feuer L, Frenzer SK, Merle R *et al.* Prevalence of MRSA in canine and feline clinical samples from one-third of veterinary practices in Germany from 2019–2021. *J Antimicrob Chemother* 2024;79:2273–80. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac225>
- Freitas AL, Barth AL. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. *Braz J Med Biol Res* 2004;37:77–82. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X20040001100011>
- Hadadi-Fishani M, Khaledi A, Fatemi-Nasab ZS. Correlation between biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis. *Infez Med* 2020;28:47–54.
- Hafiane A, Ravaoarino M. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients by different typing methods. *Pathol Biol (Paris)* 2011;59. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.06.002>
- Hematzadeh A, Haghkhah M. Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR. *Heliyon* 2021;7. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07967>
- Iacchini S, Pezzotti P, Caramia A *et al.* AR-ISS: sorveglianza Nazionale Dell'Antibiotico-Resistenza. Dati 2021. Roma: Istituto Superiore di Sanità, 2022. (Rapporti ISS Sorveglianza RIS-1/2022). https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/RIS-1_2022.pdf. (3 June 2023, date last accessed).
- International Standards Organization. *ISO 18593:2004: Horizontal Methods for Sampling Techniques from Surfaces Using Contact Plates and Swabs*. 2004. <https://dgn.isolutions.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:18593:ed-1:en> (27 June 2022, date last accessed).
- Karami P, Mohajeri P, Yousefi Mashouf R *et al.* Molecular characterization of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Saudi J Biol Sci* 2019;26:1731–6. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.07.009>
- Karampatakis T, Tsergouli K, Roilides E. Infection control measures against multidrug-resistant gram-negative bacteria in children and neonates. *Future Microbiol* 2023;18:751–65. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0072>
- Kidd TJ, Grimwood K, Ramsay KA *et al.* Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2011;49:263–8. <https://doi.org/10.1128/JCM.01421-10>
- Kotay SM, Donlan RM, Ganim C *et al.* Droplet- rather than aerosol-mediated dispersion is the primary mechanism of bacterial transmission from contaminated hand-washing sink traps. *Appl Environ Microb* 2019;85:e01997–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01997-18>
- Liao C, Huang X, Wang Q *et al.* Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Front Cell Infect Microbiol* 2022;12:926758. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.926758>
- Magalhães B, Valot B, Abdelbary MMH *et al.* Combining standard molecular typing and whole genome sequencing to investigate *Pseudomonas aeruginosa* epidemiology in Intensive Care units. *Front Public Health* 2020;8:3. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00003>
- Mancuso G, De Gaetano S, Midiri A *et al.* The challenge of overcoming antibiotic resistance in carbapenem-resistant gram-negative bacteria: “Attack on Titan”. *Microorganisms* 2023;11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081912>
- Maroui I, Barguigua A, Aboulkacem A *et al.* Clonal analysis of clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Meknes Region, Morocco. *Pol J Microbiol* 2017;66:397–400. <https://doi.org/10.5604/01.3001.0010.4882>
- Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2018;58:428–39. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>
- Mellace M, Ceniti C, Paonessa M *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: an underestimated pathogen in veterinary medicine in Italy. *Ger J Vet Res* 2024;4:112–26. <https://doi.org/10.51585/gjvr.2024.2.0089>
- Miller WR, Arias CA. ESKAPE pathogens: antimicrobial resistance, epidemiology, clinical impact and therapeutics. *Nat Rev Micro* 2024;22:598–616. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01054-w>
- Mokhtari A, Amini K. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains as a multidrug resistant (MDR) bacterium and evaluating the prevalence of Esbls and some virulence factors encoding genes by PFGE and ERIC-PCR methods. *Iran J Pharm Res* 2019;18:1580–94. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100762>
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation survival and persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa-Camacho F *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animal with high virulence genes content and highly sensitive to antimicrobials. *J Glob Antimicrob Resist* 2024;37:75–80. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.02.023>
- Motevasel M, Haghkhah M, Azimzadeh N. Phylogenetic aspects of antibiotic resistance and biofilm formation of *P. aeruginosa* isolated from clinical samples. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2024;2024:6213873. <https://doi.org/10.1155/2024/6213873>
- Nageeb W, Amin DH, Mohammedsah ZM *et al.* Novel molecular markers linked to *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antibiotics* 2021;10. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010035>
- Neoh HM, Tan XE, Sapri HF *et al.* Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): a review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol* 2019;74:103935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103935>
- Orsi GB, Villari P, Mondillo V *et al.* A plasma expander-related *Pseudomonas aeruginosa* outbreak. *Scand J Infect Dis* 2006;38:1085–8. <https://doi.org/10.1080/00365540600794402>
- Peng Y, Bi J, Shi J *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections pose growing threat to health care-associated infection control in the hospitals of Southern China: a case-control surveillance study. *Am J Infect Control* 2014;42:1308–11. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.08.006>
- Pirzadian J, Voor In 't Holt AF, Hossain M *et al.* Limiting spread of VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa* from colonized sink drains in a tertiary care hospital: a before-and-after study. *PLoS One* 2023;18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282090>
- Prospero E, Barbadoro P, Savini S *et al.* Cluster of *Pseudomonas aeruginosa* catheter-related bloodstream infections traced to contaminated multidose heparinized saline solutions in a medical ward. *Int J Hyg Environ Health* 2006;209:553–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2006.05.002>
- Rakshit P, Nagpal N, Sharma S *et al.* Effects of implementation of healthcare associated infection surveillance and interventional measures in the neonatal intensive care unit: small steps matter. *Indian*

- J Med Microbiol* 2023;**44**:100369. <https://doi.org/10.1016/j.jmmmb.2023.100369>
- Rello J, Kalwaje Eshwara V, Lagunes L *et al.* A global priority list of the TOP TEN resistant microorganisms (TOTEM) study at intensive care: a prioritization exercise based on multi-criteria decision analysis *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;**38**:319–23. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3428-y>
- Saitou K, Furuhashi K, Fukuyama M. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cockroaches and human urine. *J Infect Chemother* 2010;**16**:317–21. <https://doi.org/10.1007/s10156-010-0055-7>
- Sammarco ML, Ripabelli G, Tamburro M. Epidemiologia molecolare delle malattie infettive: metodi di analisi ed interpretazione dei risultati [Molecular epidemiology of infectious diseases: analytical methods and results interpretation]. *Ann Ig* 2014;**26**:10–45. <https://doi.org/10.7416/ai.2014.1956>
- Sawa T, Momiyama K, Mihara T *et al.* Molecular epidemiology of clinically high-risk *Pseudomonas aeruginosa* strains: practical overview. *Microbiol Immunol* 2020;**64**:331–44. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12776>
- Selim S, El Kholy I, Hagagy N *et al.* Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2015;**29**:152–6. <https://doi.org/10.1080/13102818.2014.981065>
- Soliman EA, Saad A, Abd El Tawab AA *et al.* Exploring AMR and virulence in *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans and pet animals: a complement of phenotype by WGS-derived profiles in a One Health study in Egypt. *One Health* 2024;**19**:100904. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100904>
- Spagnolo A, Orlando P, Perdelli F *et al.* Hospital water and prevention of waterborne infections. *Rev Med Microbiol* 2015;**27**:1.
- Spagnolo AM, Sartini M, Cristina ML. *Pseudomonas aeruginosa* in the healthcare facility setting. *Rev Med Microbiol* 2021;**32**:169–75. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000271>
- Stehling EG, Leite DS, Silveira WD. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. *Braz J Infect Dis* 2010;**14**:462–7. [https://doi.org/10.1016/S1413-8670\(10\)70094-5](https://doi.org/10.1016/S1413-8670(10)70094-5)
- Tassios PT, Gennimata V, Maniatis AN *et al.* Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. The Greek *Pseudomonas Aeruginosa* Study Group. *J Clin Microbiol* 1998;**36**:897–901. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.4.897-901.1998>
- Wang Q, Zhang F, Wang Z *et al.* Evaluation of the E-test and disk diffusion method for detection of the activity of ceftazidime-avibactam against enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in China. *BMC Microbiol* 2020;**20**:187. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01870-z>
- Wood SJ, Kuzel TM, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa*: infections animal modeling and therapeutics. *Cells* 2023;**12**. <https://doi.org/10.3390/cells12010199>
- World Health Organization. WHO Bacterial Priority Pathogens List 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. 2024. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> (9 October 2024, date last accessed).
- World Health Organization. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (15 December 2024, date last accessed).

6.1.1 Caratterizzazione mediante MLST

Nell'articolo sopra riportato, è assente l'analisi dei ceppi di *P. aeruginosa* mediante MLST, di seguito descritta. Sono stati identificati 10 diversi ST identificati tra i 33 ceppi esaminati (potere discriminante D=0,85) (Tabella 10). ST309 (n=7; 21,2%), ST895 (n=7; 21,2%) e ST446 (n=4; 12,1%), caratterizzati rispettivamente dalla combinazione allelica 13-8-9-3-1-17-15, 11-5-1-11-3-4-7 e 18-4-5-3-1-17-13, sono risultati tra i più rappresentati.

Inoltre, sono stati identificati ST253 e ST274 (n=3; 9,1% ciascuno), seguiti da ST1248, ST111, ST235, ST296 (n=2; 6,1% ciascuno) e ST207 (n=1; 3,0%). In particolare, ST253 è stato isolato esclusivamente da campioni clinici provenienti da reparti differenti (urologia, riabilitazione e chirurgia vascolare), mentre ST274 è stato rilevato sia in UTI sia in più punti della rete idrica della TIN. ST1248 è stato relativo solo a isolati dalla TIN, in campioni clinici e ambientali, mentre ST296 è stato identificato in isolati da ortopedia e cardiologia.

Per quanto riguarda la distribuzione temporale, gli ST hanno mostrato pattern distinti: ST309 è stato rilevato esclusivamente il 21 luglio 2022, ST895 è stato invece identificato in modo continuativo tra il 18 luglio e il 14 agosto 2022, mentre ST446 è stato isolato dal 2 luglio al 12 agosto 2022, sia in campioni clinici sia ambientali. Gli altri ST si riferiscono a finestre temporali più ristrette (ST253 tra luglio e agosto, ST111 a luglio, ST296 ad agosto, mentre ST1248, ST274, ST235 e ST207 sono stati rilevati in date isolate nel mese di agosto).

Tabella 10. ST identificati e pulsotipi di PFGE nei ceppi di *P. aeruginosa*.

Ceppi	Sede prelievo	Reparto	ST	Pulsotipo	Cluster
PaH1	Urinocoltura da CV	Urologia	253	13	10
PaH2	Tampone auricolare	TIN	446	11	8
PaH3	Urinocoltura	Nefrologia	111	25	20
PaH4	Emocoltura da CVC	UTI	895	25	20
PaH5	Urinocoltura da CV	Malattie infettive	111	29	24
PaH6	Broncoaspirato	UTI	446	12	9
PaH7	Ferita	Ortopedia	895	4	4
PaH8	Ulcera	Pronto Soccorso	895	2	2
PaH9	Urinocoltura	Riabilitazione	253	14	11
PaH10	Urinocoltura	Medicina	895	3	3
PaH11	Deiscenza	Chirurgia vascolare	253	24	19
PaH12	Tampone nasale	TIN	1248	18	15
PaH13	Catetere ombelicale	TIN	895	10	7

PaH14	Broncoaspirato	UTI	895	27	22
PaH15	Tampone oculare	TIN	1248	18	15
PaH16	CVC	Medicina	895	7	6
PaH17	Urinocoltura da CV	Cardiologia	296	17	14
PaH18	Ferita chirurgica	Ortopedia	296	22	17
PaH19	Broncoaspirato	UTI	274	26	21
PaE1	Sifone lavandino	Sala parto	309	19	15
PaE2	Rubinetto	TIN	309	20	16
PaE5	Sifone lavandino	Sala parto	309	21	16
PaE7	Lavandino	TIN	309	8	6
PaE8	Sifone lavandino	Sala parto	207	28	23
PaE9	Lavandino	TIN	309	15	12
PaE12	Fasciatoio	TIN	309	31	26
PaE13	Lavandino	Sala parto	309	30	25
PaE14	Filtro rubinetto	TIN	274	23	18
PaE15	Scarico lavandino	TIN	235	1	1
PaE16	Scarico lavandino	TIN	235	6	6
PaE17	Scarico lavandino	TIN	446	16	13
PaE18	Scarico lavandino	TIN	446	5	5
PaE19	Sifone lavandino	TIN	274	9	7

6.2 *E. faecium*

I risultati dello studio relativo ai ceppi di *E. faecium* sono riportati nel lavoro di seguito allegato:
Lombardi A, Ripabelli G, Sammarco ML, Tamburro M. *Enterococcus faecium* as an Emerging Pathogen: Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance in Clinical Strains. *Pathogens*. 2025;14(5):483. doi:10.3390/pathogens14050483.

Article

Enterococcus faecium as an Emerging Pathogen: Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance in Clinical Strains

Adele Lombardi, Giancarlo Ripabelli * , Michela Lucia Sammarco and Manuela Tamburro

Department of Medicine and Health Sciences “Vincenzo Tiberio”, University of Molise, 86100 Campobasso, Italy; adelelombardi95@gmail.com (A.L.); sammarco@unimol.it (M.L.S.); manuela.tamburro@unimol.it (M.T.)

* Correspondence: ripab@unimol.it; Tel.: +39-0874404473

Abstract: Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* represents an emerging threat in health-care settings. The aim of this study was to investigate biomolecular characteristics of 31 *E. faecium* isolates from patients in two hospitals of Molise region, central Italy. Particularly, antimicrobial resistance profiles and prevalence of resistance and virulence genes were analyzed, as well as the clonal relationships and sequence types (STs). Antimicrobial susceptibility and genes associated with resistance and virulence were evaluated using automated system and PCR assays, respectively. *SmaI*-based pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing were performed following standardized protocols. All strains exhibited resistance to vancomycin and teicoplanin, and high rates were detected for other antibiotics, except for linezolid. PFGE identified 18 clusters and 26 pulsotypes (Simpson’s index, 0.98). ST80, ST1478, and ST2164 were identified, with ST80 as the most frequent (77.4%). The resistance genes *vanA*, *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia*, *aph(3′)-IIIa*, and *ermB* were detected in 90.3%, 93.6%, 93.6%, and 90.3% of the strains, respectively, while the *esp* gene was prevalent (61.3%) amongst virulence genes. The study findings highlight the predominance of multidrug-resistant clones and virulence determinants among *E. faecium* strains circulating in the regional hospitals, reinforcing the urgency of implementing targeted molecular surveillance and robust antimicrobial stewardship strategies to contain their spread.

Keywords: enterococci; multilocus sequence typing; pulsed-field gel electrophoresis; resistance genes; vancomycin resistance; virulence factors



Academic Editor: Valentina Virginia Ebani

Received: 29 April 2025

Accepted: 13 May 2025

Published: 15 May 2025

Citation: Lombardi, A.; Ripabelli, G.; Sammarco, M.L.; Tamburro, M.

Enterococcus faecium as an Emerging Pathogen: Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance in Clinical Strains. *Pathogens* **2025**, *14*, 483. <https://doi.org/10.3390/pathogens14050483>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The rise of antimicrobial resistance among vancomycin-resistant enterococci (VRE), particularly in vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VREfm), has become a critical public health threat worldwide [1]. In recent years, a significant increase in resistance rates in VREfm was reported, primarily driven by high recombination capacity and extensive horizontal gene transfer mechanisms [2,3]. Indeed, the World Health Organization (WHO) has listed VREfm as one of the high-priority pathogens, underlining the urgent need for the development of new antibiotics and the critical importance of effective infection control measures and containment strategies to limit its spread in healthcare settings [4,5].

According to the latest European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) report (2024) [6], *Enterococcus* spp. remains a major contributor to healthcare-associated infections (HAIs) in Europe, with *E. faecium* being the second most isolated species among VRE pathogens in hospital settings, preceded only by *Enterococcus faecalis*. In the 2022–2023 Point Prevalence Survey of HAIs and antimicrobial use in European hospitals, *Enterococcus*

spp. was identified in 10.0% of HAI cases, following *Escherichia coli* (12.7%) and *Klebsiella* spp. (11.7%), and more frequently than *Staphylococcus aureus* (9.0%) [6]. Furthermore, VREfm was responsible of 9.6% of HAI cases in Italy (European Centre for Disease Prevention and Control, 2024), contributing to significant morbidity and mortality, particularly among immunocompromised, elderly, and paediatric patients [7,8].

Current data from the Italian National Institute of Health indicate that the overall prevalence of VREfm in invasive infections significantly increased in Europe, with resistance rates towards vancomycin rising from 10.2% in 2015 to 32.5% in 2023 and those related to teicoplanin reaching 31.9% in 2023 [9]. These data highlight the growing difficulty in managing VREfm infections due to their increasing resistance not only to vancomycin but towards other critical antibiotics, including ampicillin (89.7%) and high-dose aminoglycosides (63.5% for streptomycin and 56.6% for gentamicin) [9]. This is of concern because multidrug resistance severely limits treatment options for invasive enterococcal infections, further complicating patient management.

Although vancomycin resistance genes (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanM*, and *vanL*) have been identified, the most common in VREfm are *vanA* associated with resistance to both vancomycin and teicoplanin, and *vanB* contributing to resistance to vancomycin but not teicoplanin [10]. These predominant genes are carried by mobile genetic elements, such as the transposons Tn1546 and Tn1549/Tn5382, associated with *vanA* and *vanB*, respectively [11].

In addition to vancomycin resistance, VREfm shows significant resistance to β -lactam antibiotics, particularly to ampicillin [12], which is mainly attributed to the overproduction of low-affinity penicillin-binding protein 5 (PBP5) and/or to mutations in the β -subunit of this protein that catalyzes the cross-linking of peptidoglycan during cell wall synthesis [13,14]. Furthermore, the acquisition of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), such as *aph*, *aac*, and *ant*, plays a key role in high-level aminoglycoside resistance [15]. High-level gentamicin resistance in Enterococci is primarily associated with the acquisition of the *aac* (6')-Ie-*aph* (2'')-Ia, *aph* (3')-IIIa, and *ant* (3'')-III genes through plasmid-mediated transfer [16]. In addition, *ermB* (erythromycin ribosome methylase), which methylates the bacterial 23S rRNA, is a major contributor to erythromycin resistance [17].

Virulence factors have been also identified in VREfm and are involved in various stages of infection, including aggregation substance (*asa1*) facilitating bacterial adhesion and biofilm formation, gelatinase (*gelE*) degrading extracellular matrix proteins to promote tissue invasion, enterococcal surface protein (*esp*) enhancing colonization and immune evasion, and adhesin to collagen (*ace*) enabling attachment and bacterial dissemination [18].

Since VREfm is one of the most frequently isolated pathogens in nosocomial settings, rapid identification of outbreaks caused by multidrug-resistant (MDR) strains through molecular epidemiological approaches is essential for an effective control [19]. Recent studies emphasize the utility of whole genome sequencing (WGS), providing early detection and enabling prompt response to outbreaks [20]. However, challenges, including data complexity, high costs, and the resolution of highly similar strains, hamper widespread implementation. Nonetheless, molecular methods, such as polymerase chain reaction (PCR) to detect resistance genes, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for DNA fingerprinting, and multilocus sequence typing (MLST) for evaluating genetic relationships among isolates, continue to play an important role in epidemiological investigations, offering valuable insights into transmission dynamics [19,21].

In this context, the present study aims to characterize *E. faecium* isolated from two hospitals in the Molise region, central Italy, through the investigation of resistance phenotypes to vancomycin, teicoplanin, and other antibiotics; the prevalence of resistance and

virulence-associated genes; and clonal relationships between isolates and circulating sequence types (STs).

2. Materials and Methods

2.1. Strain Selection and Antimicrobial Susceptibility Testing

Thirty-one clinical VREfm isolated between November 2022 and February 2024 were analyzed, with twenty-six (84%) and five (16%) collected from hub and spoke hospitals, respectively.

The isolates were collected through a surveillance system active in the hospital to detect, in a timely manner, the “alert organisms” among hospitalized patients, particularly MDR bacteria, in order to adopt effective containment strategies. The inclusion criteria for strain selection included the isolation from clinical samples collected for diagnostic or surveillance purposes; *E. faecium* species confirmation and antimicrobial susceptibility profile performed by the Microbiology Laboratory of hub hospital during routine diagnostic procedures, using the Phoenix Automated Microbiology System (BD Italy, Milan, Italy) instrument; and non-replicated cultures.

Demographic and clinical data of patients were completely anonymous and were obtained from clinical records and standardized microbiological data sheets. Information included patient age, sex, hospital ward, and sample source, along with laboratory findings such as detailed antimicrobial susceptibility and notes on “alert organisms”.

VREfm strains collected at the hospitals were regenerated at the laboratory of the Chair of Hygiene, University of Molise, on Tryptic Soy Agar (Biolife, Milan, Italy) and incubated at 37 °C overnight.

Susceptibility towards vancomycin and teicoplanin was tested for all strains. For nine strains, the following antibiotics were also tested: ampicillin, fusidic acid, clindamycin, cefoxitin, ceftaroline, erythromycin, gentamicin, imipenem, linezolid, and trimethoprim-sulfamethoxazole. Ciprofloxacin was tested for six strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) was interpreted according to the latest threshold or breakpoint values established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [22].

2.2. Molecular Typing

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of *SmaI*-digested (Promega Corporation, Milan, Italy) bacterial DNA was carried out to examine the relatedness among the isolates, based on the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) standardized protocol [23], with modifications of pulse time from 5 to 40 s over 24 h and at 14 °C. Interpretation of restriction patterns was performed by analyzing the dendrogram generated through the UPGMA algorithm and Dice coefficient (BioNumerics software version 5.10, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium).

Furthermore, a validated multilocus sequence typing (MLST) scheme was used [24] to identify allelic profiles and assign the ST. Hence, seven housekeeping genes were amplified by PCR and further sequenced (Eurofins Genomics, Europe Shared Services GmbH, Ebersberg, Germany): *atpA* (ATP synthase alpha subunit), *ddl* (*d*-alanine:*d*-alanine ligase), *gdh* (glucose-6-phosphate dehydrogenase), *purK* (phosphoribosylaminoimidazol carboxylase ATPase subunit), *gyd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), *pstS* (phosphate ATP-binding cassette transporter), and *adk* (adenylate kinase). The allelic combination was analyzed on the PubMLST platform (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium>, accessed on 5 March 2025).

2.3. Detection of Resistance-Associated and Virulence Genes

Total DNA from 31 VREfm strains was extracted using Maxwell[®] 16 Cell DNA Purification Kit (Promega Corporation, Milan, Italy), according to the manufacturer's instructions, for the following applications.

The presence of resistance genes was investigated using single PCR assays, including *vanA* and *vanB* (vancomycin resistance) [25], *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa* and *ant(3'')-III* (aminoglycoside resistance) [26], *ermB* (macrolide resistance) [27], and *pbp5* (ampicillin resistance) [28]. Through PCRs, the virulence genes *esp* (enterococcus surface protein) [29], *asa1* (aggregation substance) [30], *ace* (adhesion to collagen of enterococcus) [26], and *gelE* (gelatinase E) [26] were detected.

Amplifications were performed in a 25 µL final volume with 2.5 µL of DNA template, 1X PCR Master Mix (Promega Corporation), and 0.5–1 µM of each primer. Amplification conditions were as follows: initial denaturation at 94 °C for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation (94 °C/1 min), annealing (50 °C/45 s for *vanA*; 55 °C/45 s for *vanB*; 51 °C/1 min for *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*; 54 °C for 1 min for *aph(3')-IIIa*; 53 °C/1 min for *ant(3'')-III*, *ermB*; 48 °C/1 min for *pbp5*; 50 °C/1 min for *asa1*; 52 °C/1 min for *ace*; 48 °C/1 min for *gelE*), and extension at 72 °C/1 min, with final extension cycle (72 °C/7 min). Amplified genes were revealed on a 1.0–1.5% agarose gel electrophoresis, using a 100 bp DNA ladder (Promega) and visualized under UV transillumination (UVITEC Cambridge, Fire Reader). Negative and positive controls were included in each PCR assay.

3. Results

3.1. Characteristics of Strains and Patients and Antimicrobial Resistance Profiles

In this study, clinical *E. faecium* strains were isolated from patients with an average age of 63 ± 22 years (median 69 years; range 0–90) mostly hospitalized in ICUs (n = 22, 70.9%). The isolates were mainly from males (n = 20, 64.5%) and rectal swab (n = 22, 71.0%), followed by urine (n = 4, 12.9%) and blood culture (n = 3, 9.7%) (Table 1).

Overall, all 31 strains tested for teicoplanin and vancomycin were resistant (100%). Furthermore, all nine isolates tested for fusidic acid, clindamycin, ceftazidime, ceftaroline, erythromycin, gentamicin, imipenem, and trimethoprim-sulfamethoxazole exhibited resistance (100%). In addition, seven out of nine (77.8%) and five of six strains (83.3%) tested for ampicillin and ciprofloxacin, respectively, were resistant. Conversely, eight out of nine strains (88.9%) tested for linezolid showed susceptibility.

The *E. faecium* isolates exhibited highly similar multidrug resistance profiles, which were classified into five distinct resistotypes (R1–R5), reflecting consistent patterns of antimicrobial resistance.

The most prevalent was the resistotype R1, accounting for 22 strains (70.9%), all exhibiting resistance to teicoplanin and vancomycin (strains: VREfm 26, 45, 52, 56, 58, 71, 72, 74, 78, 84, 86, 92, 133, 145, 147, 150, 189, 328, 392, 425, 426, 440) and isolated from rectal swab. The resistotype R3 was identified in four strains (16.1%), showing resistance to ampicillin, fusidic acid, ciprofloxacin, clindamycin, ceftazidime, ceftaroline, erythromycin, gentamicin, imipenem, teicoplanin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin. The strains demonstrated susceptibility to linezolid (strains: VREfm 63, 91, 95, 143) and were isolated from bladder catheter (n = 2, 50.0%), abdominal fluid culture (n = 1, 25.0%), and orotracheal culture (n = 1, 25.0%).

The resistotype R5 was related to three strains (9.7%), with resistance towards ampicillin, fusidic acid, clindamycin, ceftazidime, ceftaroline, erythromycin, gentamicin, imipenem, teicoplanin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin (strains: VREfm 204, 269, 410), and it was collected from blood culture (n = 2, 66.7%), and bladder catheter (n = 1, 33.3%). The resistotype R4 was linked to one strain (3.2%) from bladder catheter, exhibiting

resistance to fusidic acid, ciprofloxacin, clindamycin, ceftazidime, erythromycin, gentamicin, imipenem, teicoplanin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin and demonstrating susceptibility to both linezolid and ampicillin (strain: VREfm 348). Similarly, the resistotype R2 was observed in one strain (3.2%) from bladder catheter, displaying resistance to fusidic acid, clindamycin, ceftazidime, erythromycin, gentamicin, imipenem, linezolid, teicoplanin, trimethoprim-sulfamethoxazole, and vancomycin and susceptibility to ampicillin and ciprofloxacin (strain: VREfm 12).

Table 1. List of *E. faecium* strains included in the study, with demographic characteristics (age, sex) of patients and clinical data (ward, hospital type, sample source, and collection date between November 2022 and February 2024).

Strains	Ward	Hospital	Age	Sex	Sample	Collection Date
VREfm 12	ICU	Hub	70	M	Bladder catheter	November 2022
VREfm 26	ICU	Hub	53	M	Rectal swab	November 2022
VREfm 45	ICU	Hub	82	M	Rectal swab	February 2023
VREfm 52	ICU	Spoke	78	F	Rectal swab	February 2023
VREfm 56	ICU	Hub	49	M	Rectal swab	February 2023
VREfm 58	ICU	Spoke	69	F	Rectal swab	February 2023
VREfm 63	Urology	Hub	59	M	Abdominal fluid culture	February 2023
VREfm 71	ICU	Spoke	90	M	Rectal swab	February 2023
VREfm 72	ICU	Hub	67	M	Rectal swab	February 2023
VREfm 74	ICU	Spoke	74	M	Rectal swab	February 2023
VREfm 78	ICU	Hub	41	F	Rectal swab	March 2023
VREfm 84	ICU	Hub	75	F	Rectal swab	March 2023
VREfm 86	ICU	Hub	53	M	Rectal swab	March 2023
VREfm 91	ICU	Hub	41	F	Bladder catheter	March 2023
VREfm 92	ICU	Spoke	64	M	Rectal swab	March 2023
VREfm 95	ICU	Hub	41	F	Bladder catheter	March 2023
VREfm 133	ICU	Hub	80	M	Rectal swab	April 2023
VREfm 143	NICU	Hub	1	F	Orotracheal culture	May 2023
VREfm 145	Medicine	Hub	82	M	Rectal swab	May 2023
VREfm 147	Medicine	Hub	72	M	Rectal swab	May 2023
VREfm 150	Surgery	Hub	74	M	Rectal swab	May 2023
VREfm 189	Medicine	Hub	49	M	Rectal swab	June 2023
VREfm 204	Medicine	Hub	79	F	Blood culture	July 2023
VREfm 269	NICU	Hub	0	F	Blood culture	August 2023
VREfm 328	ICU	Hub	67	M	Rectal swab	November 2023
VREfm 348	ICU	Hub	69	M	Bladder catheter	November 2023
VREfm 392	ICU	Hub	69	M	Rectal swab	December 2023
VREfm 410	Medicine	Hub	89	F	Blood culture	January 2024
VREfm 425	ICU	Hub	83	M	Rectal swab	February 2024
VREfm 426	ICU	Hub	83	F	Rectal swab	February 2024
VREfm 440	ICU	Hub	83	M	Rectal swab	February 2024

3.2. PFGE Analysis

PFGE revealed 18 clusters at 80% similarity level (Figure 1), with clusters 14, 3, and 12 as the most prevalent.

Cluster 14 included five strains (VREfm 425, 426, 328, 348, 410) mainly isolated from ICUs (80.0%) in different periods (VREfm 425 and VREfm 426 in February 2024; VREfm 328 and 348 in November 2023; VREfm 410 in January 2024) and mainly isolated from rectal swab ($n = 3$, 60%) followed by bladder catheter ($n = 1$; 20%) and blood culture ($n = 1$, 20%) (Figure 1). Cluster 3 grouped four strains (VREfm 45, 52, 56, 58) all isolated from rectal swab in February 2023 from ICUs and spoke hospitals (50%, respectively). Cluster 12 included three isolates (VREfm 143, 84, 145) from neonatal intensive care units (NICUs), ICUs, and internal medicine departments, reported in the period of March-May 2023 and isolated from rectal swab ($n = 2$, 66.7%) and oro-tracheal culture ($n = 1$, 33.3%).

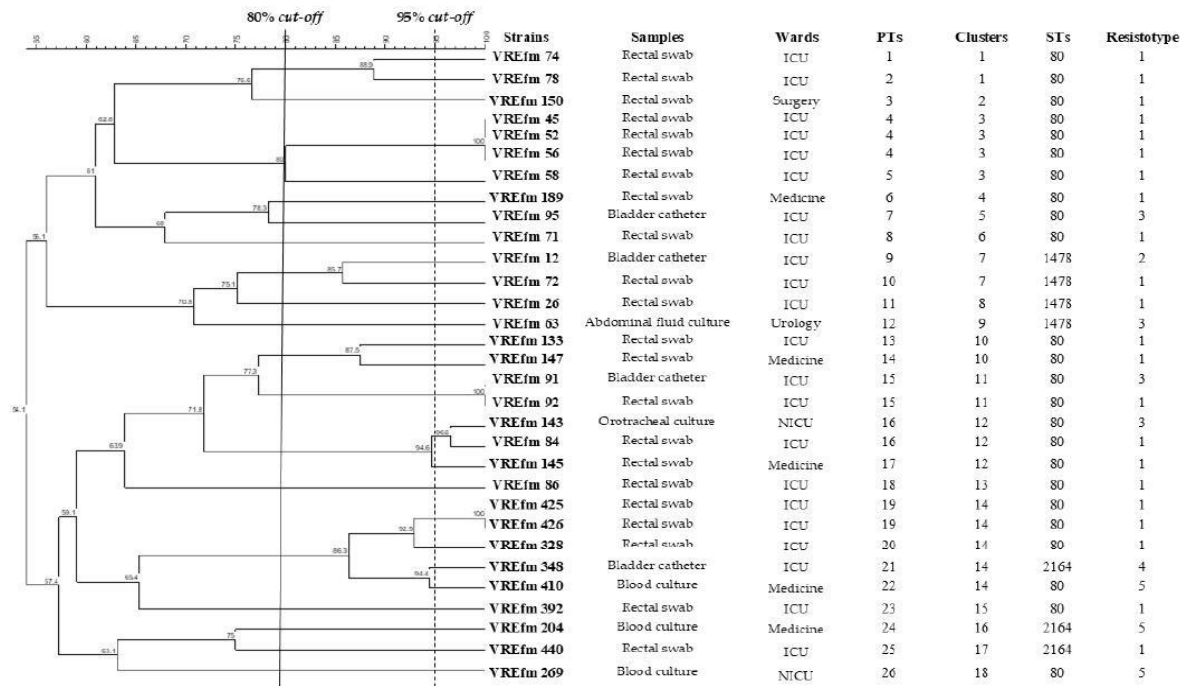


Figure 1. SmaI-based dendrogram for 31 *E. faecium* isolates, including type of samples, wards, PTs, clusters, STs, and resistotypes.

Twenty-six pulsotypes (PT1–PT26) were observed at 95% cut-off, and Simpson’s index was 0.98. The most prevalent was PT4, related to three strains (VREfm45, 52, and 56), all isolated from the same type of sample (rectal swab) in the same period from ICUs and spoke hospitals. PT15, PT16, and PT19 were each associated with two strains (VREfm 91 and 92; VREfm143 and 84; VREfm425 and 426, respectively) predominantly isolated from rectal swab (n = 4, 66.7%) and from bladder catheter (n = 1) and orotracheal culture (n = 1), (16.7% each) (Figure 1).

3.3. Typing by MLST

MLST analysis revealed only three STs (Table 2), and Simpson’s index was 0.39. ST80 with the allelic combination 9-1-1-1-12-1-1 was the most prevalent (n = 24, 77.4%), predominantly isolated from rectal swabs (n = 19, 79.2%), followed by *pstS*-null ST1478 (allelic combination 9-1-1-1-1-0-1) (n = 4, 12.9%), isolated from rectal swab (n = 2, 50.0%), bladder catheter (n = 1, 25.0%), and abdominal fluid culture (n = 1, 25.0%) and ST2164 (allelic combination 9-141-1-1-12-1-1) (n = 3, 9.68%) amongst strains from bladder catheter (n = 1, 33.3%), rectal swab (n = 1, 33.3%), and blood culture (n = 1, 33.3%). Concerning the isolation time of strains, ST1478 and ST2164 were detected at opposite ends of the isolation period, since ST1478 was identified in isolates from November 2022 to February 2023, while ST2164 emerged in strains from July 2023 to February 2024. In contrast, ST80 was consistently present throughout nearly the entire year analyzed, from February 2023 to February 2024.

Table 3 summarizes the correspondence between STs and the PTs identified for each strain. Notably, ST80 exhibited a high degree of heterogeneity, being distributed across 19 different PTs. In contrast, the less prevalent ST1478 and ST2164 were each associated with four and three distinct PTs, respectively.

Table 2. Allelic designation for *atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *pstS*, and *adk* genes in the MLST scheme and sequence type (ST) identification among 31 *E. faecium* strains, including sample type and ward.

Strains	Sample	Ward	<i>atpA</i> Allele	<i>ddl</i> Allele	<i>gdh</i> Allele	<i>PurK</i> Allele	<i>gyd</i> Allele	<i>pstS</i> Allele	<i>adk</i> Allele	ST
VREfm 12	Bladder catheter	ICU	9	1	1	1	1	0	1	1478
VREfm 26	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	1	0	1	1478
VREfm 45	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 52	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 56	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 58	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 63	Abdominal fluid culture	Urology	9	1	1	1	1	0	1	1478
VREfm 71	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 72	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	1	0	1	1478
VREfm 74	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 78	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 84	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 86	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 91	Bladder catheter	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 92	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 95	Bladder catheter	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 133	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 143	Orotracheal culture	NICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 145	Rectal swab	Medicine	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 147	Rectal swab	Medicine	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 150	Rectal swab	Surgery	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 189	Rectal swab	Medicine	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 204	Blood culture	Medicine	9	141	1	1	12	1	1	2164
VREfm 269	Blood culture	NICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 328	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 348	Bladder catheter	ICU	9	141	1	1	12	1	1	2164
3.3VREfm 392	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 410	Blood culture	Medicine	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 425	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 426	Rectal swab	ICU	9	1	1	1	12	1	1	80
VREfm 440	Rectal swab	ICU	9	141	1	1	12	1	1	2164

Table 3. Correspondence between sequence types (STs) and pulsotypes (PTs) among 31 *Enterococcus faecium* isolates, including the number of strains belonging to each PT.

STs	PTs	Strains	N. of Strains
ST80 (identified for 24 strains)	1	VREfm 74	1
	2	VREfm 78	1
	3	VREfm 150	1

Table 3. Cont.

STs	PTs	Strains	N. of Strains
ST80 (identified for 24 strains)	4	VREfm 45, VREfm 52, VREfm 56	3
	5	VREfm 58	1
	6	VREfm 189	1
	7	VREfm 95	1
	8	VREfm 71	1
	13	VREfm 133	1
	14	VREfm 147	1
	15	VREfm 91, VREfm 92	2
	16	VREfm 143, VREfm 84	2
	17	VREfm 145	1
	18	VREfm 86	1
	19	VREfm 425, VREfm 426	2
	20	VREfm 328	1
	22	VREfm 410	1
	23	VREfm 392	1
	26	VREfm 269	1
ST1478 (identified for 4 strains)	9	VREfm 12	1
	10	VREfm 72	1
	11	VREfm 26	1
	12	VREfm 63	1
ST2164 (identified for 3 strains)	21	VREfm 348	1
	24	VREfm 204	1
	25	VREfm 440	1

3.4. Prevalence of Resistance and Virulence-Associated Genes

A total of 28 (90.3%) out of the 31 *E. faecium* strains carried *vanA*, while *vanB* was not detected.

The genes associated with aminoglycoside resistance, including *aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia* and *aph(3′)-IIIa*, were observed in 93.6% of the isolates (n = 29), and *ermB* was present in 90.3% (n = 28). None of the strains harbored *ant(3′′)-III* or *pbp5*.

Amongst virulence genes, *esp* was identified in a high proportion of isolates (61.3%, n = 19), while *asa1*, *ace*, and *gelE* genes were found in one strain (VREfm 91).

4. Discussion

The present study highlights the prevalence of VREfm strains in hospitalized patients in the Molise region, central Italy, providing valuable insights into molecular characteristics and antimicrobial resistance patterns.

The phenotypic profile of the strains strongly correlated with clinical risk factors, particularly patient age and ICU admission, as reported in a recent study [31]. A significant proportion (65%) of isolates were from elderly patients, a demographic population group often associated with increased susceptibility to infections due to underlying health conditions and prolonged hospitalization [32]. Additionally, most isolates were from ICUs, where the combination of invasive procedures, antibiotic pressure, and critical patient conditions create a favorable environment for the emergence and dissemination of MDR pathogens [33].

Of note, the predominance of rectal swabs as the primary sample source suggests that gastrointestinal colonization must be accurately evaluated, being critical for the dissemination of *E. faecium* [34]. This finding underscores the need for rigorous screening to prevent the spread of resistant strains, particularly in ICUs where vulnerable patients are at greater risk [35].

The resistance to vancomycin and teicoplanin observed in all isolates is consistent with data from the Antimicrobial Resistance Surveillance Network from the Italian Institute of Health [9], highlighting a high prevalence of vancomycin and teicoplanin resistance, 32.5% and 31.9% respectively, among *E. faecium* isolates in Italy during 2023. Considering the most recent European data, Italy ranked among the countries with the highest resistance rates (40.0%) for *E. faecium* in Europe, following Greece (72.2%) and Lithuania (73.3%). This underscores the urgent need for robust antimicrobial stewardship programs in Italian healthcare facilities.

The resistance was mainly mediated by the *vanA* gene, although the possible involvement of alternative mechanisms could be related to VREfm isolates lacking this gene. These may include the presence of genes in the *van* cluster other than *vanB*, including *vanD*, *vanE*, or *vanG*, which confer glycopeptide resistance [36]; mutations in genes involved in cell wall synthesis and remodeling (*ddl*, *murF*) [37]; as well as intrinsic mechanisms of resistance mediated by efflux pumps [38]. These findings highlight the need for comprehensive genomic analyses to fully elucidate the role of these possible pathways.

Our result is concordant with previous evidence [39], reporting one of the highest prevalence rates of the *vanA* gene among vancomycin resistance determinants. Compared to other resistance-associated genes—such as *vanB*, *vanD*, *vanE*, and *vanG*—*vanA* stands out as the dominant mechanism, further reinforcing its key role in vancomycin resistance in *E. faecium*.

Indeed, the *vanA* gene cluster, often located on the transposon Tn1546, can spread both clonally and horizontally through plasmid dissemination or transposition between genomic locations [40].

In contrast, the *vanB* gene was not observed in our study, as supported by previous reports from Italian hospitals, reporting only sporadic detection of *vanB*-positive strains [41,42], compared to other European countries [43].

The resistance found in all isolates towards fusidanes (fusidic acid), lincosamides (clindamycin), β -lactams (cefoxitin, ceftaroline), macrolides (erythromycin), aminoglycosides (gentamicin), carbapenems (imipenem), and sulfonamides-trimethoprim (trimethoprim-sulfamethoxazole) highlights the multidrug-resistant phenotype which limits effective treatment options. This alarming resistance profile is consistent with a previous study [44] reporting high resistance rates among *E. faecium* isolates in Italy, with 86.7% resistant to imipenem. Similarly, significant resistance patterns were observed in *E. faecium* clinical isolates, especially against ciprofloxacin (70.9%), followed by high-level resistance against gentamicin (39.4%) [45]. The resistance rates for ampicillin (77.8%) and ciprofloxacin (83.3%) are similarly alarming, as these antibiotics are often among the first-line treatments for *E. faecium* infections [46]. Ampicillin resistance is strongly associated with alterations in the *pbp5* gene [47], although our findings did not identify this gene, suggesting that this resistance is probably mediated by alternative mechanisms or genetic determinants. Potential contributing factors include mutations in the *pbp5* gene that alter the structural affinity for β -lactams [48] or mutations in the cell wall synthesis regulatory genes, which can reduce β -lactam affinity, or increased expression of β -lactamases that degrade ampicillin [49].

Further resistance determinants were widely prevalent among the isolates, with *aac(6')Ie-aph(2'')-Ia* and *aph(3')-IIIa* genes reflecting aminoglycoside resistance. The *ermB*

gene, responsible for macrolide resistance, was also commonly detected, corroborating the distinct genetic profile exhibited by these isolates.

The susceptibility to linezolid in most strains offers a viable therapeutic alternative although the emergence of linezolid-resistant *E. faecium* has already been reported in other settings [50].

Concerning the virulence factors, a significant proportion of strains carried the *esp* gene, which has been associated with enhanced colonization and persistence in hospital settings [37]. This result was consistent with other findings reporting high prevalence of this gene in clinical *E. faecium* isolates and related to biofilm formation, persistence, and transmission in healthcare settings [51].

In contrast, the lower prevalence of *asa1*, *ace*, and *gelE* was consistent with previous evidence showing that these genes are more commonly associated with *Enterococcus faecalis* than *E. faecium* [52]. Indeed, the pathogenicity in *E. faecium* mainly depends on the presence of the *esp* gene, which is known to play a key role in biofilm formation and colonization of host tissues [53].

To investigate *E. faecium* epidemiology, PFGE and MLST were used in this study, as they are still the preferred methods. PFGE analysis revealed distinct cluster-specific patterns, with cluster 14 being predominantly associated with an ICU environment. In detail, three strains (VREfm 425, 426, and 328) were isolated from rectal swabs, one (VREfm 348) from bladder catheter, and one (VREfm 410) from blood culture. This emphasizes the critical role that ICUs play as focal points for the transmission of VREfm, typically harboring patients with compromised immune systems or subjected to a high frequency of invasive medical procedures. Moreover, this clustering raises concerns about environmental reservoirs, such as equipment or healthcare workers' contamination [54]. This necessitates an infection prevention approach including regular decontamination of surfaces, enhanced training for healthcare staff, and the utilization of advanced diagnostic tools for early detection and intervention [55].

However, VREfm isolates were isolated from multiple wards, including Internal Medicine, NICU, Urology, and General Surgery. Notably, cluster-specific patterns observed in these wards reveal important epidemiological insights and underline the risk posed by VREfm in non-ICU settings. For example, cluster 12, including the isolates from ICUs and internal medicine departments, suggests potential cross-ward transmission events or shared sources of contamination. This underlines the need for targeted infection control measures [56].

Further epidemiological insights emerged from cluster 3, which grouped four isolates (VREfm 45, 52, 56, 58), all recovered in February 2023 from ICUs and spoke hospital (50% each). Although the temporal and spatial clustering might suggest intra-hospital transmission, these isolates were obtained from rectal swabs collected as part of hospital admission screening.

Nonetheless, PFGE analysis revealed that three out of four isolates within cluster 3 were clonally related, reinforcing the hypothesis of a common transmission source. The persistence of clonally identical strains across different locations in the same period suggests that VREfm spread could have been facilitated by reservoirs within the hospital environment, implying a focused transmission event.

In contrast, the isolation dates of the strains included in cluster 14 cover a broad period (from November 2023 to February 2024), suggesting a persistent presence of these strains within the ICU. However, many isolates were from rectal swabs performed at admission; thus, patients were colonized.

Furthermore, the high genetic diversity observed across VREfm isolates (Simpson's Index, 0.98) and the presence of 26 distinct pulsotypes highlights the complexity of trans-

mission dynamics, including patient transfers, contaminated medical equipment, and transient healthcare reservoirs.

In addition, the considerable genetic variability across isolates suggests that VREfm is undergoing continuous adaptation to selective pressures within the hospital environment. This variation may be driven by intensive antibiotic use, favoring resistant subpopulations and accelerating the genetic diversification of strains through mutations and horizontal gene transfer.

Concerning MLST, ST80 was the predominant ST, consistently identified amongst strains from various wards. This finding was concordant with other Italian studies [57,58], which also highlighted the association of ST80 with clonal complex CC17, known for its role in HAIs and the ability to harbor resistance determinants, thus supporting its significance in transmission dynamics.

The distinct temporal clustering of ST1478 and ST2164 appearing at opposite ends of the isolation period suggests possible episodic introductions or localized outbreaks. These patterns may warrant further epidemiological investigation to identify potential transmission sources, assess the role of hospital or environmental reservoirs, and determine whether specific antimicrobial resistance mechanisms contributed to their emergence.

Conversely, the presence of ST80 throughout the study period suggests its sustained circulation within the hospital environment, potentially indicating endemic persistence or ongoing transmission dynamics that require continued monitoring. Similar observations were reported in a recent study [59], identifying ST1478 as a *pstS*-null ST in Italian hospitals. This sequence type was associated with vancomycin-variable *E. faecium* isolates, suggesting a unique genetic adaptation that may contribute to its sporadic emergence. The identification of ST2164 is also in line with findings from other Italian regions, where this ST has been linked to specific outbreaks in acute care settings [59].

As observed in Table 3, strains with identical PTs were consistently assigned to the same STs. For example, PT4 was related to three strains, all with ST80, while PT15, PT16, and PT19 were each linked to two isolates with ST80. Notably, ST80 was the predominant ST and represented by a wide range of PTs (PT1–PT8, PT13–PT20, PT22–PT23, PT26).

In contrast, ST1478 and ST2164 were associated with a restricted set of pulsotypes. Indeed, ST1478 corresponded to four PTs (PT9–PT12), while ST2164 corresponded to three (PT21, PT24, PT25). The presence of these STs suggests the emergence of distinct clonal types.

The clusters identified through PFGE showed high concordance with MLST results, because most of them were composed exclusively of isolates belonging to a single ST. This consistency suggests that both methods reliably capture the clonal structure of *E. faecium* populations. For instance, the largest PFGE cluster included several PTs all assigned to ST80, while others were composed of strains belonging to either ST1478 or ST2164, with no evidence of mixed STs within the same PFGE cluster.

Overall, findings indicate that these typing methods provide complementary insights into the molecular epidemiology of *E. faecium*. While PFGE offers a high-resolution approach to detect genetic differences between strains, MLST provides a more stable and reproducible method for identifying major clonal lineages. This is further supported by the Simpson's diversity indices, with PFGE showing higher discriminatory power (0.98) compared to MLST (0.39), reflecting its ability to distinguish closely related isolates within the same lineage. Indeed, both PFGE and MLST are reliable tools for tracking the spread and evolution of MDR pathogens in the hospital environment.

These correlations underscore the importance of continuous molecular surveillance to monitor the dynamics of predominant and emerging STs [60], enabling timely interventions to prevent the spread of resistant *E. faecium* strains [61].

The prevalence of strains in non-ICU settings also highlights the potential role of inter-ward patient transfers and shared healthcare equipment in facilitating transmission [62]. By addressing both ICU and non-ICU sources of transmission, a more comprehensive approach to infection control can be achieved, ultimately reducing the burden of VREfm in healthcare facilities.

This study has limitations, including the relatively small sample size and the focus on a single geographical area which may not fully reflect the broader epidemiological trends. Further research should explore the characteristics of a higher number of strains and include genomic analyses to better understand the resistance mechanisms and transmission pathways.

Based on the study findings, active surveillance programs should be reinforced, especially in high-risk wards such as ICUs, integrating genomic surveillance and environmental sampling to elucidate the role of possible reservoirs and transmission routes and adopting strict infection control measures, such as contact precautions and antimicrobial stewardship, to prevent the spread of VREfm and that of other MDR pathogens.

5. Conclusions

E. faecium, with its multifaceted resistance profiles and virulence traits, represents a significant challenge in hospital settings, particularly in ICUs where patients are highly vulnerable to nosocomial infections. This study demonstrated that resistance to vancomycin is highly related to the *vanA* gene, while *vanB* strains were irrelevant. Information achieved through the classical methodologies of PFGE and MLST facilitated the identification of clusters and the characterization of circulating STs linked to clones. However, the integration in future investigations with WGS-based data could offer more detailed insights into the genetic landscape and transmission dynamics of these strains.

Despite the relatively small number of isolates tested, the study findings are significant not only at local level, as could be important in contributing to the description of the epidemiological framework. Moreover, as the study is related to an area previously unexplored in the context of VREfm prevalence and molecular characterization, it provides a valuable foundation for future research, offering insights that could inform effective interventions and contribute to the advancement of regional and national healthcare strategies.

Author Contributions: Conceptualization, M.T. and G.R.; methodology, M.T.; validation, M.T., M.L.S. and G.R.; formal analysis, A.L. and M.L.S.; investigation, A.L.; resources, G.R.; data curation, A.L.; writing—original draft preparation, A.L.; writing—review and editing, M.T., M.L.S. and G.R.; supervision, M.T. and G.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: This study includes all data, although the authors are available for further explanations. This was a non-interventional study, and the main findings were related to strains collected within the “alert organisms” surveillance system established in the hospital; hence, for patient data, anonymity was assured. Since this study focused on the molecular characterization of bacterial isolates, the research did not involve humans, and ethical approval from an ethics committee was not required.

Acknowledgments: We thank our colleagues from the Hospital Microbiology Laboratory who collected strains and provided the expertise that greatly assisted the research.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

VRE	Vancomycin-resistant enterococci
VREfm	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus faecium</i>
WHO	World Health Organization
HAIs	Healthcare-associated infections
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ICU	Intensive care unit
TSA	Tryptic Soy Agar
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
UPGMA	Unweighted pair group method with arithmetic mean
MLST	Multilocus sequence typing
PCR	Polymerase chain reaction
PT	Pulsotype
MDR	Multidrug resistant
NICU	Neonatal intensive care unit
CC	Clonal complex

References

1. Hashimoto, Y.; Suzuki, M.; Kobayashi, S.; Hirahara, Y.; Kurushima, J.; Hirakawa, H.; Nomura, T.; Tanimoto, K.; Tomita, H. Enterococcal Linear Plasmids Adapt to *Enterococcus faecium* and Spread within Multidrug-Resistant Clades. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2023**, *67*, e0161922. [CrossRef] [PubMed]
2. Miller, W.R.; Murray, B.E.; Rice, L.B.; Arias, C.A. Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2020**, *34*, 751–771. [CrossRef] [PubMed]
3. Liu, S.; Li, Y.; He, Z.; Wang, Y.; Wang, J.; Jin, D. A Molecular Study Regarding the Spread of *vanA* Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in a Tertiary Hospital in China. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2022**, *31*, 270–278. [CrossRef]
4. World Health Organization (WHO). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: Bacterial Pathogens of Public Health Importance to Guide Research, Development and Strategies to Prevent and Control Antimicrobial Resistance. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461> (accessed on 31 March 2025).
5. Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef]
6. European Centre for Disease Prevention and Control. *Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use in European Acute Care Hospitals*; ECDC: Stockholm, Sweden, 2024.
7. Khan, K.; Jalal, K.; Uddin, R. Pangenome Profiling of Novel Drug Target Against Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2023**, *41*, 15647–15660. [CrossRef]
8. Alotaibi, G.; Khan, K.; Al Mouslem, A.K.; Ahmad Khan, S.; Naseer Abbas, M.; Abbas, M.; Ali Shah, S.; Jalal, K. Pangenome-Based Reverse Vaccinology Approach to Explore *Enterococcus faecium* (VRE) Strains for Identification of Novel Multi-Epitope Vaccine Candidate. *Immunobiology* **2022**, *227*, 152221. [CrossRef] [PubMed]
9. Iacchini, S.; Boros, S.; Pezzotti, P.; Errico, G.; Del Grosso, M.; Camilli, R.; Giufrè, M.; Pantosti, A.; Maraglino, F.; Palamara, A.T.; et al. AR-ISS: Sorveglianza Nazionale dell'Antibiotico-Resistenza. Dati 2023; Rapporti ISS Sorveglianza RIS 5/2024; Istituto Superiore di Sanità: Roma, Italy, 2024.
10. Wardal, E.; Żabicka, D.; Skalski, T.; Kubiak-Pulkowska, J.; Hryniewicz, W.; Sadowy, E. Characterization of a Tigecycline-, Linezolid- and Vancomycin-Resistant Clinical *Enterococcus faecium* Isolate, Carrying *vanA* and *vanB* Genes. *Infect. Dis. Ther.* **2023**, *12*, 2545–2565. [CrossRef]
11. O'Toole, R.F.; Leong, K.W.C.; Cumming, V.; Van Hal, S.J. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* and the Emergence of New Sequence Types Associated with Hospital Infection. *Res. Microbiol.* **2023**, *174*, 104046. [CrossRef]
12. Wan, T.W.; Yeo, H.H.; Lee, T.F.; Huang, Y.T.; Hsueh, P.R.; Chiu, H.C. Molecular Epidemiology of Bacteraemic Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates and In Vitro Activities of SC5005 and Other Comparators Against These Isolates Collected from a Medical Centre in Northern Taiwan, 2019–2020. *J. Antimicrob. Chemother.* **2023**, *78*, 457–465. [CrossRef]
13. Galletti, P.; Bonofiglio, L.; García Gabarrot, G.; Kaufman, S.; Mollerach, M.; Vigliarolo, L.; von Specht, M.; Toresani, I.; Lopardo, H.A. Resistance to β -Lactams in Enterococci. *Rev. Argent. Microbiol.* **2019**, *51*, 179–183. [CrossRef]

14. Darehkordi, H.; Saffari, F.; Mollaei, H.R.; Ahmadrajab, R. Amino Acid Substitution Mutations and mRNA Expression Levels of the *pbp5* Gene in Clinical *Enterococcus faecium* Isolates Conferring High Level Ampicillin Resistance. *APMIS* **2019**, *127*, 115–122. [CrossRef] [PubMed]
15. Harada, S.; Shibue, Y.; Aoki, K.; Ishii, Y.; Tateda, K. Prevalence of High-Level Aminoglycoside Resistance and Genes Encoding Aminoglycoside-Modifying Enzymes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* Isolated in a University Hospital in Tokyo. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2020**, *73*, 476–480. [CrossRef] [PubMed]
16. Das, A.K.; Dudeja, M.; Kohli, S.; Ray, P.; Nandy, S. High-Level Gentamicin Resistance Mediated by *Aac(6′)-Ie-aph(2′′)-Ia* Gene in *Enterococcus* Species Isolated from Clinical Samples in Northern India. *Indian J. Pharmacol.* **2022**, *54*, 171–176. [CrossRef] [PubMed]
17. Abu Lila, A.S.; Alharby, T.N.; Alanazi, J.; Alanazi, M.; Abdallah, M.H.; Rizvi, S.M.D.; Moin, A.; Khafagy, E.S.; Tabrez, S.; Al Balushi, A.A.; et al. Clinical Resistant Strains of Enterococci and Their Correlation to Reduced Susceptibility to Biocides: Phenotypic and Genotypic Analysis of Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins. *Antibiotics* **2023**, *12*, 461. [CrossRef]
18. Lin, P.Y.; Chan, S.Y.; Stern, A.; Chen, P.H.; Yang, H.C. Epidemiological Profiles and Pathogenicity of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Clinical Isolates in Taiwan. *PeerJ* **2023**, *11*, e14859. [CrossRef]
19. Tang, Y.F.; Lin, Y.S.; Su, L.H.; Liu, J.W. Increasing Trend of Healthcare-Associated Infections Due to Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* (VRE-fm) Paralleling Escalating Community-Acquired VRE-fm Infections in a Medical Center Implementing Strict Contact Precautions: An Epidemiologic and Pathogenic Genotype Analysis and Its Implications. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2023**, *56*, 1045–1053. [CrossRef]
20. Tokano, M.; Tarumoto, N.; Sakai, J.; Imai, K.; Kodana, M.; Kawamura, T.; Maeda, T.; Maesaki, S. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* in Japan, 2007–2015: A Molecular Epidemiology Analysis Focused on Examining Strain Characteristics Over Time. *Microbiol. Spectr.* **2024**, *12*, e0244423. [CrossRef]
21. Rogers, L.A.; Strong, K.; Cork, S.C.; McAllister, T.A.; Liljebjelke, K.; Zaheer, R.; Checkley, S.L. The Role of Whole Genome Sequencing in the Surveillance of Antimicrobial Resistant *Enterococcus* spp.: A Scoping Review. *Front. Public Health* **2021**, *9*, 599285. [CrossRef]
22. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical Breakpoints—Breakpoints and Guidance. 2025. Available online: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints (accessed on 9 May 2024).
23. Centers for Disease Control and Prevention. Unified Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Protocol for Gram-Positive Bacteria. Available online: https://www.cdc.gov/healthcare-associated-infections/media/pdfs/Unified_PFGE_Protocol.pdf (accessed on 31 March 2025).
24. Homan, W.L.; Tribe, D.; Poznanski, S.; Li, M.; Hogg, G.; Spalburg, E.; Van Embden, J.D.; Willems, R.J. Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 1963–1971. [CrossRef]
25. Shirvani, F.; Behzad, A.; Abdollahi, N.; Mohkam, M.; Sharifian, M.; Esfandiari, N.; Fallah, F. Frequency and Co-Colonization of Vancomycin-Resistant Enterococci and *Candida* in ICU-Hospitalized Children. *New Microbes New Infect.* **2021**, *41*, 100881. [CrossRef]
26. Haghi, F.; Lohrasbi, V.; Zeighami, H. High Incidence of Virulence Determinants, Aminoglycoside and Vancomycin Resistance in Enterococci Isolated from Hospitalized Patients in Northwest Iran. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 744. [CrossRef] [PubMed]
27. Portillo, A.; Ruiz-Larrea, F.; Zarazaga, M.; Alonso, A.; Martinez, J.L.; Torres, C. Macrolide Resistance Genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 967–971. [CrossRef] [PubMed]
28. Poeta, P.; Costa, D.; Igrejas, G.; Sáenz, Y.; Zarazaga, M.; Rodrigues, J.; Torres, C. Polymorphisms of the *pbp5* Gene and Correlation with Ampicillin Resistance in *Enterococcus faecium* Isolates of Animal Origin. *J. Med. Microbiol.* **2007**, *56*, 236–240. [CrossRef]
29. Weng, P.L.; Ramli, R.; Hamat, R.A. Antibiotic Susceptibility Patterns, Biofilm Formation and *esp* Gene Among Clinical Enterococci: Is There Any Association? *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2019**, *16*, 3439. [CrossRef] [PubMed]
30. Jovanović, M.; Velebit, B.; Tošić, T.; Maki, G.; Pavić, S.; Jovanović, S.; Stošović, R.; Zervos, M.J. Comparative Study of Virulence Factor Genes, β -Hemolysis and Biofilm Production in Invasive and Colonizing Enterococci. *Eur. J. Inflamm.* **2023**, *21*, 1721727X231156333. [CrossRef]
31. Trautmannsberger, I.; Kolberg, L.; Meyer-Buehn, M.; Huebner, J.; Werner, G.; Weber, R.; Heslich, V.; Schroepf, S.; Muench, H.G.; von Both, U. Epidemiological and genetic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a university children's hospital in Germany: 2019 to 2020. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **2022**, *11*, 48. [CrossRef]
32. Esme, M.; Topeli, A.; Yavuz, B.B.; Akova, M. Infections in elderly critically ill patients. *Front. Med.* **2019**, *6*, 118. [CrossRef]
33. De Waele, J.J.; Akova, M.; Antonelli, M.; Canton, R.; Carlet, J.; De Backer, D.; Dimopoulos, G.; Garnacho-Montero, J.; Kesecioglu, J.; Lipman, J.; et al. Antimicrobial Resistance and Antibiotic Stewardship Programs in the ICU: Insistence and Persistence in the Fight Against Resistance. A Position Statement from ESICM/ESCMID/WAAAR Round Table on Multi-Drug Resistance. *Intensive Care Med.* **2018**, *44*, 189–196. [CrossRef]
34. Weisser, M.; Oostdijk, E.A.; Willems, R.J.; Bonten, M.J.; Frei, R.; Elzi, L.; Halter, J.; Widmer, A.F.; Top, J. Dynamics of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clones colonizing hospitalized patients: Data from a prospective observational study. *BMC Infect. Dis.* **2012**, *12*, 68. [CrossRef]

35. Póvoa, P.; Ramirez, P.; Blot, S. Decolonization Strategies Against Multidrug Resistant Organisms in the ICU. *Intensive Care Med.* **2024**, *50*, 577–579. [\[CrossRef\]](#)
36. Domingo, M.C.; Huletsky, A.; Giroux, R.; Boissinot, K.; Picard, F.J.; Lebel, P.; Ferraro, M.J.; Bergeron, M.G. High prevalence of glycopeptide resistance genes *vanB*, *vanD*, and *vanG* not associated with *Enterococci* in human fecal flora. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2005**, *49*, 4784–4786. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Ghazvinian, M.; Asgharzadeh Marghmalek, S.; Gholami, M.; Amir Gholami, S.; Amiri, E.; Goli, H.R. Antimicrobial Resistance Patterns, Virulence Genes, and Biofilm Formation in Enterococci Strains Collected from Different Sources. *BMC Infect. Dis.* **2024**, *24*, 274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Mirzaei, M.; Alebouyeh, M.; Sohrabi, M.B.; Eslami, P.; Fazli, M.; Ebrahimi, M.; HajiAsgarli, P.; Rashidan, M. Antibiotic resistance assessment and multi-drug efflux pumps of *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2023**, *17*, 649–655. [\[CrossRef\]](#)
39. Pan, P.; Sun, L.; Shi, X.; Huang, X.; Yin, Y.; Pan, B.; Hu, L.; Shen, Q. Analysis of molecular epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant and linezolid-resistant *Enterococcus* in China. *BMC Med. Genom.* **2024**, *17*, 174. [\[CrossRef\]](#)
40. Arredondo-Alonso, S.; Top, J.; McNally, A.; Puranen, S.; Pesonen, M.; Pensar, J.; Marttinen, P.; Braat, J.C.; Rogers, M.R.C.; van Schaik, W.; et al. Plasmid-mediated horizontal gene transfer and the emergence of the vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST80 lineage. *mBio* **2021**, *12*, e02786–20.
41. Fioriti, S.; Simoni, S.; Caucci, S.; Morroni, G.; Ponzio, E.; Coccitto, S.N.; Brescini, L.; Cirioni, O.; Menzo, S.; Biavasco, F.; et al. Trend of Clinical Vancomycin-Resistant Enterococci Isolated in a Regional Italian Hospital from 2001 to 2018. *Braz. J. Microbiol.* **2020**, *51*, 1607–1613. [\[CrossRef\]](#)
42. Stampone, L.; Del Grosso, M.; Boccia, D.; Pantosti, A. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. *J. Clin. Microbiol.* **2005**, *43*, 1575–1580. [\[CrossRef\]](#)
43. Hammerum, A.M.; Karstensen, K.T.; Roer, L.; Kaya, H.; Lindegaard, M.; Porsbo, L.J.; Kjerulf, A.; Pinholt, M.; Holzknecht, B.J.; Worning, P.; et al. Surveillance of Vancomycin-Resistant Enterococci Reveals Shift in Dominating Clusters from *vanA* to *vanB* *Enterococcus faecium* Clusters, Denmark, 2015 to 2022. *Euro Surveill.* **2024**, *29*, 2300633. [\[CrossRef\]](#)
44. Boccella, M.; Santella, B.; Pagliano, P.; De Filippis, A.; Casolaro, V.; Galdiero, M.; Borrelli, A.; Capunzo, M.; Boccia, G.; Franci, G. Prevalence and antimicrobial resistance of *Enterococcus* species: A retrospective cohort study in Italy. *Antibiotics* **2021**, *10*, 1552. [\[CrossRef\]](#)
45. Gök, Ş.M.; Türk Dağı, H.; Kara, F.; Arslan, U.; Fındık, D. Investigation of antibiotic resistance and virulence factors of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol. Bul.* **2020**, *54*, 26–39. [\[CrossRef\]](#)
46. Sattari-Maraji, A.; Jabalameli, F.; Node Farahani, N.; Beigverdi, R.; Emaneini, M. Antimicrobial Resistance Pattern, Virulence Determinants and Molecular Analysis of *Enterococcus faecium* Isolated from Children Infections in Iran. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 156. [\[CrossRef\]](#)
47. Singh, K.V.; Galloway-Peña, J.; Montealegre, M.C.; Dong, X.; Murray, B.E. Genomic Context as Well as Sequence of Both *psr* and Penicillin-Binding Protein 5 Contributes to β -Lactam Resistance in *Enterococcus faecium*. *mBio* **2024**, *15*, e0017024. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Ligozzi, M.; Pittaluga, F.; Fontana, R. Modification of penicillin-binding protein 5 associated with high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, *40*, 354–357. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Zhang, X.; Paganelli, F.L.; Bierschenk, D.; Kuipers, A.; Bonten, M.J.; Willems, R.J.; van Schaik, W. Genome-wide identification of ampicillin resistance determinants in *Enterococcus faecium*. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002804. [\[CrossRef\]](#)
50. Herrero, I.A.; Issa, N.C.; Patel, R. Nosocomial Spread of Linezolid-Resistant, Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium*. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 867–869. [\[CrossRef\]](#)
51. Kiruthiga, A.; Padmavathy, K.; Shabana, P.; Naveenkumar, V.; Gnanadesikan, S.; Malaiyan, J. Improved Detection of *esp*, *hyl*, *asa1*, *gelE*, *cylA* Virulence Genes Among Clinical Isolates of Enterococci. *BMC Res. Notes* **2020**, *13*, 170. [\[CrossRef\]](#)
52. Strateva, T.; Mitov, I. *Enterococcus faecalis*—A Dangerous Opponent in the Nosocomial World. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2016**, *4*, 65–69. [\[CrossRef\]](#)
53. Heikens, E.; Bonten, M.J.; Willems, R.J. Enterococcal surface protein Esp is important for biofilm formation of *Enterococcus faecium* E1162. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 8233–8240. [\[CrossRef\]](#)
54. Russotto, V.; Cortegiani, A.; Raineri, S.M.; Giarratano, A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J. Intensive Care* **2015**, *3*, 54. [\[CrossRef\]](#)
55. Dancer, S.J. Controlling hospital-acquired infection: Focus on the role of the environment and new technologies for decontamination. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 665–690. [\[CrossRef\]](#)
56. Joshi, S.; Shallal, A.; Zervos, M. Vancomycin-Resistant Enterococci: Epidemiology, Infection Prevention, and Control. *Infect. Dis. Clin. N. Am.* **2021**, *35*, 953–968. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

57. Cinthi, M.; Coccitto, S.N.; Simoni, S.; D'Achille, G.; Zeni, G.; Mazzariol, A.; Pocognoli, A.; Di Lodovico, S.; Di Giulio, M.; Morroni, G.; et al. Molecular characterization of *Enterococcus faecium* clinical isolates harbouring *erm(T)* from an Italian hospital. *Curr. Microbiol.* **2024**, *81*, 431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Cinthi, M.; Coccitto, S.N.; Simoni, S.; Gherardi, G.; Palamara, A.T.; Di Lodovico, S.; Di Giulio, M.; Du, X.D.; Vignaroli, C.; Brenciani, A.; et al. The *optrA*, *cfr(D)* and *vanA* genes are co-located on linear plasmids in linezolid- and vancomycin-resistant enterococcal clinical isolates in Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* **2025**, *80*, 1362–1370. [[CrossRef](#)]
59. Coccitto, S.N.; Cinthi, M.; Simoni, S.; Pocognoli, A.; Zeni, G.; Mazzariol, A.; Morroni, G.; Mingoia, M.; Giovanetti, E.; Brenciani, A.; et al. Genetic analysis of vancomycin-variable *Enterococcus faecium* clinical isolates in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2024**, *43*, 673–682. [[CrossRef](#)]
60. Tamburro, M.; Lombardi, A.; Sammarco, M.L.; Ripabelli, G. Molecular Epidemiology Revealed Distinct Patterns Among Multidrug Resistant Clinical *Acinetobacter baumannii* Strains in Different Periods in the Main Hospital in Molise Region, Central Italy. *Appl. Microbiol.* **2025**, *5*, 9. [[CrossRef](#)]
61. Karino, M.; Yanagihara, M.; Harada, T.; Sugo, M.; Karino, M.; Ohtaki, H.; Hanada, H.; Takano, T.; Yamato, M.; Okamoto, S. New Multilocus Sequence Typing Scheme for *Enterococcus faecium* Reveals Sequential Outbreaks of Vancomycin-Resistant *E. faecium* ST1162 and ST610 in a Japanese Tertiary Medical Center. *Microbiol. Spectr.* **2025**, *13*, e0213124. [[CrossRef](#)]
62. Salzo, A.; Ripabelli, G.; Sammarco, M.L.; Mariano, A.; Niro, C.; Tamburro, M. Healthcare-Associated Infections and Antibiotics Consumption: A Comparison of Point Prevalence Studies and Intervention Strategies. *Hosp. Top.* **2021**, *99*, 140–150. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

6.3 *S. aureus*

6.3.1 Profili di antibiotico-resistenza

L'analisi dei profili di antibiotico-resistenza dei ceppi di *S. aureus* ha evidenziato una marcata associazione con il fenotipo MRSA, caratterizzato da un'elevata resistenza nei confronti degli antibiotici β -lattamici, in particolare verso penicilline e cefalosporine, nonché verso altre classi comunemente correlate alla resistenza alla meticillina/oxacillina.

In particolare, una totale resistenza dei ceppi è stata osservata nei confronti della cefoxitina (n=33) e dell'ampicillina (n=31). La cefoxitina rappresenta un marker fenotipico per l'identificazione della resistenza inducibile mediata dai geni *mecA* e *mecC*.

Un'elevata frequenza di resistenza è stata, inoltre, riscontrata per oxacillina e penicillina (97,1%, n=33/34), mentre un solo ceppo (2,9%) è risultato sensibile, in accordo con il profilo fenotipico che lo identificava come MSSA. Sono state anche osservate percentuali di resistenza elevate per ciprofloxacina (94,1%, n=32/34) e gentamicina (71,9%, n=23/32), seguiti da eritromicina (58,8%, n=20/34), clindamicina (52,9%, n=18/34) e acido fusidico (5,9%, n=2/34).

La totalità dei ceppi testati per la ceftarolina (n=24) è risultata sensibile.

È stata, inoltre, riscontrata una completa sensibilità dei ceppi testati a linezolid, tigeciclina, teicoplanina, vancomicina e mupirocina ad alto livello ed è stata rilevata un'elevata sensibilità a daptomicina (97,1%, n=33/34), tetraciclina (85,3%, n=29/34) e trimetoprim/sulfametossazolo (91,2%, n=31/34).

Nel complesso, gli isolati MRSA hanno mostrato profili MDR eterogenei, che hanno portato all'identificazione di 22 resistotipi distinti (R1–R22) su un totale di 34 ceppi (Tabella 11).

Ceppo	ANI	AMP	CPT	CIP	CLI	DAP	ERY	FOS	GEN	LZD	MXF	MUP	OXA	PEN	TGC	TEC	TET	SXT	VAN	FOX	RES
317	S	R	S	I	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	1
331	S	R	S	I	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	2
335	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
358	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
375	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
444	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
501	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
481	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
564	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
590	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	3
353	S	R		R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	4
385	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	5
387	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	6
390	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	7
391	S	R		R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	8
422	S	R		R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	8
527	S	R		R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	8
705	S	R		R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	8
405	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R		S	S	S	S	R	9
409	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	10
477	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	10
554	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	10
437	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	11
458	S	R		R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	12
540	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	13
559	S	R		R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	14
706	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	15
516	R		S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	16

583	S			R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	17
585	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	18
717	R	R	S	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	S	S	R	19
726	S	R		R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	R	20
730	S	R	S	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	R	21
461	/	/	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	/	22

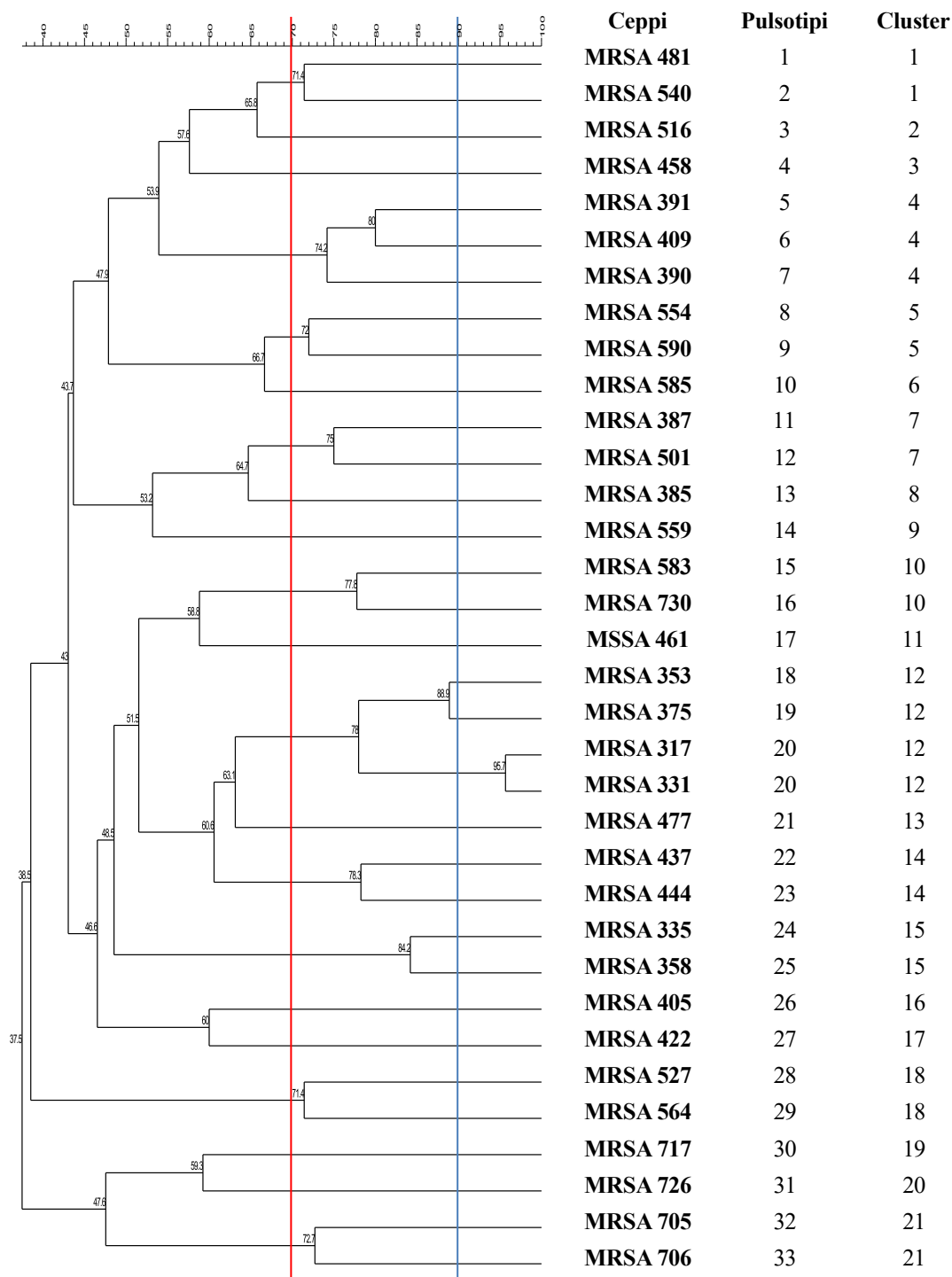
Tabella 11: Resistotipi identificati per 34 ceppi di *S. aureus*

Tra questi, i resistotipi R3, R8 e R10 sono risultati i più frequentemente riscontrati, comprendendo complessivamente 17 ceppi (50,0%). In particolare, il resistotipo più rappresentato è stato R3, identificato in 10 ceppi (29,4%), seguito da R8 (n=4, 11,8%) e da R3 (n=3, 8,8 %).

6.3.2 Caratterizzazione molecolare mediante PFGE

La PFGE ha evidenziato 21 cluster a un livello di similarità del 70%, con i cluster 12 e 4 come i più prevalenti (Figura 1).

Figura 1: Dendrogramma ottenuto mediante PFGE con *SmaI* nei ceppi di *S. aureus*



Il cluster 12 ha compreso quattro ceppi isolati tra ottobre 2023 e gennaio 2024 da diversi reparti, come nefrologia, medicina interna, malattie infettive e chirurgia (n=1, 25,0% ciascuno). Nonostante l'appartenenza allo stesso cluster, i ceppi hanno mostrato profili di resistenza del tutto differenti.

Il cluster 4 ha raggruppato tre ceppi, principalmente isolati dal reparto di patologia neonatale (n=2, 66,7%) e nefrologia (n=1, 33,3%) nel periodo dicembre 2023–gennaio 2024.

L'analisi del dendrogramma ad un livello di similarità del 90% ha mostrato la presenza di 33 pulsotipi (PT1–PT33); PT20 è risultato il più frequente, pur includendo solo due ceppi (MRSA 317 e 331) isolati dai reparti di malattie infettive e chirurgia. Il potere discriminante D della tecnica è risultato pari a 0,99.

6.3.3 Prevalenza dei geni di resistenza e virulenza

Tutti i ceppi analizzati, essendo stati definiti come MRSA dagli antibiogrammi, ad eccezione del ceppo 461 (2,9%), hanno mostrato la presenza del gene *mecA* (Tabella 12). Al contrario, nessun ceppo ha evidenziato la presenza del gene *mecC*. Il gene *PVL* è stato identificato in 4 isolati (12,1%) (MRSA 501, 516, 706, 717), provenienti da differenti campioni clinici.

6.3.4 *Spa* typing

L'amplificazione e il sequenziamento del gene *spa* hanno consentito di suddividere i 34 ceppi in 8 *spa* type distinti, con una distribuzione variabile tra gli isolati (Tabelle 12 e 13).

Tabella 12: Risultati *spa* typing, e ricerca di *mecA*, *mecC* e *PVL* in *S. aureus*.

Ceppi	Peso	<i>spa</i>	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	<i>PVL</i>
317	300-350	t127	+	-	-
331	200-250	t386	+	-	-
335	500-550	t379	+	-	-
353	450-500	t002	+	-	-
358	550-600	t002	+	-	-
375	450-500	t002	+	-	-
385	450-500	t008	+	-	-
387	400-450	t010	+	-	-
390	550-600	t022	+	-	-
391	550-600	t022	+	-	-
405	450-500	t002	+	-	-
409	550-600	t008	+	-	-
422	450-500	t379	+	-	-
437	300-350	t127	+	-	-
444	350-400	t002	+	-	-
458	500-550	t379	+	-	-
461	350-400	t002	-	-	-
477	350-400	t002	+	-	-
481	350-400	t002	+	-	-
501	350-400	t008	+	-	+
516	400-450	t008	+	-	+
527	500-550	t008	+	-	-
540	350-400	t002	+	-	-
554	350-400	t002	+	-	-
559	400-450	t002	+	-	-
564	500-550	t008	+	-	-
583	400-450	t002	+	-	-
585	400-450	t008	+	-	-
590	500-550	t008	+	-	-
705	550-600	t022	+	-	-
706	400-450	t008	+	-	+
717	350-400	t008	+	-	+
726	550-600	t022	+	-	-
730	400-450	t571	+	-	-

Tabella 13: Assegnazione *spa* Type con Ridom Sequence e Krieswith Sequence

Strains	<i>Spa</i>	MLST
353	T002	ST5 – ST21
358	T002	ST5 – ST21
375	T002	ST5 – ST21
405	T002	ST5 – ST21
444	T002	ST5 – ST21
461	T002	ST5 – ST21
477	T002	ST5 – ST21
481	T002	ST5 – ST21
540	T002	ST5 – ST21
554	T002	ST5 – ST21
559	T002	ST5 – ST21
583	T002	ST5 – ST21
385	T008	ST8
409	T008	ST8
501	T008	ST8
516	T008	ST8
527	T008	ST8
564	T008	ST8
585	T008	ST8
590	T008	ST8
706	T008	ST8
717	T008	ST8
390	T022	ST22
391	T022	ST22
705	T022	ST22
726	T022	ST22
335	T379	/
422	T379	/
458	T379	/
317	T127	ST1
437	T127	ST1
331	T386	ST1
387	T010	ST5
730	T571	/

I tipi più rappresentati sono stati t002 e t008, relativi a 12 (35,3%) e 10 (29,4%) ceppi rispettivamente, seguiti da t022, presente in 4 isolati (11,8%), e da t379, associato a 3 ceppi (8,8%). In particolare, tutti gli isolati *PVL*-positivi appartenevano allo *spa* type T008. L'indice di Simpson è risultato pari a 0,76, indicando un buon livello di eterogeneità tra gli *spa* type identificati.

Attraverso l'utilizzo del Ridom *Spa* Server, sono stati determinati anche gli ST più frequentemente associati agli *spa* type osservati (Tabella 13). Gli ST maggiormente riscontrati sono stati ST5 e ST21 per t002, ST5 per t008, ST22 per t022, ST1 per t127 e t386 e ST5 per t010. Per gli *spa* type t379 e t571 non è stato possibile assegnare alcun ST noto.

7. Discussione

La crescente diffusione della resistenza agli antimicrobici rappresenta una delle principali minacce emergenti per la salute pubblica a livello globale. Le più recenti proiezioni indicano che, in assenza di interventi efficaci, nei prossimi decenni le infezioni sostenute da batteri multiresistenti potrebbero determinare un numero di decessi paragonabile, se non superiore, a quello associato alle principali patologie cronico-degenerative, come le neoplasie (GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators, 2024). Questo fenomeno è particolarmente evidente in ambito ospedaliero, dove la pressione selettiva esercitata dall'uso intensivo di antibiotici favorisce l'emergenza e la persistenza di ceppi resistenti, spesso responsabili di ICA.

In tale contesto, l'identificazione precoce dei microrganismi responsabili di ICA e la comprensione delle modalità di diffusione rappresentano elementi fondamentali per l'adozione di strategie efficaci di prevenzione e controllo. L'epidemiologia molecolare ha assunto negli ultimi anni un ruolo sempre più centrale, consentendo di analizzare la variabilità genetica delle popolazioni batteriche e di ricostruire le relazioni clonali tra isolati provenienti da differenti fonti (Tümmler B, 2020). Questi approcci permettono non solo di individuare possibili fonti e *reservoir* di infezione, ma anche di chiarire i meccanismi di trasmissione all'interno delle strutture sanitarie e nella comunità. L'impiego di metodiche di tipizzazione molecolare contribuisce, inoltre, ad approfondire la conoscenza dell'epidemiologia delle infezioni batteriche, fornendo informazioni utili sulla distribuzione temporale e spaziale dei ceppi, sulla loro persistenza nel tempo e sulla dinamica dei focolai epidemici (Sabat AJ et al., 2013). Tali dati risultano essenziali per supportare interventi mirati di *infection prevention and control*, per valutare l'efficacia delle misure di sanificazione e per orientare decisioni cliniche e gestionali basate sull'evidenza scientifica.

7.1 Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di *P. aeruginosa*

Una parte di questo lavoro di tesi descrive i risultati ottenuti dalla caratterizzazione biomolecolare di ceppi clinici e ambientali di *P. aeruginosa* isolati tra luglio e agosto 2022 presso il PO *Hub* della Regione Molise, riportati nel lavoro sopra citato.

L'approccio integrato, basato sull'analisi dei profili di antibiotico-resistenza e sulla tipizzazione molecolare mediante PFGE e metodiche basate su PCR, ha consentito di esplorare le dinamiche di diffusione di *P. aeruginosa* all'interno dell'ambiente ospedaliero, evidenziando una stretta interazione tra isolati clinici e ambientali. I risultati hanno mostrato che *P. aeruginosa* è stato isolato prevalentemente da pazienti ricoverati in TIN e UTI, caratterizzati da elevata vulnerabilità allo sviluppo di ICA a causa di vari fattori quali immaturità o compromissione del sistema immunitario, presenza di comorbidità, utilizzo di dispositivi invasivi e frequente esposizione a terapie antibiotiche ad ampio spettro (Blot S et al., 2022). Tali reparti rappresentano ambienti ad alta pressione selettiva, nei quali *P. aeruginosa* trova condizioni favorevoli per la colonizzazione e la selezione di fenotipi resistenti.

I profili di suscettibilità antimicrobica hanno evidenziato la presenza di ceppi MDR, resistenti a diverse classi di antibiotici, inclusi β -lattamici e altri farmaci di largo impiego, in accordo con i più recenti dati epidemiologici nazionali (Iacchini S et al., 2023). La totale resistenza osservata verso ertapenem, amoxicillina-clavulanato, cefuroxime, tigeciclina, trimetoprim e nitrofurantoina riflette i meccanismi di resistenza di *P. aeruginosa*, mediati dalla ridotta permeabilità della membrana esterna, dall'attività di pompe di efflusso e dalla produzione di β -lattamasi cromosomiche (Elfadadny A et al., 2024). La rilevazione di ceppi resistenti anche ad altri carbapenemi (imipenem e meropenem), seppur in percentuali contenute, rappresenta un dato di particolare rilevanza clinica, considerando il ruolo di questi antibiotici come opzioni terapeutiche di ultima linea. L'analisi dei profili di resistenza degli isolati ambientali ha mostrato similitudini con quelli dei ceppi umani supportando l'ipotesi che superfici, lavandini e sifoni possano fungere da *reservoir* persistenti di ceppi MDR.

L'analisi mediante PFGE ha evidenziato un'elevata variabilità genetica tra gli isolati, con l'identificazione di 26 cluster distinti, in linea con la struttura di popolazione non clonale di *P. aeruginosa*, caratterizzata da elevata plasticità genomica e capacità di adattamento alle pressioni ambientali (Martínez-Gallardo MJ et al., 2024). Tuttavia, alcuni cluster hanno mostrato un rilevante interesse epidemiologico. In particolare, i cluster 6 e 15 hanno incluso isolati umani e ambientali, suggerendo una possibile trasmissione mediata dall'ambiente ospedaliero. Il cluster 6 ha raggruppato un isolato clinico proveniente dal reparto di medicina interna e due isolati ambientali dalla TIN, mentre il cluster 15 ha incluso due isolati clinici dalla TIN con elevata similarità genetica (96,6%) e un isolato ambientale proveniente dal sifone del lavandino della sala parto. Ulteriori associazioni tra

isolati clinici e ambientali sono state osservate anche nei cluster 7, 16 e 20, rafforzando l'ipotesi di una diffusione inter-reparto attraverso circuiti ambientali comuni o il trasferimento dei pazienti. Le tecniche basate su PCR (ERIC-PCR e RAPD-PCR) sono state utilizzate come strumenti complementari alla PFGE, in quanto più rapide ed economicamente sostenibili, sebbene caratterizzate da una minore capacità discriminante e riproducibilità (Auda IG et al., 2017). ERIC-PCR ha identificato il cluster 1 come il più rappresentato, con isolati umani da diversi reparti e ceppi ambientali da TIN e sala parto, suggerendo una correlazione.

Anche le analisi RAPD-PCR hanno evidenziato cluster con isolati umani e ambientali. L'analisi combinata delle metodiche ha permesso di identificare come alcuni isolati clinici e ambientali siano stati sempre raggruppati negli stessi cluster, come H3, H4, E2 ed E5. Questa concordanza fornisce un'evidenza robusta della correlazione genetica tra i suddetti isolati.

L'analisi mediante MLST ha evidenziato una notevole diversità genetica.

Ciononostante, ST309 e ST895 sono stati i più rappresentati per il 21,2% dei ceppi, seguiti da ST446 (12,1%). Questo andamento è coerente con quanto riportato in un recente studio italiano (Lombardi A, Cornacchia A et al., 2025), che ha evidenziato la presenza di *P. aeruginosa* in diversi punti della rete idrica ospedaliera, nonché la ricorrenza di cloni ambientali come ST309 e la presenza, seppur variabile, di cloni clinicamente rilevanti quali ST446 e ST895.

Gli ST identificati, inoltre, si collocano in un contesto epidemiologico più ampio delineato da Valzano et al. (2024), che in un'indagine multicentrica nel Sud Italia ha evidenziato come ceppi clinici di *P. aeruginosa* resistenti siano frequentemente associati a cloni ad alto rischio come ST111 e ST235.

Il riscontro di ST111 e ST235, sebbene con una bassa prevalenza, insieme a ST309, ST895 e ST446, suggerisce la coesistenza nello stesso ambiente ospedaliero di cloni ambientali persistenti e cloni ad alto rischio, già ampiamente riconosciuti a livello internazionale.

I ceppi con ST309 sono stati esclusivamente isolati da campioni ambientali (lavandini, sifoni e fasciatoi della sala parto e della TIN). Al contrario, ST895 è stato identificato solo in ceppi umani isolati da diversi reparti, tra cui UTI, medicina, ortopedia, pronto soccorso, chirurgia vascolare e TIN, che suggerisce una maggiore circolazione di questo ST nell'ambiente ospedaliero. Infine, ST446 è stato identificato sia in ceppi clinici che ambientali, con particolare rilevanza per gli scarichi dei lavandini della TIN, confermando l'ambiente come serbatoio per la colonizzazione dei pazienti.

Inoltre, sono stati identificati ST253 e ST274 (n=3; 9,1% ciascuno), seguiti da ST1248, ST111, ST235, ST296 (n=2; 6,1% ciascuno) e ST207 (n=1; 3,0%), che completano il profilo di diversità clonale osservato. Questi ST a minore prevalenza presentano una distribuzione eterogenea tra reparti clinici e superfici ambientali, contribuendo ulteriormente alla complessità del panorama epidemiologico.

In particolare, ST253 è stato isolato esclusivamente da campioni clinici provenienti da reparti differenti (urologia, riabilitazione e chirurgia vascolare), mentre ST274 è stato rilevato sia in UTI sia in più punti della rete idrica della TIN, suggerendo un potenziale ruolo dell'ambiente come *reservoir*. ST1248 è risultato associato solo a ceppi isolati dalla TIN, in campioni clinici e ambientali, mentre ST296 è stato identificato in isolati da ortopedia e cardiologia.

ST111 e ST235, sebbene riscontrati in bassa frequenza, sono entrambi definiti come cloni ad alto rischio a livello internazionale per le ICA e ciò evidenzia l'importanza di monitorare questi STs per potenziali focolai epidemiologici.

L'analisi molecolare ha evidenziato che ST895, riscontrato in isolati provenienti da diversi reparti, è stato raggruppato in più cluster mediante analisi PFGE. Questa frammentazione suggerisce che, pur appartenendo allo stesso ST, i ceppi abbiano accumulato differenze genetiche nel tempo, probabilmente a seguito di una circolazione ospedaliera prolungata. Tale dinamica suggerisce la possibile comparsa di varianti evolutive all'interno dello stesso *lineage*, potenzialmente favoriti dalle pressioni selettive dell'ambiente ospedaliero.

Per ST446 emerge una coerenza particolarmente forte tra MLST e PFGE: gli isolati clinici e ambientali si raggruppano negli stessi cluster, suggerendo una stretta correlazione genetica e una possibile trasmissione attraverso l'ambiente. ST309, isolato esclusivamente da superfici ambientali, presenta cluster PFGE geneticamente molto affini, suggerendo che questo ST rappresenti una singola linea clonale dominante nel contesto ambientale, probabilmente associata alla rete idrica ospedaliera. Inoltre, una correlazione particolarmente rilevante riguarda ST1248, rilevato esclusivamente in TIN: entrambi gli isolati (PaH12 e PaH15) ricadono nello stesso cluster PFGE (cluster 15), suggerendo un legame epidemiologico e la presenza di un clone stabile all'interno del reparto.

Nel complesso, questi dati supportano il ruolo delle fonti ambientali come serbatoi di *P. aeruginosa* e come potenziali punti di origine di ICA, in accordo con quanto riportato in numerosi studi condotti in Italia (Orsi GB et al., 2006; Prospero E et al., 2006; Crivaro V et al., 2009). La trasmissione del patogeno attraverso aerosol e superfici contaminate è stata ampiamente documentata (Kotay SM et al., 2019; Pirzadian J et al., 2023). Nel presente contesto, la rilevazione di isolati geneticamente correlati in lavandini, sifoni e campioni clinici identifica tali strutture come punti critici al fine di valutare le relazioni clonali tra i ceppi. In seguito all'aumento delle segnalazioni di *P. aeruginosa* nel PO, l'adozione di misure mirate di *infection control*, tra cui la revisione delle procedure di sanificazione e la sostituzione dei lavandini, ha determinato una drastica riduzione degli isolamenti, sottolineando l'efficacia di interventi strutturali e ambientali nel contenimento della diffusione di questo patogeno (Rakshit P et al., 2023; Karampatakis T et al., 2023). Programmi di sorveglianza microbiologica attiva, affiancati da adeguate strategie di controllo ambientale, rappresentano

strumenti fondamentali per la prevenzione delle infezioni da *P. aeruginosa*, in particolare in contesti ad alto rischio quali TIN e UTI.

7.2 Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di *E. faecium*

Il lavoro di tesi ha anche riguardato la caratterizzazione biomolecolare di 31 ceppi di *E. faecium* isolati da pazienti ricoverati presso gli ospedali *Hub* e *Spoke* della regione Molise. L'analisi ha permesso di evidenziare una sostenuta circolazione di ceppi vancomicino-resistenti (VRE) con profili di multiresistenza e una marcata capacità di persistenza nell'ambiente ospedaliero.

Il profilo fenotipico dei ceppi ha mostrato una forte correlazione con i fattori di rischio, in particolare con l'età dei pazienti e il ricovero in UTI (Trautmannsberger I et al., 2022). Una quota significativa di ceppi è stata isolata da pazienti anziani, con una maggiore suscettibilità alle infezioni, in relazione a prolungate ospedalizzazioni (Esme M et al., 2019). Ciò conferma che *E. faecium* MDR si comporta come un patogeno opportunisto soprattutto nei pazienti fragili, nei quali la pressione antibiotica e la compromissione delle barriere fisiologiche favoriscono la colonizzazione e la progressione verso forme di infezione invasiva (Stegge PB et al., 2024).

La maggior parte dei ceppi analizzati è stata isolata da UTI, in cui l'uso intensivo di antibiotici e la frequente esecuzione di procedure invasive favoriscono la selezione e la diffusione di ceppi MDR (De Waele JJ et al., 2018). La prevalenza di tamponi rettali come principale fonte di isolamento evidenzia l'importanza della colonizzazione intestinale come serbatoio critico per la diffusione di *E. faecium* (Weisser M et al., 2012; Póvoa P et al., 2024), sottolineando la necessità di programmi di screening rigorosi.

L'analisi dei profili di suscettibilità agli antibiotici ha mostrato totale resistenza a vancomicina e teicoplanina, confermando i più recenti dati nazionali secondo cui l'Italia ha mostrato uno dei tassi più elevati di resistenza per *E. faecium* in Europa (circa 40%), dopo Grecia e Lituania (Iacchini S et al., 2023). Inoltre, i ceppi hanno mostrato *pattern* di multiresistenza altamente sovrapponibili, che hanno consentito la loro classificazione in cinque distinti resistotipi, suggerendo la presenza di ceppi caratterizzati da profili di resistenza omogenei e potenzialmente associati a specifiche linee clonali. La resistenza concomitante a entrambi i glicopeptidi è indicativa di un fenotipo VRE ad alto livello, tipicamente *vanA*-positivo, rappresenta un serio problema clinico per la gestione delle infezioni invasive. Negli isolati analizzati, la resistenza è stata prevalentemente mediata dal gene *vanA*, coerentemente con altri studi che ne indicano la predominanza rispetto ad altri determinanti di resistenza (Pan P et al., 2024). Il gene *vanA*, infatti, frequentemente localizzato sul trasposone Tn1546, può propagarsi sia clonalmente, sia orizzontalmente attraverso plasmidi o trasposoni (Arredondo-Alonso S et al., 2020), contribuendo alla diffusione ospedaliera dei ceppi. Tale duplice modalità di diffusione giustifica la presenza di ceppi *vanA*-positivi appartenenti a differenti pulsotipi e *sequence types*, come osservato nel presente studio. L'assenza del gene *vanB* negli isolati conferma dati italiani precedenti, che riportano la sua presenza sporadica (Fioriti S et al., 2020). Oltre ai

glicopeptidi, gli isolati hanno mostrato resistenza multipla alle classi di lincosamidi, β -lattamici (cefoxitina, ceftarolina), macrolidi, aminoglicosidi (gentamicina), carbapenemi (imipenem) e trimetoprim-sulfametossazolo, confermando la presenza di ceppi MDR, che limitano le opzioni terapeutiche (Boccella M et al., 2021; Gök ŞM et al., 2020). La resistenza ad ampicillina (77,8%) e ciprofloxacina (83,3%) è particolarmente rilevante, considerando che questi antibiotici sono indicati come trattamenti di prima scelta (Sattari-Maraji A et al., 2019).

La presenza di cinque resistotipi, caratterizzati da *pattern* sovrapponibili, suggerisce una forte pressione selettiva esercitata dall'ambiente ospedaliero, che favorisce la convergenza fenotipica verso profili di multiresistenza stabili nel tempo.

La resistenza agli aminoglicosidi, invece, è supportata dalla presenza dei geni *aac(6')Ie-aph(2'')-Ia* e *aph(3')-IIIa*, mentre quella ai macrolidi dal gene *ermB*. La suscettibilità a linezolid in gran parte degli isolati offre un'opzione terapeutica valida, sebbene la comparsa di ceppi resistenti sia già stata segnalata in altri contesti (Suo N et al., 2025).

Relativamente ai fattori di virulenza, un'alta percentuale di isolati ha mostrato la presenza del gene *esp*, associato a maggiore colonizzazione e persistenza negli ambienti ospedalieri e alla formazione di biofilm. Al contrario, i geni *asaI*, *ace* e *gelE*, sono stati identificati con bassa frequenza negli isolati analizzati, in accordo con quanto riportato in un precedente studio (Ghazvinian M et al., 2024).

Per l'analisi della diversità genetica, la PFGE ha identificato 26 pulsotipi distinti, con cluster associati a particolari reparti. L'elevata eterogeneità suggerisce un continuo processo di adattamento alle pressioni selettive in ambito ospedaliero, quali l'uso di antibiotici e la frequente mobilità dei pazienti tra reparti. In particolare, il cluster 14 è risultato prevalente per ceppi da UTI, evidenziando la criticità di tale reparto (Saengsuwan P et al., 2021). Inoltre, la distribuzione temporale dei ceppi all'interno del cluster 14, isolati in mesi differenti, suggerisce una circolazione persistente piuttosto che un singolo evento.

Altri cluster, come 12 e 3, hanno incluso ceppi provenienti da reparti diversi, suggerendo possibili trasmissioni inter-reparto e la presenza di *reservoir* ambientali.

L'analisi MLST ha mostrato ST80 come *type* predominante, coerentemente con recenti studi italiani, ed è associato al *clonal complex* CC17, noto per la sua capacità di trasmissione ospedaliera e di acquisizione di determinanti di resistenza (Cinithi M et al., 2024; Cinithi M et al., 2025). La persistenza di ST80 per gli isolati in differenti periodi suggerisce una stabilizzazione di questo *lineage* all'interno della struttura ospedaliera. La concordanza osservata tra PFGE e MLST, con cluster identificati dalla PFGE perlopiù costituiti da ceppi con medesimo ST, conferma l'affidabilità e la complementarità di queste metodiche nello studio della struttura delle popolazioni batteriche.

I risultati confermano l'importanza di programmi di sorveglianza attiva dei ceppi *E. faecium*, soprattutto in reparti ad alto rischio come UTI, integrando screening dei pazienti, monitoraggio ambientale e analisi molecolari per identificare fonti e vie di trasmissione.

Nel complesso, questi risultati evidenziano come *E. faecium* rappresenti un patogeno altamente adattato all'ambiente ospedaliero, in grado di combinare multiresistenza, persistenza clonale e diffusione inter-reparto. Inoltre, evidenziano la necessità di interventi mirati di *infection prevention and control*, tra cui misure di decontaminazione, formazione del personale e programmi di *antimicrobial stewardship*, per ridurre la diffusione.

7.3. Resistenza agli antibiotici ed epidemiologia molecolare di *S. aureus*

Il lavoro di tesi ha, infine, riguardato la caratterizzazione di 34 ceppi di *S. aureus* isolati da pazienti ricoverati presso il PO *Hub* della Regione Molise, con l'obiettivo di analizzare i profili di antibiotico-resistenza, i determinanti genetici associati e le relazioni tra gli isolati.

L'analisi dei profili di suscettibilità agli antibiotici negli isolati analizzati ha evidenziato un fenotipo MRSA, con una marcata resistenza nei confronti degli antibiotici β -lattamici. In particolare, la totale resistenza osservata verso ampicillina e cefoxitina, come l'elevata percentuale di resistenza a oxacillina e penicillina, è indicativa della presenza diffusa di meccanismi di resistenza mediati dall'alterazione delle proteine leganti la penicillina, in particolare la PBP2a codificata dal gene *mecA* (Lade H et al., 2023). L'utilizzo della cefoxitina come marker fenotipico si è dimostrato pienamente concordante con i risultati molecolari, confermando la sua elevata sensibilità e specificità nell'identificazione dei ceppi MRSA (Amelia S et al., 2023).

L'elevata resistenza nella maggior parte degli isolati verso i fluorochinoloni, come ciprofloxacina e moxifloxacina, è coerente con quanto riportato da studi condotti in ambito ospedaliero (Huynh TQ et al. 2023; Aligholi M et al., 2011). Tale fenomeno è generalmente attribuito all'accumulo di mutazioni puntiformi nei geni *gyrA* e *parC*, nonché all'attivazione di meccanismi accessori, come pompe di efflusso, che contribuiscono allo sviluppo di fenotipi MDR (Huynh TQ et al., 2023). Analogamente, la resistenza agli aminoglicosidi, in particolare alla gentamicina, osservata in una percentuale significativa di ceppi, suggerisce la possibile presenza di AMEs, frequentemente riscontrati nei cloni MRSA di origine nosocomiale (Naderi M et al., 2025).

Al contrario, la sensibilità osservata verso vancomicina, teicoplanina, linezolid, tigeciclina e mupirocina ad alto livello rappresenta un dato incoraggiante dal punto di vista clinico (Ju G et al., 2024). In particolare, l'assenza di ceppi con ridotta suscettibilità o resistenza ai glicopeptidi indica che, nel contesto ospedaliero analizzato, non si è ancora verificata una selezione significativa di fenotipi *Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus* (VISA) o *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus* (VRSA), che invece sono stati segnalati in diverse aree del mondo (Cong Y et al., 2019).

Tuttavia, studi recenti hanno documentato la comparsa di resistenze anche a linezolid e daptomicina in altri contesti, rafforzando l'importanza di un uso prudente e mirato di questi farmaci (Teoh BS et al., 2025).

Un dato di particolare interesse è rappresentato dalla totale sensibilità dei ceppi testati alla ceftarolina. Questo risultato è in linea con la letteratura, che descrive tale molecola come una cefalosporina di quinta generazione sviluppata specificamente per superare la resistenza mediata da *mecA*, grazie alla sua elevata affinità per la PBP2a (Sallam HH et al., 2025). La conservata efficacia di questo

antibiotico suggerisce un utilizzo ancora limitato nella pratica clinica locale, con conseguente ridotta pressione selettiva (Alomair SM et al., 2025).

Sebbene siano stati identificati 22 resistotipi, che indicano un'elevata diversità nei *pattern* di resistenza antimicrobica, sono risultati predominanti i resistotipi R3, R8 e R10, per oltre la metà degli isolati, indicando la presenza di *pattern* di resistenza consolidati, probabilmente selezionati nel tempo dall'uso prolungato di specifiche classi antibiotiche.

L'elevato numero di cluster identificati con la PFGE, insieme a 33 pulsotipi, evidenzia un'elevata diversità genetica tra i ceppi. Ciononostante, i cluster 12 e 4, sono stati i più rappresentati. Il cluster 12, con ceppi isolati da differenti reparti e campioni in un arco temporale di diversi mesi, indica verosimilmente una circolazione prolungata nella struttura ospedaliera.

I ceppi appartenenti allo stesso cluster hanno, tuttavia, presentato profili di antibiotico-resistenza differenti, suggerendo una persistenza o trasmissione continua di ceppi geneticamente correlati ma fenotipicamente distinti, che tuttavia evidenzia la capacità di *S. aureus* di modulare il proprio resistoma.

Il cluster 4, che ha incluso isolati provenienti prevalentemente dal reparto di patologia neonatale, rappresenta un ulteriore elemento di interesse epidemiologico, considerando l'elevata vulnerabilità dei pazienti. Anche in questo caso, la discordanza tra correlazione genetica e resistotipi suggerisce che l'evoluzione fenotipica possa avvenire rapidamente, anche all'interno di ceppi strettamente correlati.

Nel complesso, i dati PFGE supportano l'ipotesi di una circolazione policlonale di MRSA, piuttosto che la diffusione di un singolo clone dominante, in accordo con quanto riportato in altri studi condotti in contesti ospedalieri italiani ed europei (Mammina C et al., 2012). Recenti evidenze hanno, inoltre, documentato la crescente diffusione di cloni comunitari, caratterizzati da elevata trasmissibilità e presenza del gene *PVL*, che sempre più spesso penetrano anche in ambito ospedaliero, complicando ulteriormente le strategie di prevenzione e controllo delle infezioni (Kaneko H et al., 2023).

La caratterizzazione molecolare ha evidenziato la presenza del gene *mecA* in tutti i ceppi MRSA, mentre la totale assenza di *mecC* è coerente con la sua bassa prevalenza in ambito clinico in Italia, dove questo determinante è principalmente associato a ceppi di origine zoonotica o ambientale.

La rilevazione del gene *PVL* in un numero limitato di ceppi conferma una contenuta circolazione di quelli ad elevata virulenza. Tuttavia, l'associazione esclusiva di *PVL* con *spa* type t008 è un dato di rilevanza epidemiologica, essendo frequentemente associato a cloni comunitari, noti per causare infezioni cutanee e dei tessuti molli, ma sempre più spesso implicati anche in infezioni invasive in ambito ospedaliero, come polmoniti necrotizzanti e sepsi, in particolare nei pazienti immunocompromessi (Hanawa T et al., 2020; Vittorakis E et al., 2023). La presenza di ceppi *PVL*-

positivi in campioni clinici suggerisce una progressiva sovrapposizione tra ceppi comunitari e ospedalieri, già documentato in diversi Paesi europei e nordamericani, dove cloni come USA300 hanno mostrato una notevole capacità di diffusione e adattamento all'ambiente ospedaliero (Navidinia M et al., 2023).

Questo dato sottolinea la necessità di un monitoraggio continuo, poiché l'introduzione di cloni comunitari ad alta virulenza in contesti ospedalieri può complicare ulteriormente l'implementazione di strategie di controllo delle infezioni e aumentare il rischio di focolai epidemici.

Infine, l'analisi del gene *spa* ha permesso di ottenere una suddivisione dei 34 ceppi in otto *spa* type distinti, evidenziando una struttura genetica eterogenea ma dominata da pochi tipi prevalenti.

Questa distribuzione riflette la coesistenza, all'interno della struttura ospedaliera, di cloni tipicamente associati sia all'ambiente nosocomiale sia a quello comunitario.

Lo *spa* type t002, associato principalmente a ST5 e ST21, è uno dei più diffusi a livello globale nei contesti ospedalieri (Mollerup S et al., 2022). ST5, in particolare, rappresenta uno dei cloni MRSA più consolidati in ambito clinico, spesso correlato a elevata resistenza antimicrobica e capacità di persistenza ambientale. Il secondo *spa* type più rappresentato, t008, è classicamente associato a ST8, uno dei cloni più noti a livello internazionale, comprendente anche il *lineage* USA300 (García-Cobos S et al., 2025). La diffusione di t008 in diversi reparti indica che tali ceppi non costituiscono episodi sporadici, ma potrebbero aver acquisito una certa capacità di adattamento all'ambiente ospedaliero, come già documentato in altri Paesi.

Nel complesso, i risultati dello *spa* typing confermano quanto già emerso dalle analisi PFGE: la popolazione MRSA circolante nella struttura ospedaliera è risultata fortemente eterogenea, con una sovrapposizione tra ceppi di origine comunitaria e ospedaliera, fenomeno ormai riconosciuto e potenzialmente in grado di complicare le strategie di controllo delle infezioni.

8. Conclusioni

L'antibiotico-resistenza continua ad essere una delle sfide sanitarie più gravi a livello globale, con effetti rilevanti soprattutto nelle strutture ospedaliere, dove il rischio di diffusione di ICA da batteri MDR è amplificato dalla presenza di pazienti vulnerabili e dall'uso di antibiotici. L'emergenza legata a organismi MDR impone l'adozione di strategie di controllo più sofisticate. In tale contesto, l'approccio integrato con metodiche molecolari è ritenuto fondamentale per monitorare e comprendere l'evoluzione dell'AMR, consentendo l'identificazione tempestiva di ceppi ad alto rischio e l'implementazione di misure di controllo efficaci.

Il lavoro di tesi si è focalizzato su tre patogeni di particolare importanza per le ICA, quali *P. aeruginosa*, *E. faecium* e *S. aureus*. I risultati evidenziano un panorama epidemiologico complesso e preoccupante, con la circolazione di ceppi MDR che, in molti casi, sono anche riconducibili a cloni di interesse internazionale. Ciò conferma che, anche a livello locale, la diffusione di patogeni MDR è un fenomeno in crescita che richiede una continua e attenta sorveglianza.

In particolare, l'analisi dei ceppi di *P. aeruginosa* ha rivelato che sia gli isolati clinici che quelli ambientali presentano profili MDR simili, con la presenza di correlazioni clonali significative che rafforza l'ipotesi di un ruolo attivo delle superfici, dei lavandini e dei sifoni come *reservoir* persistenti, coerentemente con quanto riportato in letteratura, dove la trasmissione attraverso aerosol, goccioline contaminate e biofilm è stata ampiamente documentata.

La rilevazione di resistenze estese verso β -lattamici, fluorochinoloni e carbapenemi, in linea con i dati epidemiologici nazionali, ha evidenziato la circolazione di ceppi MDR in reparti ad alto rischio, come TIN e UTI. In questo contesto, la presenza di resistenze multiple anche verso antibiotici di ultima linea, come i carbapenemi, suggerisce un contributo combinato di meccanismi di resistenza acquisita, dovuta a integroni e plasmidi, e adattativa, quali l'iper-espressione di pompe di efflusso e la modulazione della permeabilità della membrana esterna.

Inoltre, l'analisi mediante PFGE ha evidenziato un'elevata variabilità genetica, ma ha anche individuato cluster composti da isolati clinici e ambientali, indicativi di una circolazione inter-reparto e di un coinvolgimento diretto delle reti idriche e delle superfici come punti critici di contaminazione. L'integrazione della PFGE con metodiche *PCR-based* (ERIC-PCR e RAPD-PCR) ha ulteriormente rafforzato l'interpretazione dei dati, mostrando concordanza nella classificazione di diversi isolati e confermando la presenza di cluster epidemiologicamente rilevanti.

Infine, l'identificazione di ST ad alto rischio (*high-risk clones*), noti per la loro elevata capacità di diffusione, persistenza ambientale e associazione con profili di multiresistenza, sottolinea la necessità di intensificare i programmi di sorveglianza, al fine di prevenire l'emergenza e la diffusione di varianti rilevanti dal punto di vista clinico ed epidemiologico.

La coesistenza di cloni ambientali persistenti e di cloni ad alto rischio clinicamente rilevanti evidenzia, inoltre, come l'AMR in *P. aeruginosa* non sia un fenomeno statico, ma il risultato di una continua evoluzione guidata dall'interazione tra ambiente, pressione antibiotica e plasticità genomica. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il contenimento di *P. aeruginosa* richiede un approccio integrato, in cui la sorveglianza attiva, il monitoraggio delle reti idriche, la gestione dei biofilm e gli interventi strutturali mirati, come la sostituzione di lavandini e sifoni, assumono un ruolo centrale. In particolare, la combinazione di misure ambientali, organizzative e microbiologiche consentirebbe di limitare la persistenza di tali ceppi e prevenire la loro diffusione nei reparti più vulnerabili.

Nel caso di *E. faecium*, i profili osservati nei ceppi analizzati hanno evidenziato fenotipi MDR, con resistenze estese a β -lattamici, macrolidi, aminoglicosidi, carbapenemi e sulfamidici. La presenza diffusa di geni come *vanA*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(3')-IIIa* ed *ermB* conferma un *background* genetico orientato alla resistenza, mentre l'assenza del gene *pbp5* nei ceppi ampicillino-resistenti suggerisce il possibile coinvolgimento di meccanismi alternativi, come mutazioni puntiformi o modificazioni nella regolazione della sintesi della parete cellulare. Nel complesso, questi elementi delineano un quadro di resistenza sostenuto da una combinazione di meccanismi acquisiti e adattativi che favoriscono la sopravvivenza del patogeno in contesti ad alta pressione antibiotica.

I risultati hanno delineato una predominanza di ST80, appartenente al complesso clonale CC17, che si caratterizza per la prolungata capacità di colonizzazione intestinale e frequente associazione con fenotipi VRE. Inoltre, la presenza di ceppi con ST1478 e ST2164 suggerisce la presenza di cloni emergenti, caratterizzati da una marcata adattabilità all'ambiente ospedaliero e da profili di multiresistenza. In particolare, ST1478 è stato descritto come un *lineage* ad alto rischio, frequentemente associato a ceppi VRE *vanA*-positivi e coinvolto nella trasmissione ospedaliera. Infine, ST2164 condivide molte delle caratteristiche dei cloni ospedalieri del CC17, tra cui la capacità di persistenza nell'ambiente e di acquisizione di determinanti di resistenza aggiuntivi.

Inoltre, l'analisi mediante PFGE ha fornito un contributo fondamentale per comprendere le dinamiche di diffusione di *E. faecium* all'interno dell'ospedale. Sebbene sia stata evidenziata un'elevata eterogeneità genetica, con la presenza di numerosi pulsotipi distinti, sono stati osservati cluster ben definiti che hanno raggruppato ceppi isolati in periodi ravvicinati o in specifici reparti, in particolare in UTI.

La presenza di tali cluster suggerisce la possibile persistenza di ceppi clonali nell'ambiente ospedaliero, verosimilmente sostenuta da *reservoir* ambientali o da trasferimenti inter-reparto di pazienti colonizzati.

In alcuni casi, l'ampia distribuzione temporale di isolati appartenenti allo stesso cluster suggerisce la presenza di ceppi endemici, capaci di circolare per periodi prolungati nello stesso reparto, mentre in altri casi la comparsa simultanea di cloni in reparti diversi potrebbe riflettere eventi di trasmissione crociata.

La concordanza osservata tra PFGE e MLST, con cluster composti da ceppi appartenenti allo stesso ST, supporta l'importanza dell'approccio combinato e sottolinea come la PFGE, grazie all'elevato potere discriminante, rappresenti ancora uno strumento essenziale per distinguere varianti clonali all'interno dello stesso *lineage*.

La capacità della PFGE di rilevare differenze minime tra ceppi strettamente correlati la rende particolarmente utile per identificare eventi di trasmissione recente, ricostruire catene epidemiologiche e individuare potenziali focolai.

Infine, per *S. aureus*, la presenza di ceppi MRSA e l'eterogeneità genetica confermano la circolazione di ceppi anche legati a cloni di grande diffusione a livello ospedaliero. L'elevata resistenza ai β -lattamici, associata alla diffusione ubiquitaria del gene *mecA*, evidenzia la persistenza di meccanismi di resistenza consolidati, mentre i livelli di multiresistenza osservati verso fluorochinoloni e aminoglicosidi riflettono la pressione selettiva tipica dei contesti clinici.

Dal punto di vista epidemiologico, i risultati ottenuti delineano un quadro di circolazione policlonale, caratterizzato dalla coesistenza di cloni sia ospedalieri sia tipicamente comunitari.

Infatti, la rilevazione di ceppi *PVL*-positivi, esclusivamente all'interno dello *spa* type t008, conferma l'ingresso e la progressiva integrazione di ceppi comunitari ad elevata virulenza nell'ambiente ospedaliero, che è potenzialmente in grado di aumentare la complessità gestionale delle infezioni.

Inoltre, la presenza di cluster persistenti rilevati dalla PFGE indica che ceppi correlati tra loro continuano a circolare nel tempo e possono modificare rapidamente il loro profilo di resistenza, come mostrato dalle differenze nei resistotipi all'interno degli stessi cluster. Tale dinamica sottolinea l'importanza di un monitoraggio continuo, finalizzato ad identificare tempestivamente eventuali focolai e a comprendere l'evoluzione dei profili di resistenza e la diffusione dei diversi *lineage*.

Nel complesso, i risultati di questo studio evidenziano l'urgenza di implementare misure di prevenzione e controllo delle infezioni, tra cui strategie di *stewardship antibiotica*. Inoltre, l'analisi integrata della resistenza e dei metodi molecolari è fondamentale per comprendere le dinamiche di diffusione dei patogeni multiresistenti.

In conclusione, l'approccio adottato, che ha integrato dati di epidemiologia molecolare all'epidemiologia classica e alla caratterizzazione della resistenza negli isolati, si conferma uno strumento essenziale per tracciare le vie di trasmissione dei ceppi, nonché rappresenta un contributo

concreto alla comprensione delle dinamiche locali di diffusione dei principali patogeni ospedalieri. Tale integrazione consente di supportare decisioni cliniche e gestionali più consapevoli.

I risultati sottolineano, inoltre, come un approccio che includa sorveglianza continua, monitoraggio dell'ambiente ospedaliero, ottimizzazione dell'uso degli antibiotici, formazione del personale sanitario e coinvolgimento attivo dei reparti ad alto rischio, rappresenta la chiave per contrastare l'AMR.

In prospettiva, le tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS) e l'analisi genomica (WGS) si ritengono fondamentali per una caratterizzazione più dettagliata delle varianti genetiche, della loro evoluzione e delle dinamiche di trasmissione. L'impiego del WGS, infatti, consentirebbe di tracciare le mutazioni associate alla resistenza, identificando meccanismi ancora poco compresi, come l'acquisizione di determinanti tramite plasmidi, trasposoni o altri elementi mobili. Potrebbe, inoltre, fornire informazioni utili per chiarire lo sviluppo di varianti adattative in ambiente ospedalieri, migliorando la capacità di monitorare e prevenire l'emergere di nuove resistenze.

Quindi, l'integrazione dei dati genomici con sistemi di sorveglianza in tempo reale e piattaforme di epidemiologia digitale permetterebbe una risposta più tempestiva ai focolai, mentre l'applicazione di algoritmi di *machine learning* e intelligenza artificiale potrebbe ottimizzare la predizione delle varianti emergenti e supportare strategie di controllo sempre più mirate.

Infine, il rafforzamento della cooperazione tra laboratori nella condivisione dei dati genomici è considerato essenziale per costruire banche dati globali utili a studi di epidemiologia molecolare su larga scala.

9. Bibliografia

- Abban MK, Ayerakwa EA, Mosi L, et al. The burden of hospital acquired infections and antimicrobial resistance. *Heliyon*. 2023;9(10):e20561. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e20561
- Agenzia Italiana del Farmaco. Strategie avanzate per lo sviluppo di antibiotici innovativi. *Notizia AIFA*. Accessed August 26, 2025. Available from: <https://www.aifa.gov.it/-/strategie-avanzate-per-lo-sviluppo-di-antibiotici-innovativi>
- Aligholi M, Mirsalehian A, Halimi S, et al. Phenotypic and genotypic evaluation of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in Tehran. *Med Sci Monit*. 2011;17(9):PH71-PH74. doi:10.12659/msm.881920
- Alomair SM, Sulaiman KA, Khayyat T, et al. Successful treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis and persistent bacteremia using adjunctive ceftaroline fosamil to vancomycin: A case report. *IDCases*. 2025;42:e02437. doi:10.1016/j.idcr.2025.e02437
- Alshagrawi S, Alhodaithy N. Determinants of hand hygiene compliance among healthcare workers in intensive care units: a qualitative study. *BMC Public Health*. 2024;24(1):2333. doi:10.1186/s12889-024-19461-2
- Amelia S, Rozi MF, Balatif R. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using modified conventional cefoxitin-based media as an alternative screening. *J Pure Appl Microbiol*. 2023;17(3):1429-1434. doi:10.22207/JPAM.17.3.01
- Anderson M, Panteli D, van Kessel R, et al. Challenges and opportunities for incentivising antibiotic research and development in Europe. *Lancet Reg Health Eur*. 2023;33:100705. doi:10.1016/j.lanepe.2023.100705
- Anello P, Vianello S, Baldo V, et al. Antimicrobial Stewardship and Infection Prevention and Control in the Veneto Region, Northeastern Italy: Governance Models, Resources, and Key Challenges Across Hospital and Community Settings-Findings from the ARCO Project. *Microorganisms*. 2025;13(2):405. doi:10.3390/microorganisms13020405
- Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*. 2022;399(10325):629-655. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- Antonelli A, Ales ME, Chiecca G, et al. Healthcare-associated infections and antimicrobial use in acute care hospitals: a point prevalence survey in Lombardy, Italy, in 2022. *BMC Infect Dis*. 2024;24(1):632. doi:10.1186/s12879-024-09487-7

- Arredondo-Alonso S, Top J, McNally A, et al. Plasmids Shaped the Recent Emergence of the Major Nosocomial Pathogen *Enterococcus faecium*. *mBio*. 2020;11(1):e03284-19. doi:10.1128/mBio.03284-19
- Asghar S, Atif M, Masood I, et al. A comprehensive review of current status of infection prevention and control program in low- and middle-income countries. *Infect Dis Health*. 2025;30(3):260-283. doi:10.1016/j.idh.2025.03.005
- Aslam B, Khurshid M, Arshad MI, et al. Antibiotic Resistance: One Health One World Outlook. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:771510. doi:10.3389/fcimb.2021.771510
- Atchade E, De Tymowski C, Grall N, et al. Toxic Shock Syndrome: A Literature Review. *Antibiotics (Basel)*. 2024;13(1):96. doi:10.3390/antibiotics13010096
- Ayobami O, Brinkwirth S, Eckmanns T, et al. Antibiotic resistance in hospital-acquired ESKAPE-E infections in low- and lower-middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *Emerg Microbes Infect*. 2022;11(1):443-451. doi:10.1080/22221751.2022.2030196
- Auda IG, Al-Kadmy IM, Kareem SM, et al. RAPD- and ERIC-Based Typing of Clinical and Environmental *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *J AOAC Int*. 2017;100(2):532-536. doi:10.5740/jaoacint.16-0267
- Avakh A, Grant GD, Cheesman MJ, et al. The Art of War with *Pseudomonas aeruginosa*: Targeting Mex Efflux Pumps Directly to Strategically Enhance Antipseudomonal Drug Efficacy. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(8):1304. doi:10.3390/antibiotics12081304
- Ballash GA, Parker EM, Mollenkopf DF, et al. The One Health dissemination of antimicrobial resistance occurs in both natural and clinical environments. *J Am Vet Med Assoc*. 2024;262(4):451-458. doi:10.2460/javma.24.01.0056
- Baltogianni M, Giapros V, Kosmeri C. Antibiotic Resistance and Biofilm Infections in the NICUs and Methods to Combat It. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(2):352. doi:10.3390/antibiotics12020352
- Banerjee R, Patel R. Molecular diagnostics for genotypic detection of antibiotic resistance: current landscape and future directions. *JAC Antimicrob Resist*. 2023;5(1):dlad018. doi:10.1093/jacamr/dlad018
- Bardají-Carrillo M, Martín-Fernández M, López-Herrero R, et al. Post-operative sepsis-induced acute respiratory distress syndrome: risk factors for a life-threatening complication. *Front Med (Lausanne)*. 2024;11:1338542. doi:10.3389/fmed.2024.1338542
- Barmpouni M, Gordon JP, Miller RL, et al. Clinical and Economic Value of Reducing Antimicrobial Resistance in the Management of Hospital-Acquired Infections with Limited

Treatment Options in Greece. *Infect Dis Ther.* 2023;12(7):1891-1905. doi:10.1007/s40121-023-00837-7

- Bartels MD, Petersen A, Worning P, et al. Comparing whole-genome sequencing with Sanger sequencing for spa typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(12):4305-4308. doi:10.1128/JCM.01979-14
- Bazaid AS, Punjabi AA, Aldarhami A, et al. Bacterial Infections among Patients with Chronic Diseases at a Tertiary Care Hospital in Saudi Arabia. *Microorganisms.* 2022;10(10):1907. doi:10.3390/microorganisms10101907
- Bear A, Locke T, Rowland-Jones S, et al. The immune evasion roles of *Staphylococcus aureus* protein A and impact on vaccine development. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023;13:1242702. doi:10.3389/fcimb.2023.1242702
- Becker K, Ballhausen B, Köck R, et al. Methicillin resistance in *Staphylococcus* isolates: the "mec alphabet" with specific consideration of mecC, a mec homolog associated with zoonotic *S. aureus* lineages. *Int J Med Microbiol.* 2014;304(7):794-804. doi:10.1016/j.ijmm.2014.06.007
- Beenken KE, Smeltzer MS. *Staphylococcus aureus* Biofilm-Associated Infections: Have We Found a Clinically Relevant Target?. *Microorganisms.* 2025;13(4):852. doi:10.3390/microorganisms13040852
- Belay WY, Getachew M, Tegegne BA, et al. Mechanism of antibacterial resistance, strategies and next-generation antimicrobials to contain antimicrobial resistance: a review. *Front Pharmacol.* 2024;15:1444781. doi:10.3389/fphar.2024.1444781
- Ben-Amram H, Azrad M, Cohen-Assodi J, et al. Biofilm Formation by Hospital-Acquired Resistant Bacteria Isolated from Respiratory Samples. *J Epidemiol Glob Health.* 2024;14(2):291-297. doi:10.1007/s44197-024-00215-7
- Besser J. Pulsed-field gel electrophoresis for disease monitoring and control. *Methods Mol Biol.* 2015;1301:3-7. doi:10.1007/978-1-4939-2599-5_1
- Bhat BA, Mir RA, Qadri H, et al. Integrins in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. *Front Microbiol.* 2023;14:1231938. doi:10.3389/fmicb.2023.1231938
- Biggs HM, Li R, Jackson KA, et al. Trends in Incidence and Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia, Six Emerging Infections Program Surveillance Sites, 2005-2022. *Open Forum Infect Dis.* 2025;12(6):ofaf282. doi:10.1093/ofid/ofaf282
- Blot S, Ruppé E, Harbarth S, et al. Healthcare-associated infections in adult intensive care unit patients: Changes in epidemiology, diagnosis, prevention and contributions of new technologies. *Intensive Crit Care Nurs.* 2022;70:103227. doi:10.1016/j.iccn.2022.103227

- Bo L, Sun H, Li YD, et al. Combating antimicrobial resistance: the silent war. *Front Pharmacol*. 2024;15:1347750. doi:10.3389/fphar.2024.1347750
- Boccella M, Santella B, Pagliano P, et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species: A Retrospective Cohort Study in Italy. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(12):1552. doi:10.3390/antibiotics10121552
- Booton RD, Meeyai A, Alhusein N, et al. One Health drivers of antibacterial resistance: Quantifying the relative impacts of human, animal and environmental use and transmission. *One Health*. 2021;12:100220. doi:10.1016/j.onehlt.2021.100220
- Bonnet M, Lagier JC, Raoult D, et al. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect*. 2019;34:100622. doi:10.1016/j.nmni.2019.100622
- Bouhrour N, Nibbering PH, Bendali F. Medical Device-Associated Biofilm Infections and Multidrug-Resistant Pathogens. *Pathogens*. 2024;13(5):393. doi:10.3390/pathogens13050393
- Brdová D, Ruml T, Viktorová J. Mechanism of staphylococcal resistance to clinically relevant antibiotics. *Drug Resist Updat*. 2024;77:101147. doi:10.1016/j.drug.2024.101147
- Calderaro A, Chezzi C. MALDI-TOF MS: A Reliable Tool in the Real Life of the Clinical Microbiology Laboratory. *Microorganisms*. 2024;12(2):322. doi:10.3390/microorganisms12020322
- Camacho-Cruz J, Gutiérrez IF, Brand-López K, et al. Differences Between Methicillin-susceptible Versus Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Infections in Pediatrics: Multicenter Cohort Study Conducted in Bogotá, Colombia, 2014-2018. *Pediatr Infect Dis J*. 2022;41(1):12-19. doi:10.1097/INF.0000000000003349
- Cella E, Giovanetti M, Benedetti F, et al. Joining Forces against Antibiotic Resistance: The One Health Solution. *Pathogens*. 2023;12(9):1074. doi:10.3390/pathogens12091074
- Centers for Disease Control and Prevention. Healthcare-Associated Infections. Atlanta, GA: CDC; 2025a. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.cdc.gov/healthcare-associated-infections/about/index.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. Unified Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Protocol for Gram-Positive Bacteria; 2025b. Accessed November 24, 2025. Available from: https://www.cdc.gov/healthcare-associated-infections/media/pdfs/Unified_PFGE_Protocol.pdf
- Chadha J, Harjai K, Chhibber S. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environ Microbiol*. 2022;24(6):2630-2656. doi:10.1111/1462-2920.15784

- Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 2021;12(1):547-569. doi:10.1080/21505594.2021.1878688
- Chhabra S, Taksande AB, Munjewar P. The Penicillin Pioneer: Alexander Fleming's Journey to a Medical Breakthrough. *Cureus*. 2024; 16(7):e65179. doi:10.7759/cureus.65179
- Ciapponi A, Bardach A, Sandoval MM, et al. Systematic Review and Meta-analysis of Deaths Attributable to Antimicrobial Resistance, Latin America. *Emerg Infect Dis*. 2023;29(11):2335-2344. doi:10.3201/eid2911.230753
- Cinthi M, Coccitto SN, Simoni S, et al. Molecular Characterization of Enterococcus faecium Clinical Isolates Harboring erm (T) from an Italian Hospital. *Curr Microbiol*. 2024;81(12):431. Published 2024 Oct 29. doi:10.1007/s00284-024-03968-3
- Cinthi M, Coccitto SN, Simoni S, et al. The optrA, cfr(D) and vanA genes are co-located on linear plasmids in linezolid- and vancomycin-resistant enterococcal clinical isolates in Italy. *J Antimicrob Chemother*. 2025;80(5):1362-1370. doi:10.1093/jac/dkaf082
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 34th edition*. Malvern, PA: CLSI; 2024. Accessed November 27, 2025. Available from: <https://clsi.org/standards-development/specialty-areas/antimicrobial-susceptibility-testing>
- Commissione Europea. Azione dell'UE sulla resistenza antimicrobica. Bruxelles: Commissione Europea; 2017. Accessed August 21, 2025. Available from: https://health.ec.europa.eu/antimicrobial-resistance/eu-action-antimicrobial-resistance_it#piano-dazione-dellue-one-health-del-2017-contro-la-resistenza-antimicrobica
- Cong Y, Yang S, Rao X. Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infections: A review of case updating and clinical features. *J Adv Res*. 2019;21:169-176. doi:10.1016/j.jare.2019.10.005
- Corona-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leños-Miranda B, et al. Epidemiologic Study of Pseudomonas aeruginosa in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res*. 2001;32(3):238-242. doi:10.1016/s0188-4409(01)00267-3
- Council of the European Union. Council Recommendation on stepping up EU actions to combat antimicrobial resistance in a One Health approach. Official Journal of the European Union. 2023; C 220:1–20. Accessed August 21, 2025. Available from: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32023H0622\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:32023H0622(01))
- Cristina ML, Spagnolo AM, Giribone L, et al. Epidemiology and Prevention of Healthcare-Associated Infections in Geriatric Patients: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(10):5333. doi:10.3390/ijerph18105333

- Crivaro V, Di Popolo A, Caprio A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: molecular epidemiology and infection control measures. *BMC Infect Dis.* 2009;9:70. doi:10.1186/1471-2334-9-70
- Curran B, Jonas D, Grundmann H, et al. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2004;42(12):5644-5649. doi:10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004
- Dadi NCT, Radochová B, Vargová J, et al. Impact of Healthcare-Associated Infections Connected to Medical Devices-An Update. *Microorganisms.* 2021;9(11):2332. doi:10.3390/microorganisms9112332
- de Grooth HJ, Hagel S, Mimoz O. Central venous catheter insertion site and infection prevention in 2024. *Intensive Care Med.* 2024;50(11):1897-1899. doi:10.1007/s00134-024-07664-5
- De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(3):e00181-19. doi:10.1128/CMR.00181-19
- De Waele JJ, Akova M, Antonelli M, et al. Antimicrobial resistance and antibiotic stewardship programs in the ICU: insistence and persistence in the fight against resistance. A position statement from ESICM/ESCMID/WAAAR round table on multi-drug resistance. *Intensive Care Med.* 2018;44(2):189-196. doi:10.1007/s00134-017-5036-1
- Delpy L, Astbury CC, Aenishaenslin C, et al. Integrated surveillance systems for antibiotic resistance in a One Health context: a scoping review. *BMC Public Health.* 2024;24(1):1717. doi:10.1186/s12889-024-19158-6
- Denissen J, Reyneke B, Waso-Reyneke M, et al. Prevalence of ESKAPE pathogens in the environment: Antibiotic resistance status, community-acquired infection and risk to human health. *Int J Hyg Environ Health.* 2022;244:114006. doi:10.1016/j.ijheh.2022.114006
- Di Bella S, Marini B, Stroffolini G, et al. The virulence toolkit of *Staphylococcus aureus*: a comprehensive review of toxin diversity, molecular mechanisms, and clinical implications. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2025;44(8):1797-1816. doi:10.1007/s10096-025-05148-y
- Di KN, Pham DT, Tee TS, et al. Antibiotic usage and resistance in animal production in Vietnam: a review of existing literature. *Trop Anim Health Prod.* 2021;53(3):340. doi:10.1007/s11250-021-02780-6
- Djordjevic SP, Jarocki VM, Seemann T, et al. Genomic surveillance for antimicrobial resistance - a One Health perspective. *Nat Rev Genet.* 2024;25(2):142-157. doi:10.1038/s41576-023-00649-y

- Donà D, Barbieri E, Daverio M, et al. Implementation and impact of pediatric antimicrobial stewardship programs: a systematic scoping review. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):3. doi:10.1186/s13756-019-0659-3
- Dylağ M, Filipić B, Augustyniak D, et al. Editorial: Research implications on microbial virulence factors, resistance, and new therapeutic strategies in the context of future infectious disease therapies. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024;14:1406119. doi:10.3389/fcimb.2024.1406119
- Eichel VM, Last K, Brühwasser C, et al. Epidemiology and outcomes of vancomycin-resistant enterococcus infections: a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect*. 2023;141:119-128. doi:10.1016/j.jhin.2023.09.008
- Elbaiomy RG, El-Sappah AH, Guo R, et al. Antibiotic Resistance: A Genetic and Physiological Perspective. *MedComm (2020)*. 2025;6(11):e70447. doi:10.1002/mco2.70447
- Elfadadny A, Ragab RF, AlHarbi M, et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: navigating clinical impacts, current resistance trends, and innovations in breaking therapies. *Front Microbiol*. 2024;15:1374466. doi:10.3389/fmicb.2024.1374466
- Elbehiry A, Marzouk E, Abalkhail A, et al. Detection of antimicrobial resistance via state-of-the-art technologies versus conventional methods. *Front Microbiol*. 2025;16:1549044. doi:10.3389/fmicb.2025.1549044
- Emaneini M, Kalantar-Neyestanaki D, Jabalameli L, et al. Molecular analysis and antimicrobial resistance pattern of distinct strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Iran. *Iran J Microbiol*. 2019;11(2):98-107.
- Epicentro. Infezioni correlate all'assistenza. Istituto Superiore di Sanità. 2025a; Accessed November 20, 2025. Available from: <https://www.epicentro.iss.it/infezioni-correlate/>.
- Epicentro. Istituto Superiore di Sanità. *Il sistema di sorveglianza AR-ISS*. Rome: ISS; 2024b. Accessed November 26, 2025. Available from: <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss>
- Esme M, Topeli A, Yavuz BB, et al. Infections in the Elderly Critically-Ill Patients. *Front Med (Lausanne)*. 2019;6:118. doi:10.3389/fmed.2019.00118
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2025a. Accessed August 19, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Time to act and not react: how can the European Union turn the tide of antimicrobial resistance?* Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2025b. Accessed November 18, 2025. Available from:

<https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/time-act-and-not-react-how-can-european-union-turn-tide-antimicrobial-resistance>

- European Centre for Disease Prevention and Control. *Carbapenem-resistant Enterobacterales, third update – 3 February 2025*. Stockholm: ECDC; 2025c. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/carbapenem-resistant-enterobacterales-third-update>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European long-term care facilities*. Stockholm: ECDC; 2025d. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/PPS-HAI-AMR-LCTF.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Healthcare-associated infections acquired in intensive care units*. Updated June 16, 2025e. Accessed August 27, 2025. <https://www.ecdc.europa.eu/en/healthcare-associated-infections-acquired-intensive-care-units>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals*. Stockholm: ECDC; 2024f. Accessed August 27, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/point-prevalence-survey-healthcare-associated-infections-and-antimicrobial-use-european-acute-care-hospitals>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Clostridioides difficile infections*. Stockholm: ECDC; 2025g. Accessed August 22, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/clostridioides-difficile-infections>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) – Annual Epidemiological Report 2024*. Stockholm: ECDC; 2025h. Accessed October 31, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/antimicrobial-resistance-eu-annual-epidemiological-report-2024.pdf>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net report 2023)*. Stockholm: ECDC; 2024i. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2023>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0*. 2023. Accessed June 3, 2023. Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Clinical breakpoint tables v.15.0*. Basel: EUCAST; 2025. Accessed November 27, 2025. Available from: <https://www.eucast.org/bacteria/clinical-breakpoints-and-interpretation/clinical-breakpoint-tables>
- European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance (EURL-AR). *PCR amplification of mecA, mecC, PVL, and spa: MRSA Multiplex PCR 2. Version 3.1*. April 2024. Available from: https://www.food.dtu.dk/english/-/media/institutter/foedevareinstituttet/temaer/antibiotikaresistens/eurl-ar/protocols/mrsa/2_716_mrsa-pcr-2-v3-1.pdf
- Ferraz MP. Antimicrobial Resistance: The Impact from and on Society According to One Health Approach. *Societies*. 2024; 14(9):187. <https://doi.org/10.3390/soc14090187>
- Fioriti S, Simoni S, Caucci S, et al. Trend of clinical vancomycin-resistant enterococci isolated in a regional Italian hospital from 2001 to 2018. *Braz J Microbiol*. 2020;51(4):1607-1613. doi:10.1007/s42770-020-00360-8
- Food and Agriculture Organization of the United Nations; United Nations Environment Programme; World Health Organization; World Organisation for Animal Health. *One Health Joint Plan of Action (2022–2026): Working together for the health of humans, animals, plants and the environment*. Rome: FAO; 2022. ISBN: 978-92-5-136957-9. Accessed August 20, 2025. Available from: <https://doi.org/10.4060/cc2289en>
- Flores-Treviño S. Antimicrobial Resistance and Hospital- and Community-Associated Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2025;14(5):514. doi:10.3390/antibiotics14050514
- Gambrill B, Pertusati F, Hughes SF, et al. Materials-based incidence of urinary catheter associated urinary tract infections and the causative micro-organisms: systematic review and meta-analysis. *BMC Urol*. 2024;24(1):186. doi:10.1186/s12894-024-01565-x
- García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(8):595-603. doi:10.1016/S1473-3099(11)70126-8
- García-Cobos S, Seco Alberca N, Bravo-Queipo-de-Llano B, et al. Genomic analysis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) causing infections in children-a Spanish multicenter study. *Front Microbiol*. 2025;16:1534840. doi:10.3389/fmicb.2025.1534840
- Gastmeier P. From 'one size fits all' to personalized infection prevention. *J Hosp Infect*. 2020;104(3):256-260. doi:10.1016/j.jhin.2019.12.010

- Gawey BJ, Khanna S. Clostridioides *difficile* Infection: Landscape and Microbiome Therapeutics. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2023;19(6):319-328.
- GBD 2021 Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance 1990-2021: a systematic analysis with forecasts to 2050. *Lancet*. 2024;404(10459):1199-1226. doi:10.1016/S0140-6736(24)01867-1
- Ghazvinian M, Asgharzadeh Marghmalek S, Gholami M, et al. Antimicrobial resistance patterns, virulence genes, and biofilm formation in enterococci strains collected from different sources. *BMC Infect Dis*. 2024;24(1):274. doi:10.1186/s12879-024-09117-2
- Giamarellou H, Galani L, Karavasilis T, et al. Antimicrobial Stewardship in the Hospital Setting: A Narrative Review. *Antibiotics (Basel)*. 2023;12(10):1557. doi:10.3390/antibiotics12101557
- Glasgow HL, Zheng Y, Brazelton JN, et al. Comparison of core genome multi-locus sequencing typing pipelines for hospital outbreak detection of common bacterial pathogens. *J Clin Microbiol*. 2025;63(10):e0064625. doi:10.1128/jcm.00646-25
- Gök ŞM, Türk Dağı H, Kara F, et al. Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterococcus faecium ve Enterococcus faecalis İzolatlarının Antibiyotik Direnci ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması [Investigation of Antibiotic Resistance and Virulence Factors of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis Strains Isolated from Clinical Samples]. *Mikrobiyol Bul*. 2020;54(1):26-39. doi:10.5578/mb.68810
- Graham DW, Bergeron G, Bourassa MW, et al. Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1441(1):17-30. doi:10.1111/nyas.14036
- Graham SB, Machalaba C, Baum SE, et al. Applying a One Health lens to understanding the impact of climate and environmental change on healthcare-associated infections. *Antimicrob Steward Healthc Epidemiol*. 2023;3(1):e93. doi:10.1017/ash.2023.159
- Hafezi A, Khamar Z. The method and analysis of some biochemical tests commonly used for microbial identification: a review. *Compr Health Biomed Stud*. 2024;3(2):e160199. doi:10.5812/chbs-160199
- Haghi F, Lohrasbi V, Zeighami H. High incidence of virulence determinants, aminoglycoside and vancomycin resistance in enterococci isolated from hospitalized patients in Northwest Iran. *BMC Infect Dis*. 2019;19(1):744. doi:10.1186/s12879-019-4395-3
- Halawa EM, Fadel M, Al-Rabia MW, et al. Antibiotic action and resistance: updated review of mechanisms, spread, influencing factors, and alternative approaches for combating resistance. *Front Pharmacol*. 2024;14:1305294. doi:10.3389/fphar.2023.1305294

- Hanawa T, Shimoda-Komatsu Y, Araki K, et al. Skin and Soft Tissue Infections Caused by Different Genotypes of PVL-Positive Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Jpn J Infect Dis.* 2020;73(1):72-75. doi:10.7883/yoken.JJID.2019.162
- Harmsen D, Claus H, Witte W, et al. Typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a university hospital setting by using novel software for spa repeat determination and database management. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5442-5448. doi:10.1128/JCM.41.12.5442-5448.2003
- Hashimoto Y, Suzuki M, Kobayashi S, et al. Enterococcal Linear Plasmids Adapt to *Enterococcus faecium* and Spread within Multidrug-Resistant Clades. *Antimicrob Agents Chemother.* 2023;67(4):e0161922. doi:10.1128/aac.01619-22
- Hematzadeh A, Haghighi M. Biotyping of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human infections by RAPD and ERIC-PCR. *Heliyon.* 2021;7(9):e07967. doi:10.1016/j.heliyon.2021.e07967
- Ho CS, Wong CTH, Aung TT, et al. Antimicrobial resistance: a concise update. *Lancet Microbe.* 2025;6(1):100947. doi:10.1016/j.lanmic.2024.07.010
- Homan WL, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):1963-1971. doi:10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002
- Hong JS, Kim D, Kang DY, et al. Evaluation of the BD Phoenix M50 Automated Microbiology System for Antimicrobial Susceptibility Testing with Clinical Isolates in Korea. *Microb Drug Resist.* 2019;25(8):1142-1148. doi:10.1089/mdr.2018.0370
- Hooton TM, Gupta K, Naber KG, et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 international clinical practice guidelines. *Clin Infect Dis.* 2010;50(5):625-663.
- Hunashal Y, Kumar GS, Choy MS, et al. Molecular basis of β -lactam antibiotic resistance of ESKAPE bacterium *E. faecium* Penicillin Binding Protein PBP5. *Nat Commun.* 2023;14(1):4268. doi:10.1038/s41467-023-39966-5
- Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol.* 1988;26(11):2465–2466.
- Hussain K, Bandyopadhyay A, Roberts N, et al. Panton-Valentine leucocidin-producing *Staphylococcus aureus*: a clinical review. *Clin Exp Dermatol.* 2022;47(12):2150-2158. doi:10.1111/ced.15392

- Huynh TQ, Tran VN, Thai VC, et al. Genomic alterations involved in fluoroquinolone resistance development in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2023;18(7):e0287973. doi:10.1371/journal.pone.0287973
- Iacchini S, Boros S, Pezzotti P, et al. *AR-ISS: sorveglianza nazionale dell'antibiotico-resistenza. Dati 2023*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2024. (Rapporti ISS Sorveglianza RIS 5/2024). Accessed November 26, 2025. Available from: https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/ar-iss/RIS-5_2024.pdf
- Ibik YE, Ejder N, Sevim E, et al. Evaluating molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* isolates with MLST, MALDI-TOF MS, PFGE. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2023;22(1):93. doi:10.1186/s12941-023-00640-9
- Innocenti T, Cartabellotta A, Mosti M, et al. *Prevenzione e controllo delle infezioni correlate all'assistenza: efficacia degli interventi sanitari*. Fondazione GIMBE; ottobre 2024. Accessed November 26, 2025. Available from: https://www.gimbe.org/pubblicazioni/Report_Prevenzione_e_controllo_ICA.pdf
- Ishikawa K, Tsuchida T, Ichiki K, et al. Efficacy of Enhanced Environmental Cleaning/Disinfection Using Pulsed Xenon Ultraviolet Light in Preventing Outbreaks of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Neonatal Intensive Care Units. *Epidemiologia (Basel)*. 2025;6(1):12. doi:10.3390/epidemiologia6010012
- Istituto Nazionale di Statistica (ISTAT). *Rapporto annuale 2025*. Roma: ISTAT; 2025. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.istat.it/produzione-editoriale/rapporto-annuale-2025-la-situazione-del-paese-il-volume>
- Istituto Superiore di Sanità. *Infezioni correlate all'assistenza (ICA)*. EpiCentro; updated October 21, 2021a. Accessed August 27, 2025. Available from: <https://www.epicentro.iss.it/infezioni-correlate/>
- Istituto Superiore di Sanità. *Sorveglianza nazionale delle infezioni del sito chirurgico (SNICH2) e indicatori di prevenzione negli ospedali*. 2022b. Accessed August 27, 2025. Available from: <https://www.epicentro.iss.it/sorveglianza-ica/pdf/Protocollo%20Sito%20chirurgico%20VERS%20definitiva%2012%2010%2022-1.pdf>
- Istituto Superiore di Sanità. *AR-ISS: Protocollo per la sorveglianza nazionale dell'antibiotico-resistenza (versione 2024)*. Roma: ISS; 2024c. Accessed November 26, 2025. Available from: https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/pdf/ARISS_Protocollo_07_febbraio_2024.pdf

- Istituto Superiore di Sanità. *Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022–2025*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2022d. Accessed August 21, 2025. Available from: <https://www.epicentro.iss.it/antibiotico-resistenza/pncar-2022>
- Jiao F, Bao Y, Li M, et al. Unraveling the mechanism of ceftaroline-induced allosteric regulation in penicillin-binding protein 2a: insights for novel antibiotic development against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2023;67(12):e0089523. doi:10.1128/aac.00895-23
- Jevons MP. “Celbenin”-resistant staphylococci. *Br Med J*. 1961;1(5219):124-125. doi:10.1136/bmj.1.5219.124
- Jovanović M, Velebit B, Tošić T, et al. Comparative study of virulence factor genes, β -hemolysis and biofilm production in invasive and colonizing enterococci. *Eur J Inflamm*. 2023;21:1721727X231156333. doi:10.1177/1721727X231156333
- Ju G, Zhang Y, Ye C, et al. Comparative effectiveness and safety of six antibiotics in treating MRSA infections: A network meta-analysis. *Int J Infect Dis*. 2024;146:107109. doi:10.1016/j.ijid.2024.107109
- Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci*. 2021;22(6):3128. doi:10.3390/ijms22063128
- Kaneko H, Kanai M, Saito T, et al. Significant increase in the prevalence of Pantone-Valentine leukocidin-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, particularly the USA300 variant Ψ USA300, in the Japanese community. *Microbiol Spectr*. 2023;11(6):e0124823. doi:10.1128/spectrum.01248-23
- Kaprou GD, Bergšpica I, Alexa EA, et al. Rapid Methods for Antimicrobial Resistance Diagnostics. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2):209. doi:10.3390/antibiotics10020209
- Karampatakis T, Tsergouli K, Roilides E. Infection control measures against multidrug-resistant Gram-negative bacteria in children and neonates. *Future Microbiol*. 2023;18:751-765. doi:10.2217/fmb-2023-0072
- Keenan K, Silva Corrêa J, Sringernyuan L, et al. The social burden of antimicrobial resistance: what is it, how can we measure it, and why does it matter?. *JAC Antimicrob Resist*. 2025;7(2):dlac208. doi:10.1093/jacamr/dlac208
- Kelly JB, Nolan AC, Zeden MS. How can we escape the ESKAPEs: Antimicrobial resistance mechanisms and what lies ahead?. *PLoS Pathog*. 2024;20(6):e1012270. doi:10.1371/journal.ppat.1012270

- Khan RT, Sharma V, Khan SS, et al. Prevention and potential remedies for antibiotic resistance: current research and future prospects. *Front Microbiol.* 2024; 15:1455759. doi:10.3389/fmicb.2024.1455759
- Kherroubi L, Bacon J, Rahman KM. Navigating fluoroquinolone resistance in Gram-negative bacteria: a comprehensive evaluation. *JAC Antimicrob Resist.* 2024;6(4):dlae127. doi:10.1093/jacamr/dlae127
- Khdhiri M, Thomas E, de Smet C, et al. refMLST: reference-based multilocus sequence typing enables universal bacterial typing. *BMC Bioinformatics.* 2024;25(1):280. doi:10.1186/s12859-024-05913-4
- Kosiyaoporn H, Chanvatik S, Issaramalai T, et al. Surveys of knowledge and awareness of antibiotic use and antimicrobial resistance in general population: A systematic review. *PLoS One.* 2020;15(1):e0227973. doi:10.1371/journal.pone.0227973
- Kotay SM, Donlan RM, Ganim C, et al. Droplet- Rather than Aerosol-Mediated Dispersion Is the Primary Mechanism of Bacterial Transmission from Contaminated Hand-Washing Sink Traps. *Appl Environ Microbiol.* 2019;85(2):e01997-18. doi:10.1128/AEM.01997-18
- Kumar NR, Balraj TA, Kempegowda SN, et al. Multidrug-Resistant Sepsis: A Critical Healthcare Challenge. *Antibiotics (Basel).* 2024;13(1):46. doi:10.3390/antibiotics13010046
- Kwok WC, Pates K, Shah A, et al. Antimicrobial resistance in chronic lung infection: the road to resistance. *Thorax.* doi:10.1136/thorax-2024-222396
- Leone M, Duclos G, Lakbar I, et al. Antimicrobial resistance and outcome in the critically ill patient: An opinion paper. *J Crit Care.* 2023; 77:154352. doi:10.1016/j.jcrc.2023.154352
- Lade H, Kim JS. Molecular Determinants of β -Lactam Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): An Updated Review. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(9):1362. doi:10.3390/antibiotics12091362
- Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(4):e00020-18. doi:10.1128/CMR.00020-18
- Lanka S, Katta A, Kovvali M, et al. Enterococcus faecium virulence factors and biofilm components: synthesis, structure, function, and inhibitors. In: Busi S, Prasad R, eds. *ESKAPE Pathogens*. Springer; 2024. doi:10.1007/978-981-99-8799-3_7
- Lappan R, Chown SL, French M, et al. Towards integrated cross-sectoral surveillance of pathogens and antimicrobial resistance: Needs, approaches, and considerations for linking surveillance to action. *Environ Int.* 2024;192:109046. doi:10.1016/j.envint.2024.109046

- Leitão JH. Microbial Virulence Factors. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5320. doi:10.3390/ijms21155320
- Lepenos T, Sanoudou D, Protogerou A, et al. Louis Pasteur (1822-1895), Ignaz Semmelweis (1818-1865), Joseph Lister (1827-1912) and the Link Between Their Works Toward the Development of Antisepsis: A Narrative Review. *Cureus.* 2024;16(6):e62543. doi:10.7759/cureus.62543
- Lewnard JA, Charani E, Gleason A, et al. Burden of bacterial antimicrobial resistance in low-income and middle-income countries avertible by existing interventions: an evidence review and modelling analysis. *Lancet.* 2024;403(10442):2439-2454. doi:10.1016/S0140-6736(24)00862-6
- Lim C, Ashley EA, Hamers RL, et al. Surveillance strategies using routine microbiology for antimicrobial resistance in low- and middle-income countries. *Clin Microbiol Infect.* 2021;27(10):1391-1399. doi:10.1016/j.cmi.2021.05.037
- Liu C, Rosen EA, Stohs EJ, et al. Tackling antimicrobial resistance in people who are immunocompromised: leveraging diagnostic and antimicrobial stewardship. *Lancet Infect Dis.* 2026;26(1):e30-e48. doi:10.1016/S1473-3099(25)00311-1
- Liu G, Thomsen LE, Olsen JE. Antimicrobial-induced horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: a mini-review. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(3):556-567. doi:10.1093/jac/dkab450
- Lombardi A, Cornacchia A, Borriello T, et al. Pseudomonas aeruginosa investigation in water samples of Campania region, Southern Italy. *Am J Infect Control.* doi:10.1016/j.ajic.2025.09.007
- Lombardi A, Ripabelli G, Sammarco ML, et al. Enterococcus faecium as an Emerging Pathogen: Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance in Clinical Strains. *Pathogens.* 2025;14(5):483. doi:10.3390/pathogens14050483
- Lombardi A, Tamburro M, Sammarco ML, et al. Hospital environment as reservoir of Pseudomonas aeruginosa in human cases: a molecular epidemiology investigation in a hospital setting in central Italy. *Lett Appl Microbiol.* 2025;78(2):ovaf019. doi:10.1093/lambio/ovaf019
- Long DR, Cifu A, Salipante SJ, et al. Preventing Surgical Site Infections in the Era of Escalating Antibiotic Resistance and Antibiotic Stewardship. *JAMA Surg.* 2024;159(8):949-956. doi:10.1001/jamasurg.2024.0429
- Macesic N, Cottingham H, Wisniewski JA, et al. Hospital Enterococcus faecium demonstrates distinct environmental and patient reservoirs: a genomic point prevalence survey. *Infect Control Hosp Epidemiol.* doi:10.1017/ice.2025.27

- Majumder MAA, Rahman S, Cohall D, et al. Antimicrobial Stewardship: Fighting Antimicrobial Resistance and Protecting Global Public Health. *Infect Drug Resist.* 2020; 13:4713-4738. doi:10.2147/IDR.S290835
- Mammina C, Calà C, Bonura C, et al. Polyclonal non multiresistant methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates from clinical cases of infection occurring in Palermo, Italy, during a one-year surveillance period. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:17. doi:10.1186/1476-0711-11-17
- Mangalea MR, Halpin AL, Haile M, et al. Decolonization and Pathogen Reduction Approaches to Prevent Antimicrobial Resistance and Healthcare-Associated Infections. *Emerg Infect Dis.* 2024;30(6):1069-1076. doi:10.3201/eid3006.231338
- Martínez-Gallardo MJ, Villicaña C, Yocupicio-Monroy M, et al. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains susceptible and resistant to carbapenems and aztreonam isolated from patients with healthcare-associated infections in a Mexican hospital. *Mol Genet Genomics.* 2024;299(1):29. doi:10.1007/s00438-024-02122-9
- Martínez-Zavaleta MG, Fernández-Rodríguez D, Hernández-Durán M, et al. Acquired *bla*_{VIM} and *bla*_{GES} Carbapenemase-Encoding Genes in *Pseudomonas aeruginosa*: A Seven-Year Survey Highlighting an Increasing Epidemiological Threat. *Pathogens.* 2023;12(10):1256. doi:10.3390/pathogens12101256
- Mastrogianni M, Katsoulas T, Galanis P, et al. The Impact of Care Bundles on Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) Prevention in Adult ICUs: A Systematic Review. *Antibiotics (Basel).* 2023;12(2):227. doi:10.3390/antibiotics12020227
- Maugeri A, Barchitta M, Puglisi F, et al. Socio-economic, governance and health indicators shaping antimicrobial resistance: an ecological analysis of 30 european countries. *Global Health.* 2023;19(1):12. doi:10.1186/s12992-023-00913-0
- Mengistu DA, Alemu A, Abdukadir AA, et al. Global Incidence of Surgical Site Infection Among Patients: Systematic Review and Meta-Analysis. *Inquiry.* 2023;60:469580231162549. doi:10.1177/00469580231162549
- Ministero della Salute. *Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022–2025*. Roma: Ministero della Salute; 2023. Accessed August 21, 2025. Available from: <https://www.salute.gov.it/new/it/pubblicazione/piano-nazionale-di-contrasto-allantibiotico-resistenza-pncar-2022-2025/>
- Mishra A, Aggarwal A, Khan F. Medical Device-Associated Infections Caused by Biofilm-Forming Microbial Pathogens and Controlling Strategies. *Antibiotics (Basel).* 2024;13(7):623. doi:10.3390/antibiotics13070623

- Mirzaii M, Alebouyeh M, Sohrabi MB, et al. Antibiotic resistance assessment and multi-drug efflux pumps of *Enterococcus faecium* isolated from clinical specimens. *J Infect Dev Ctries*. 2023;17(5):649-655. doi:10.3855/jidc.17304
- Modi AR, Kovacs CS. Hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: Diagnosis, management, and prevention. *Cleve Clin J Med*. 2020;87(10):633-639. doi:10.3949/ccjm.87a.19117
- Molina García A, Cross JH, Fitchett EJA, et al. *Infection prevention and care bundles addressing health care-associated infections in neonatal care in low-middle income countries: a scoping review*. *EClinicalMedicine*. 2022;44:101259. doi:10.1016/j.eclinm.2021.101259
- Mollerup S, Worning P, Petersen A, et al. *spa* Typing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Based on Whole-Genome Sequencing: the Impact of the Assembler. *Microbiol Spectr*. 2022;10(6):e0218922. doi:10.1128/spectrum.02189-22
- Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:39. doi:10.3389/fcimb.2017.00039
- Mori V, Grant G, Hattingh L. Evaluation of antimicrobial resistance surveillance data sources in primary care setting: a scoping review. *Fam Pract*. 2025;42(2):cmf013. doi:10.1093/fampra/cmaf013
- Mouajou V, Adams K, DeLisle G, et al. Hand hygiene compliance in the prevention of hospital-acquired infections: a systematic review. *J Hosp Infect*. 2022;119:33-48. doi:10.1016/j.jhin.2021.09.016
- Mudaliar SB, Bharath Prasad AS. A biomedical perspective of pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*: its applications and challenges. *World J Microbiol Biotechnol*. 2024;40(3):90. doi:10.1007/s11274-024-03889-0
- Muntean MM, Muntean AA, Preda M, et al. Phenotypic and genotypic detection methods for antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens (Review). *Exp Ther Med*. 2022;24(2):508. doi:10.3892/etm.2022.11435
- Murni IK, Duke T, Kinney S, et al. Risk factors for healthcare-associated infection among children in a low-and middle-income country. *BMC Infect Dis*. 2022;22(1):406. doi:10.1186/s12879-022-07387-2
- Muteeb G, Rehman MT, Shahwan M, et al. Origin of Antibiotics and Antibiotic Resistance, and Their Impacts on Drug Development: A Narrative Review. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2023;16(11):1615. doi:10.3390/ph16111615

- Naderi M, Yousefi Nojookambari N, Talebi S, et al. Molecular Characterization of Aminoglycoside-modifying Enzymes (AMEs) in Aminoglycoside-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Cross-sectional Study in Northeastern Iran. *Iran J Pathol*. 2025;20(1):118-125. doi:10.30699/ijp.2024.2038509.3342
- Navidinia M, Zamani S, Mohammadi A, et al. Hospital-Related Lineage of USA300 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to Cause Bacteremia in Iran. *Biomed Res Int*. 2023;2023:8335385. doi:10.1155/2023/8335385
- Naylor NR, Hasso-Agopsowicz M, Kim C, et al. The global economic burden of antibiotic-resistant infections and the potential impact of bacterial vaccines: a modelling study. *BMJ Glob Health*. 2025;10(6):e016249. doi:10.1136/bmjgh-2024-016249
- Nelson RE, Hyun D, Jezek A, et al. Mortality, Length of Stay, and Healthcare Costs Associated With Multidrug-Resistant Bacterial Infections Among Elderly Hospitalized Patients in the United States. *Clin Infect Dis*. 2022;74(6):1070-1080. doi:10.1093/cid/ciab696
- Neoh HM, Tan XE, Sapri HF, et al. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the "gold standard" for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol*. 2019;74:103935. doi:10.1016/j.meegid.2019.103935
- Nguyen AQ, Vu HP, Nguyen LN, et al. Monitoring antibiotic resistance genes in wastewater treatment: Current strategies and future challenges. *Sci Total Environ*. 2021;783:146964. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146964
- Ntim OK, Awere-Duodu A, Osman AH, et al. Antimicrobial resistance of bacterial pathogens isolated from cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2025;25(1):296. doi:10.1186/s12879-025-10481-w
- Olivares E, Badel-Berchoux S, Provot C, et al. Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. *Front Microbiol*. 2020;10:2894. doi:10.3389/fmicb.2019.02894
- Oliveira M, Antunes W, Mota S, et al. An Overview of the Recent Advances in Antimicrobial Resistance. *Microorganisms*. 2024;12(9):1920. doi:10.3390/microorganisms12091920
- Orlando S, Cicala M, De Santo C, et al. The financial burden of healthcare-associated infections: a propensity score analysis in an Italian healthcare setting. *Infect Prev Pract*. 2024;7(1):100406. doi:10.1016/j.infpip.2024.100406
- Orsi GB, Villari P, Mondillo V, et al. A plasma expander-related *Pseudomonas aeruginosa* outbreak. *Scand J Infect Dis*. 2006;38(11-12):1085-1088. doi:10.1080/00365540600794402

- Paganelli FL, Willems RJ, Jansen P, et al. Enterococcus faecium biofilm formation: identification of major autolysin AtlAEfm, associated Acme surface localization, and AtlAEfm-independent extracellular DNA Release. *mBio*. 2013;4(2):e00154. doi:10.1128/mBio.00154-13
- Pan P, Sun L, Shi X, et al. Analysis of molecular epidemiological characteristics and antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant and linezolid-resistant Enterococcus in China. *BMC Med Genomics*. 2024;17(1):174. doi:10.1186/s12920-024-01948-x
- Peng Q, Tang X, Dong W, et al. A Review of Biofilm Formation of *Staphylococcus aureus* and Its Regulation Mechanism. *Antibiotics (Basel)*. 2022;12(1):12. doi:10.3390/antibiotics12010012
- Peri AM, Chatfield MD, Ling W, et al. Rapid Diagnostic Tests and Antimicrobial Stewardship Programs for the Management of Bloodstream Infection: What Is Their Relative Contribution to Improving Clinical Outcomes? A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2024;79(2):502-515. doi:10.1093/cid/ciae234
- Pickens CI, Wunderink RG. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Hospital-Acquired Pneumonia/Ventilator-Associated Pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med*. 2022;43(2):304-309. doi:10.1055/s-0041-1740583
- Pinchera B, Buonomo AR, Schiano Moriello N, et al. Update on the Management of Surgical Site Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2022;11(11):1608. 2022; doi:10.3390/antibiotics11111608
- Pinto Ferreira J, Battaglia D, Dorado García A, et al. Achieving Antimicrobial Stewardship on the Global Scale: Challenges and Opportunities. *Microorganisms*. 2022;10(8):1599. doi:10.3390/microorganisms10081599
- Pipitò L, Mazzola CV, D'Agati G, et al. Difficult-to-Treat Skin and Soft Tissue Infections Caused by Panton-Valentine Leukocidin-Producing Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Case Series. *Infect Dis Rep*. 2025;17(6):137. doi:10.3390/idr17060137
- Pirzadian J, Voor In 't Holt AF, Hossain M, et al. Limiting spread of VIM-positive *Pseudomonas aeruginosa* from colonized sink drains in a tertiary care hospital: A before-and-after study. *PLoS One*. 2023;18(3):e0282090. doi:10.1371/journal.pone.0282090
- Pitiriga V, Kanellopoulos P, Bakalis I, et al. Central venous catheter-related bloodstream infection and colonization: the impact of insertion site and distribution of multidrug-resistant pathogens. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020;9(1):189. doi:10.1186/s13756-020-00851-1
- Poeta P, Costa D, Igrejas G, et al. Polymorphisms of the *pbp5* gene and correlation with ampicillin resistance in *Enterococcus faecium* isolates of animal origin. *J Med Microbiol*. 2007;56(Pt 2):236-240. doi:10.1099/jmm.0.46778-0

- Portillo A, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, et al. Macrolide resistance genes in *Enterococcus* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(4):967-971. doi:10.1128/AAC.44.4.967-971.2000
- Poudel AN, Zhu S, Cooper N, et al. The economic burden of antibiotic resistance: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2023;18(5):e0285170. doi:10.1371/journal.pone.0285170
- Póvoa P, Ramirez P, Blot S. Decolonization strategies against multidrug resistant organisms in the ICU. *Intensive Care Med*. 2024;50(4):577-579. doi:10.1007/s00134-024-07360-4
- Prospero E, Barbadoro P, Savini S, et al. Cluster of *Pseudomonas aeruginosa* catheter-related bloodstream infections traced to contaminated multidose heparinized saline solutions in a medical ward. *Int J Hyg Environ Health*. 2006;209(6):553-556. doi:10.1016/j.ijheh.2006.05.002
- PubMLST. *Multi-Locus Sequence Typing. PubMLST database*. Accessed November 27, 2025. Available from: <https://pubmlst.org/multilocus-sequence-typing>
- Puro V, Coppola N, Frasca A, et al. Pillars for prevention and control of healthcare-associated infections: an Italian expert opinion statement. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2022;11(1):87. doi:10.1186/s13756-022-01125-8
- Raddaoui A, Chebbi Y, Frigui S, et al. Genetic characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from neutropenic patients in Tunisia: spread of the pandemic CC17 clone associated with high genetic diversity in Tn1546-like structures. *J Appl Microbiol*. 2024;135(9):lxae225. doi:10.1093/jambio/lxae225
- Radford-Smith DE, Anthony DC. Vancomycin-Resistant *E. faecium*: Addressing Global and Clinical Challenges. *Antibiotics (Basel)*. 2025;14(5):522. doi:10.3390/antibiotics14050522
- Rajandra A, Yunus NM, Teo CH, et al. Incidence, Compliance, and Risk Factor Associated with Central Line-Associated Bloodstream Infection (CLABSI) in Intensive Care Unit (ICU) Patients: A Multicenter Study in an Upper Middle-Income Country. *Antibiotics (Basel)*. 2025;14(3):271. doi:10.3390/antibiotics14030271
- Rakshit P, Nagpal N, Sharma S et al. Effects of implementation of healthcare associated infection surveillance and interventional measures in the neonatal intensive care unit: Small steps matter. *Indian J Med Microbiol*. 2023;44:100369. doi:10.1016/j.ijmmb.2023.100369
- Ramírez-Larrota JS, Eckhard U. An Introduction to Bacterial Biofilms and Their Proteases, and Their Roles in Host Infection and Immune Evasion. *Biomolecules*. 2022;12(2):306. doi:10.3390/biom12020306
- Raoofi S, Pashazadeh Kan F, Rafiei S, et al. Global prevalence of nosocomial infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2023;18(1):e0274248. doi:10.1371/journal.pone.0274248

- Raya J, Montagut EJ, Marco MP. Analysing the *integrated quorum sensing* system its potential role in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1575421. doi:10.3389/fcimb.2025.1575421
- Reynolds D, Kollef M. The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*. 2021;81(18):2117-2131. doi:10.1007/s40265-021-01635-6
- Rezaei AR, Zienkiewicz D, Rezaei AR. Surgical site infections: a comprehensive review. *J Trauma Inj*. 2025;38(2):71-81. doi:10.20408/jti.2025.0019
- Ricchizzi E, Sasdelli E, Leucci AC, et al. Incidence of health-care-associated infections in long-term care facilities in nine European countries: a 12-month, prospective, longitudinal cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2025;25(11):1199-1207. doi:10.1016/S1473-3099(25)00217-8
- Ripabelli G, Salzo A, Sammarco ML, et al. Infections and Colon Surgery: Preliminary Results from a Surveillance Program in an Italian Hospital. *Hosp Top*. 2023;101(1):27-38. doi:10.1080/00185868.2021.2006103
- Rodríguez A, Berrueta J, Páez C, et al. Ten-Year Evaluation of Ventilator-Associated Pneumonia (VAP) According to Initial Empiric Treatment: A Retrospective Analysis Using Real-World Data. *Biomedicines*. 2025;13(2):360. doi:10.3390/biomedicines13020360
- Rodríguez-Acelas AL, de Abreu Almeida M, Engelman B, et al. Risk factors for health care-associated infection in hospitalized adults: Systematic review and meta-analysis. *Am J Infect Control*. 2017;45(12):e149-e156. doi:10.1016/j.ajic.2017.08.016
- Ruhel R, Sahu A, Koujalagi T, et al. Biofilm-specific determinants of enterococci pathogen. *Arch Microbiol*. 2024;206(10):397. doi:10.1007/s00203-024-04119-9
- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013;18(4):20380. doi:10.2807/ese.18.04.20380-en
- Saengsuwan P, Singkhamanan K, Madla S, et al. Molecular epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* clinical isolates in a tertiary care hospital in southern Thailand: a retrospective study. *PeerJ*. 2021;9:e11478. doi:10.7717/peerj.11478
- Salam MA, Al-Amin MY, Salam MT, et al. Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel)*. 2023;11(13):1946doi:10.3390/healthcare11131946
- Sallam HH, Ramadan AA, Attia NM, et al. Ceftaroline Exhibits Promising In Vitro Activity Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates From Alexandria, Egypt. *Int J Microbiol*. 2025;2025:4558662. doi:10.1155/ijm/4558662

- Salzo A, Ripabelli G, Sammarco ML, et al. Healthcare-Associated Infections and Antibiotics Consumption: A Comparison of Point Prevalence Studies and Intervention Strategies. *Hosp Top.* 2021;99(3):140-150. doi:10.1080/00185868.2021.1902758
- Sammarco ML, Ripabelli G, Tamburro M. Epidemiologia molecolare delle malattie infettive:metodi di analisi ed interpretazione dei risultati [Molecular epidemiology of infectious diseases: analytical methods and results interpretation]. *Ann Ig.* 2014;26(1):10-45. doi:10.7416/ai.2014.1956
- Sandu AM, Chifiriuc MC, Vrancianu CO, et al. Healthcare-Associated Infections: The Role of Microbial and Environmental Factors in Infection Control-A Narrative Review. *Infect Dis Ther.* 2025;14(5):933-971. doi:10.1007/s40121-025-01143-0
- Sartelli M, Marini CP, McNelis J, et al. Preventing and Controlling Healthcare-Associated Infections: The First Principle of Every Antimicrobial Stewardship Program in Hospital Settings. *Antibiotics (Basel).* 2024;13(9):896. doi:10.3390/antibiotics13090896
- Sattari-Maraji A, Jabalameli F, Node Farahani N, et al. Antimicrobial resistance pattern, virulence determinants and molecular analysis of *Enterococcus faecium* isolated from children infections in Iran. *BMC Microbiol.* 2019;19(1):156. doi:10.1186/s12866-019-1539-y
- Schürch AC, Arredondo-Alonso S, Willems RJL, et al. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):350-354. doi:10.1016/j.cmi.2017.12.016
- Schwartz B, Klammer K, Zimmerman J, et al. Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Clinical Settings: A Review of Resistance Mechanisms and Treatment Strategies. *Pathogens.* 2024;13(11):975. doi:10.3390/pathogens13110975
- Schwendener S, Perreten V. The bla and mec families of β -lactam resistance genes in the genera *Micrococcus*, *Mammaliicoccus* and *Staphylococcus*: an in-depth analysis with emphasis on *Micrococcus*. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(7):1796-1827. doi:10.1093/jac/dkac107
- Sherry NL, Lee JYH, Giulieri SG, et al. Genomics for antimicrobial resistance-progress and future directions. *Antimicrob Agents Chemother.* 2025;69(5):e0108224. doi:10.1128/aac.01082-24
- Shirvani F, Behzad A, Abdollahi N, et al. Frequency and co-colonization of vancomycin-resistant *Enterococci* and *Candida* in ICU-hospitalized children. *New Microbes New Infect.* 2021;41:100881. doi:10.1016/j.nmni.2021.100881
- Shutt AE, Ashiru-Oredope D, Price J, et al. The intersection of the social determinants of health and antimicrobial resistance in human populations: a systematic review. *BMJ Glob Health.* 2025;10(5):e017389. doi:10.1136/bmjgh-2024-017389

- Singh HK, Claeys KC, Advani SD, et al. Diagnostic stewardship to improve patient outcomes and healthcare-associated infection (HAI) metrics. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2024;45(4):405-411. doi:10.1017/ice.2023.284
- So M, Walti L. Challenges of Antimicrobial Resistance and Stewardship in Solid Organ Transplant Patients. *Curr Infect Dis Rep*. 2022;24(5):63-75. doi:10.1007/s11908-022-00778-1
- Sobkowiak A, Scherff N, van Almsick V, et al. Characterization of vanA-harboring plasmids supports differentiation of outbreak-related and sporadic vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a tertiary care hospital. *BMC Microbiol*. 2025;25(1):337. doi:10.1186/s12866-025-04058-5
- Stege PB, Beekman JM, Hendrickx APA, et al. Colonization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in human-derived colonic epithelium: unraveling the transcriptional dynamics of host-enterococcal interactions. *FEMS Microbes*. 2024;5:xtae014. doi:10.1093/femsmc/xtae014
- Stegger M, Andersen PS, Kearns A, et al. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA*(LGA251). *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(4):395-400. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03715.x
- Stehling EG, Leite DS, Silveira WD. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2010;14(5):462-467.
- Šuljagić V, Nešković V, Maksimović D, et al. Antibiotic Use, Healthcare-Associated Infections, and Antimicrobial Resistance in Intensive Care Unit of a Serbian Tertiary University Hospital, 2018-2024: An Ecological Analysis. *Antibiotics (Basel)*. 2025;14(11):1110. doi:10.3390/antibiotics14111110
- Suo N, Yu J, Li H, et al. Molecular characterization and resistance mechanisms of linezolid-resistant enterococci clinical isolates and identification of a clinical *Enterococcus faecium* strain co-harboring *optrA*, *poxA*, and *cfr*(D) in a tertiary hospital in China. *J Glob Antimicrob Resist*. 2025;45:182-191. doi:10.1016/j.jgar.2025.09.008
- Swain J, Askenasy I, Rudland Nazeer R, et al. Pathogenicity and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*: Recent advances and under-investigated topics. *Virulence*. 2025;16(1):2503430. doi:10.1080/21505594.2025.2503430
- Takaya S, Hayakawa K, Matsunaga N, et al. Surveillance systems for healthcare-associated infection in high and upper-middle income countries: A scoping review. *J Infect Chemother*. 2020;26(5):429-437. doi:10.1016/j.jiac.2020.01.001

- Tamborino A, Venturini E, Montagnani C, et al. Staphylococcal scalded skin syndrome: a case series description of a rare and critical disease in a tertiary pediatric center. *Ital J Pediatr.* 2025;51(1):267. doi:10.1186/s13052-025-02078-5
- Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial Resistance (AMR). *Br J Biomed Sci.* 2023;80:11387. doi:10.3389/bjbs.2023.11387
- Tängdén T, Carrara E, Hellou MM, et al. Introducing new antibiotics for multidrug-resistant bacteria: obstacles and the way forward. *Clin Microbiol Infect.* 2025;31(3):354-359. doi:10.1016/j.cmi.2024.09.025
- Tchouaket EN, El-Mousawi F, Robins S, et al. A systematic review of economic evaluation of healthcare associated infection prevention and control interventions in long term care facilities. *Health Econ Rev.* 2024;14(1):101. doi:10.1186/s13561-024-00582-8
- Teng J, Imani S, Zhou A, et al. Combatting resistance: Understanding multi-drug resistant pathogens in intensive care units. *Biomed Pharmacother.* 2023;167:115564. doi:10.1016/j.biopha.2023.115564
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9):2233
- Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):811-814. doi:10.1080/22221751.2022.2048972
- Teoh BS, Liew YX, Wang Y, et al. A Retrospective Study on the Use of Daptomycin and Linezolid in Singapore General Hospital. *Antibiotics (Basel).* 2025;14(11):1088. doi:10.3390/antibiotics14111088
- Theodorakis N, Feretzakis G, Hitas C, et al. Antibiotic Resistance in the Elderly: Mechanisms, Risk Factors, and Solutions. *Microorganisms.* 2024;12(10):1978. Published 2024 Sep 30. doi:10.3390/microorganisms12101978
- Tiseo G, Brigante G, Giacobbe DR, et al. Diagnosis and management of infections caused by multidrug-resistant bacteria: guideline endorsed by the Italian Society of Infection and Tropical Diseases (SIMIT), the Italian Society of Anti-Infective Therapy (SITA), the Italian Group for Antimicrobial Stewardship (GISA), the Italian Association of Clinical Microbiologists (AMCLI) and the Italian Society of Microbiology (SIM). *Int J Antimicrob Agents.* 2022;60(2):106611. doi:10.1016/j.ijantimicag.2022.106611
- Touaitia R, Mairi A, Ibrahim NA, et al. *Staphylococcus aureus*: A Review of the Pathogenesis and Virulence Mechanisms. *Antibiotics (Basel).* 2025;14(5):470. doi:10.3390/antibiotics14050470

- Trautmannsberger I, Kolberg L, Meyer-Buehn M, et al. Epidemiological and genetic characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates in a University Children's Hospital in Germany: 2019 to 2020. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2022;11(1):48. doi:10.1186/s13756-022-01081-3
- Tsouklidis N, Kumar R, Heindl SE, et al. Understanding the Fight Against Resistance: Hospital-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* vs. Community-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*. *Cureus*. 2020;12(6):e8867. doi:10.7759/cureus.8867
- Tümmler B. Molecular epidemiology in current times. *Environ Microbiol*. 2020;22(12):4909-4918. doi:10.1111/1462-2920.15238
- Tuon FF, Dantas LR, Suss PH, et al. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*. 2022;11(3):300. doi:10.3390/pathogens11030300
- Tzialla C, Berardi A, Mondì V, et al. Outbreaks in the Neonatal Intensive Care Unit: Description and Management. *Trop Med Infect Dis*. 2024;9(9):212. doi:10.3390/tropicalmed9090212
- Umber JK, Moore KA. Assessment of antibiotic stewardship components of certification programs in US animal agriculture using the Antibiotic Stewardship Assessment Tool. *Front Sustain Food Syst*. 2021;5:724097. doi:10.3389/fsufs.2021.724097
- Uzuriaga M, Guillén-Grima F, Rua M, et al. Accelerated Bacterial Identification with MALDI-TOF MS Leads to Fewer Diagnostic Tests and Cost Savings. *Antibiotics (Basel)*. 2024;13(12):1163. doi:10.3390/antibiotics13121163
- Valzano F, La Bella G, Lopizzo T, et al. Resistance to ceftazidime-avibactam and other new β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: a multi-center surveillance study. *Microbiol Spectr*. 2024;12(8):e0426623. doi:10.1128/spectrum.04266-23
- van der Schoor AS, Voor In 't Holt AF, Zandijk WHA, et al. Dynamics of *Staphylococcus aureus* in patients and the hospital environment in a tertiary care hospital in the Netherlands. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2023;12(1):148. doi:10.1186/s13756-023-01349-2
- Varotto E, Galassi FM, Martini M, et al. The penicillin revolution and the role of the forgotten pioneer Vincenzo Tiberio (1869-1915): discovery, development and legacy. *J Prev Med Hyg*. 2025;66(2). doi:10.15167/2421-4248/jpmh2025.66.2.3647.
- Vestby LK, Grønseth T, Simm R, et al. Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)*. 2020;9(2):59. doi:10.3390/antibiotics9020059
- Vicentini C, Bordino V, Bresciano L, et al. Application of an updated methodology to estimate the burden of healthcare-associated infections in Italy, 2022. *Euro Surveill*. 2025;30(18):2400812. doi:10.2807/1560-7917.ES.2025.30.18.2400812

- Vinodhini V, Kavitha M. Deciphering agr quorum sensing in *Staphylococcus aureus*: insights and therapeutic prospects. *Mol Biol Rep*. 2024;51(1):155. doi:10.1007/s11033-023-08930-3
- Vittorakis E, Vică ML, Zervaki CO, et al. Examining the Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *S. aureus* Strains in Hospitals: An Analysis of the *pvl* Gene and Its Co-Occurrence with Other Virulence Factors. *Microorganisms*. 2023;11(4):841. doi:10.3390/microorganisms11040841
- Wang Y, Zeng M, Xia L, et al. Bacterial strategies for immune systems - Role of the type VI secretion system. *Int Immunopharmacol*. 2023;114:109550. doi:10.1016/j.intimp.2022.109550
- Wang Q, Zhang F, Wang Z, et al. Evaluation of the Etest and disk diffusion method for detection of the activity of ceftazidime-avibactam against Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* in China. *BMC Microbiol*. 2020;20(1):187. doi:10.1186/s12866-020-01870-z
- Wang Q, Zhang X, Wu W, et al. Genomic and clinical characterization of linezolid resistance in *Enterococcus* species from cancer patients in China. *BMC Infect Dis*. 2025;25(1):989. doi:10.1186/s12879-025-11371-x
- Weisser M, Oostdijk EA, Willems RJ, et al. Dynamics of ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clones colonizing hospitalized patients: data from a prospective observational study. *BMC Infect Dis*. 2012;12:68. doi:10.1186/1471-2334-12-68
- Weng PL, Ramli R, Hamat RA. Antibiotic Susceptibility Patterns, Biofilm Formation and *esp* Gene among Clinical Enterococci: Is There Any Association?. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(18):3439. doi:10.3390/ijerph16183439
- Werneburg GT. Catheter-Associated Urinary Tract Infections: Current Challenges and Future Prospects. *Res Rep Urol*. 2022;14:109-133. doi:10.2147/RRU.S273663
- World Health Organization Regional Office for Europe. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2022a. Accessed November 20, 2025. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Joint-WHO-ECDC-AMR-report-2022.pdf>
- World Health Organization Regional Office for Europe. *Action Against Antimicrobial Resistance Requires a One Health Approach: Advocacy Brief*. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2024b. WHO/EURO:2024-9510-49282-73655. Accessed August 20, 2025. Available from: <https://www.who.int/europe/publications/i/item/WHO-EURO-2024-9510-49282-73655>
- World Health Organization. *Antimicrobial resistance*. Geneva: World Health Organization; 2023a. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

- World Health Organization. *Public health surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2023b. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/emergencies/surveillance>
- World Health Organization. *Ten threats to global health in 2019*. Geneva: WHO; 2019c. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
- World Health Organization. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Geneva: World Health Organization; 2015d. ISBN: 9789241509763. Accessed August 20, 2025. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>
- World Health Organization. *Antimicrobial Stewardship Programmes in Health-Care Facilities in Low- and Middle-Income Countries: A WHO Practical Toolkit*. Geneva: World Health Organization; 2019e. Accessed August 26, 2025. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/329404>
- World Health Organization. *WHO releases report on state of development of antibacterials*. WHO News; 2024f. Accessed August 26, 2025. Available from: <https://www.who.int/news/item/14-06-2024-who-releases-report-on-state-of-development-of-antibacterials>
- World Health Organization. *Global Strategy on Infection Prevention and Control*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2023g. ISBN: 9789240080515. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240080515>
- World Health Organization. *World Hand Hygiene Day 2023*. 2023 May 5. Accessed November 21, 2025h. Available from: <https://www.who.int/campaigns/world-hand-hygiene-day/2023>
- World Health Organization. *Core components for infection prevention and control programmes: report of the WHO global consultation*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2021i. ISBN: 9789240051041. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240051041>
- World Health Organization. *Minimum requirements for infection prevention and control programmes*. Geneva: WHO; 2019j. ISBN: 9789241516945. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516945>
- World Health Organization. *Global report on infection prevention and control 2024*. Geneva, Switzerland: WHO; 2024k. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240103986>

- World Health Organization. *WHO bacterial priority pathogens list, 2024*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2024l. Accessed November 24, 2025. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240095026>
- World Health Organization. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) report 2025*. Geneva: WHO; 2025m. Accessed November 26, 2025. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240116337>
- Xie X, Liu Z, Huang J, et al. Molecular epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a hospital in Fujian, China. *Front Microbiol.* 2024;15:1431154. doi:10.3389/fmicb.2024.1431154
- Yang B, Xin X, Cao X, et al. Phenotypic and genotypic perspectives on detection methods for bacterial antimicrobial resistance in a One Health context: research progress and prospects. *Arch Microbiol.* 2024;206(10):409. doi:10.1007/s00203-024-04131-z
- Yu J, Han W, Xu Y, et al. Biofilm-producing ability of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinically isolated in China. *BMC Microbiol.* 2024;24(1):241. doi:10.1186/s12866-024-03380-8
- Zakhour J, Haddad SF, Kerbage A, et al. Diagnostic stewardship in infectious diseases: a continuum of antimicrobial stewardship in the fight against antimicrobial resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2023;62(1):106816. doi:10.1016/j.ijantimicag.2023.106816
- Zetts RM, Garcia AM, Doctor JN, et al. Primary Care Physicians' Attitudes and Perceptions Towards Antibiotic Resistance and Antibiotic Stewardship: A National Survey. *Open Forum Infect Dis.* 2020;7(7):ofaa244. doi:10.1093/ofid/ofaa244
- Zhang J, Wang J, Jin J, et al. Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: A systematic review and meta-analysis. *Food Res Int.* 2022;162(Pt A):111969. doi:10.1016/j.foodres.2022.111969
- Zhang X, Zhang D, Zhou D, et al. A comprehensive review of the pathogenic mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa*: synergistic effects of virulence factors, quorum sensing, and biofilm formation. *Front Microbiol.* 2025;16:1619626. doi:10.3389/fmicb.2025.1619626
- Zhao F, Wang B, Huang K, et al. Correlations among Antibiotic Resistance Genes, Mobile Genetic Elements and Microbial Communities in Municipal Sewage Treatment Plants Revealed by High-Throughput Sequencing. *Int J Environ Res Public Health.* 2023;20(4):3593. doi:10.3390/ijerph20043593