

NEISSERIA GONORRHOEAE ANTIBIOTICO-RESISTENTE: RISULTATI DEL BIENNIO 2012-2013



Giovanna Renna, Anna Carannante, Paola Stefanelli
e il Gruppo di studio per l'antibiotico-resistenza in gonococco*
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

RIASSUNTO - Nel periodo 2012-2013, 417 ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* sono stati collezionati ed esaminati presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'Istituto Superiore di Sanità. I ceppi batterici provengono da 14 Centri clinico-universitari presenti in diverse Regioni italiane. I risultati più interessanti sono: a) un aumento dei ceppi resistenti all'azitromicina (2,2% nel 2012 vs 7,5% nel 2013); b) una diminuzione dei ceppi resistenti al cefixime; c) un'elevata percentuale di ceppi resistenti alla ciprofloxacina (63% e 61% nel 2012 e nel 2013, rispettivamente).

Parole chiave: antibiotico-sensibilità; cefixime; *Neisseria gonorrhoeae*

SUMMARY (*Neisseria gonorrhoea antibiotic resistant: results from the period 2012-2013*) - In the period 2012-2013, 417 *Neisseria gonorrhoeae* isolates were collected from 14 Universities and MST Clinics in different Italian Regions and sent to the Department of Infectious, Parasitic and Immune-mediated Diseases of the Italian National Institute of Health for further analyses. The main results are as follows: a) the increased resistance to azitromycin from 2,2% in 2012 to 7,5% in 2013; b) the decrease of cefixime resistant gonococci rate; c) a significant percentage of isolates resistant to ciprofloxacin (63% and 61% in the 2012 and 2013, respectively).

Key words: antimicrobial-susceptibility; cefixime; *Neisseria gonorrhoeae*

paola.stefanelli@iss.it

N*eisseria gonorrhoeae*, comunemente detto gonococco, è un diplococco Gram-negativo appartenente alla famiglia delle Neisseriaceae ed è l'agente eziologico della gonorrea o blenorragia. La gonorrea è una malattia a trasmissione sessuale che colpisce sia gli uomini che le donne e si manifesta principalmente con uretriti e cervicitì; può, tuttavia, interessare anche il retto, la faringe o la congiuntiva. I sintomi possono comparire dopo un breve periodo d'incubazione (da due a sette giorni) e spesso la gonorrea nelle donne è asintomatica. In rari casi, si può presentare come infezione gonococcica disseminata (IGD) il cui quadro clinico è caratterizzato da febbre intermittente, dolori articolari, tenosinoviti, con complicanze gravi quali epatite, endocardite e meningite (1).

La diagnosi è basata sull'isolamento del gonococco mediante coltura oppure con un esame microscopico diretto dello striscio uretrale o cervicale per l'individuazione dei caratteristici diplococchi intracellulari Gram-negativi. Attualmente, vengono sempre più di frequente utilizzati approcci molecolari per la diagnosi rapida di *N. gonorrhoeae*, mediante amplificazione di geni specifici (2). La rapida identificazione del patogeno e un adeguato trattamento terapeutico sono strumenti importanti per prevenire le complicanze dell'infezione e per limitarne la diffusione nella popolazione. La gonorrea, infatti, rappresenta una delle malattie batteriche sessualmente trasmissibili più diffusa nel mondo, con circa 88 milioni di nuovi casi diagnosticati ogni anno (3). In Europa, nel 2011 sono stati riportati 39.179 casi di gonorrea, con un'incidenza ►

(*) La composizione del Gruppo di studio per l'antibiotico-resistenza in gonococco è riportata a p. 15.



media di 12,6 per 100.000 abitanti. Il 33% delle infezioni è stato identificato in soggetti omosessuali, più del 40% dei pazienti era di età inferiore a 25 anni (4). Per quanto riguarda l'Italia, così come riportato dal Report europeo (4), nel periodo 2007-2011 è stato osservato un decremento superiore al 30% nel numero assoluto di casi di gonorrea.

Le infezioni causate da *N. gonorrhoeae* sono un importante argomento di salute pubblica in quanto il gonococco presenta resistenze, anche multiple, agli antibiotici in uso per la terapia. Una delle principali caratteristiche di questo patogeno è la sua variabilità genetica, risultato sia di mutazioni puntiformi in specifici geni sia dell'acquisizione di frammenti di DNA esogeno (5). Entrambi questi meccanismi sono considerati responsabili della selezione e, quindi, della successiva diffusione di ceppi resistenti a diverse classi di antibiotici comprese penicilline, tetracicline, macrolidi e fluoroquinoloni. In seguito all'emergenza della resistenza alla ciprofloxacina (6), le linee guida per il trattamento farmacologico della gonorrea sono state riformulate a livello internazionale. L'uso di cefalosporine di terza generazione, singolarmente o in associazione con l'azitromicina, definisce il nuovo protocollo terapeutico (7). Attualmente, un ceppo di gonococco si definisce multi resistente (Multi Drug Resistance, MDR) se resistente ad almeno uno degli antibiotici della categoria I (tra i quali ceftriaxone, cefixime e spectinomina) e a due o più antibiotici appartenenti alla categoria II (tra i quali penicillina, ciprofloxacina, azitromicina) (8).

Negli ultimi anni (8-10), la circolazione di ceppi resistenti e/o a ridotta sensibilità agli antibiotici è andata sempre più aumentando in diversi Paesi, compresa l'Italia. A causa della comparsa di ceppi resistenti a uno o più antibiotici, la gonorrea potrebbe diventare una malattia non più trattabile farmacologicamente (7).

In Europa è ormai attivo da alcuni anni il Sistema di sorveglianza per l'antibiotico-resistenza dei ceppi di *N. gonorrhoeae*, denominato Euro-GASP (European Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme) e coordinato dall'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in gonococco nasce dall'esigenza di monitorare la circolazione dei ceppi resistenti, soprattutto quelli MDR.

Dal 2003 è stato avviato presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) uno studio in collaborazione con diversi Centri clinico-universitari italiani, per il monitoraggio e l'analisi dell'antibiotico-resistenza dei ceppi di *N. gonorrhoeae*. I ceppi di gonococco pervenuti in ISS sono stati saggiati per la sensibilità agli antibiotici e analizzati per l'identificazione di cloni emergenti attraverso l'NG-MAST (*N. gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing).

Materiali e metodi

Nel biennio 2012-2013, 417 ceppi di gonococco isolati da campioni clinici sono stati collezionati da 14 Centri clinico-universitari distribuiti in diverse Regioni italiane, ed esaminati presso il Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate dell'ISS. Dati anagrafici disaggregati e in forma anonima, clinici e di laboratorio, sono stati archiviati utilizzando il software Epi-Info (versione 3.3.2, 2005). Dopo crescita sul terreno di coltura Thayer-Martin (Oxoid, Ltd) a 37 °C e 5% di CO₂ per 24 h, i ceppi sono stati testati per l'antibiotico sensibilità utilizzando il metodo E-test e il metodo della diluizione in agar (11), seguendo le procedure standard.

I valori soglia di riferimento per valutare la sensibilità alla ciprofloxacina, azitromicina, cefixime, ceftriaxone e spectinomina, sono quelli indicati da EUCAST (Version 4.0, 2014): ≤0,03 e >0,06 mg/L per ciprofloxacina, ≤64 e >64 mg/L per spectinomina, ≤0,25 e >0,5 mg/L per azitromicina, ≤0,12 e >0,12 mg/L per cefixime, ≤0,12 e >0,12 mg/L per

ceftriaxone. La produzione di β -lattamasi, correlata alla resistenza alla penicillina G mediata da plasmide, è stata determinata utilizzando il test cromogeno Nitrocefin (Oxoid LTD). In ogni saggio per l'antibiotico sensibilità è stato introdotto un pannello di ceppi di gonococco di riferimento, WHO G, K, M, O e P, utilizzati e accettati a livello europeo (12). Per l'analisi molecolare, la definizione del Sequence Type (ST), tramite NG-MAST, fa riferimento al protocollo descritto da Martin *et al.* (13) e al sito www.ng-mast.net

Risultati

Nel biennio 2012-2013, in base ai dati clinico-epidemiologici a nostra disposizione, il 96,5% delle infezioni da gonorrea è stato diagnosticato in pazienti di sesso maschile di età media 33,2 anni. Nel 53% dei casi si trattava di soggetti omosessuali/bisessuali. Le infezioni nelle donne corrispondono al 3,5% dei casi, con un'età media di 33,6.

I siti d'isolamento più frequenti sono stati l'uretra (82%), il retto (15%) e la faringe (1,4%). I soggetti erano soprattutto di cittadinanza italiana (80%), rumena (4,2%) e marocchina (2,8%). La percentuale di ceppi resistenti alla ciprofloxacina è risultata paragonabile nei due anni, 63% nel 2012 e 61% nel 2013, rispettivamente. È importante sottolineare un aumento della resistenza all'azitromicina (2,2% *vs* il 7,5%; $p < 0.05$). Inoltre, si è osservata una diminuzione di ceppi produttori di β -lattamasi (Penicillinase-Producing *Neisseria Gonorrhoeae* - PPNG) con una percentuale del 6,3% nel 2012 e del 5,4% nel 2013, rispettivamente (Figura).

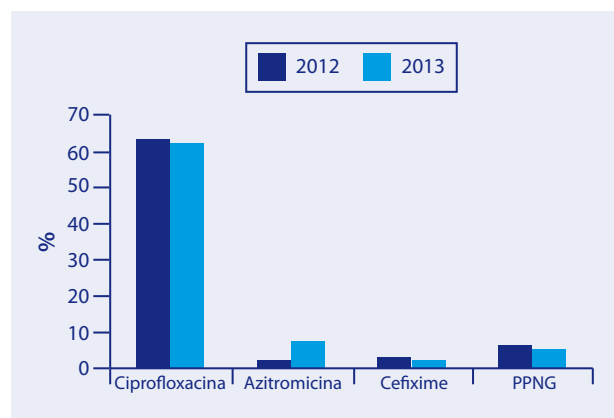


Figura - Percentuale di ceppi di *Neisseria gonorrhoeae* resistenti alla ciprofloxacina, azitromicina, cefixime e produttori di β -lattamasi (PPNG), nel biennio 2012-2013

Nel periodo 2012-2013 sono stati identificati ceppi resistenti al cefixime, ovvero ceppi con valori di MIC $> 0,12$ mg/L, in percentuale pari al 3,3% nel 2012 e al 2% nel 2013.

L'analisi molecolare, mediante NG-MAST, è stata effettuata esclusivamente su ceppi resistenti al cefixime per individuare la circolazione di gonococchi appartenenti al genogruppo 1407 (G1407). Quest'ultimo è considerato il predominante tra i ceppi resistenti a questo antibiotico. Su 12 ceppi resistenti al cefixime, il G1407 è stato identificato in 11 dei 12 ceppi esaminati. Inoltre, nel biennio in esame sono stati individuati 3 ceppi MDR, in particolare, resistenti alla ciprofloxacina, all'azitromicina e al cefixime.

Tutti i ceppi analizzati sono risultati sensibili al ceftriaxone e alla spectinomina.

Discussione

La gonorrea è una malattia causata da *N. gonorrhoeae*, è trasmessa per via sessuale e rappresenta la seconda malattia batterica sessualmente trasmissibile più diffusa al mondo. Le infezioni da gonococco antibiotico-resistente sono considerate un problema di sanità pubblica emergente, tanto da essere state incluse nel Global Action Plan dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (14). A questo riguardo, sono stati messi in atto numerosi piani di sorveglianza, sia in ambito nazionale che internazionale, per identificare e valutare la sensibilità agli antibiotici dei ceppi di gonococco. I dati prodotti dall'Euro-GASP nel 2011 hanno evidenziato la presenza di ceppi di gonococco con elevate percentuali di resistenza alla ciprofloxacina, all'azitromicina e al cefixime, pur con valori discordanti nei diversi Paesi (15). Per la ciprofloxacina, la percentuale media europea nel 2011 è stata del 48,7%, con una significativa diminuzione rispetto al 2010 (52,7%); tale valore rimane pur sempre elevato, nonostante tale antibiotico venga sempre meno utilizzato nella pratica clinica. Le percentuali di resistenza all'azitromicina, nel 2011, oscillano dallo 0% del Regno Unito al 14% della Spagna, con una media del 5,3% e una diminuzione significativa rispetto al 2010 (7,2%). Per quanto riguarda il cefixime, il Programma Euro-GASP ha evidenziato un lieve decremento nelle percentuali di ceppi resistenti a tale antibiotico (8,7% nel 2010 e 7,6% nel 2011); tuttavia, tali dati destano ugualmente preoccupazione dal momento che il ►

cefixime, insieme al ceftriaxone, è l'antibiotico raccomandato per il trattamento della gonorrea.

I nostri dati risultano in parte sovrapponibili a quelli europei. In particolare, la resistenza alla ciprofloxacina si mantiene su valori superiori al 50% (63% nel 2012 e 61% nel 2013); la resistenza al cefixime diminuisce lievemente, come già evidenziato negli anni passati (16), mentre va sottolineato l'incremento significativo della resistenza all'azitromicina (2,2% *vs* 7,5%; $p < 0.05$).

Per quanto riguarda l'analisi molecolare, il G1407 è quello maggiormente identificato ed è per lo più associato a ceppi resistenti o a ridotta sensibilità al cefixime, così come riportato in altri Paesi europei (17).

Dai dati finora ottenuti, seppure collezionati da 14 Centri clinico-universitari e che necessitano di un'ulteriore implementazione nel numero per avere una sempre maggiore rappresentatività a livello nazionale, si evince che un numero consistente di gonococchi sono resistenti a uno o più antibiotici. Il monitoraggio di queste infezioni permette di ottenere importanti dati sia riguardo ai pazienti suscettibili all'infezione sia riguardo alle caratteristiche microbiologiche più evidenti dei ceppi circolanti in Italia, contribuendo alla raccolta dei dati europei promossa dall'ECDC.

Nonostante le infezioni causate da *N. gonorrhoeae* non siano di elevata gravità e presentino valori di bassa incidenza nel nostro Paese, esse rappresentano un importante argomento di salute pubblica, in considerazione del fatto che i soggetti più colpiti appartengono a categorie vulnerabili quali, ad esempio, gli omosessuali e i soggetti immunocompromessi. È auspicabile, quin-



di, il mantenimento e il miglioramento di una rete di sorveglianza nazionale e internazionale che permetta di monitorare la circolazione dei ceppi di gonococco resistenti e multi-resistenti agli antibiotici, per rendere gli approcci terapeutici efficaci e favorire confronti dei dati a livello europeo e internazionale. ■

Dichiarazione di conflitto di interessi

Gli autori dichiarano che non esiste alcun potenziale conflitto di interesse o alcuna relazione di natura finanziaria o personale con persone o con organizzazioni, che possano influenzare in modo inappropriato lo svolgimento e i risultati di questo lavoro.

Riferimenti bibliografici

1. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, et al. *Malattie infettive batteriche*. Milano: Mc Graw Hill; 2009.
2. Koneman EW, Allen SD, Dowell Jr VR, et al. *Testo atlante di microbiologia diagnostica*. Roma: Antonio Delfino Editore; 2000.
3. World Health Organization. Sexually transmitted diseases: gonorrhoeae (www.who.int/topics/sexually-transmitted_infections/en/).
4. European Centre for Disease Prevention and Control. Sexually transmitted infections in Europe 2011. Stockholm: ECDC; 2011 (www.ecdc.europa.eu/en/publications/publications/sexually-transmitted-infections-europe-2011.pdf).
5. Viscidi RP, Demma JC. Genetic diversity of *Neisseria gonorrhoeae* housekeeping genes. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1):197-204.



6. Starnino S, Dal Conte I, Matteelli A, *et al.* Trend of ciprofloxacin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Italy and analysis of the molecular determinants. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67(4):350-4.
7. Bignell C, Unemo M on behalf of the European STI Guidelines Editorial Board. European guideline on the diagnosis and treatment of gonorrhoea in adults. 2012. *Int J STD AIDS* 2013;24(2):85-92.
8. Tapsall JW, Ndowa F, Lewis DA, *et al.* Meeting the public health challenge of multidrug and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009;7(7):821-34.
9. Ohnishi M, Golparian D, Shimuta K, *et al.* Is *Neisseria gonorrhoeae* initiating a future era of untreatable gonorrhea? Detailed characterization of the first strain with high-level resistance to ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(7):3538-45.
10. Carannante A, Prignano G, Cusini M, *et al.* Cefixime and ceftriaxone susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in Italy from 2006 to 2010. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(6):558-64.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S18. Wayne PA Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
12. European Centre for Disease Prevention and Control. Gonococcal antimicrobial susceptibility surveillance in Europe, 2011. Stockholm: ECDC; 2013 (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/gonococcal-antimicrobial-susceptibility-surveillance-27-mar-2013.pdf>).
13. Martin IM, Ison CA, Aanensen DM, *et al.* Rapid sequence-based identification of gonococcal transmission clusters in a large metropolitan area. *J Infect Dis* 2004;189:1497-505.
14. World Health Organization. Global Action Plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO; 2012. (www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/9789241503501/en/).
15. European Centre for Disease Prevention and Control. Annual Epidemiological Report 2013. Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. Stockholm: ECDC; 2013. (<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Annual-Epidemiological-report-2013.pdf>).
16. Carannante A, Stefanelli P e il Gruppo di studio per l'antibiotico-resistenza in gonococco. *Neisseria gonorrhoeae* antibiotico-resistente: risultati del periodo 2003-2011. *Not Ist Super Sanità* 2012;25(5):11-6.
17. Chisholm SA, Unemo M, Quaye N, *et al.* Molecular epidemiological typing within the European Gonococcal Antimicrobial Resistance Surveillance Programme reveals predominance of a multidrug-resistance clone. *Euro Surveillance* 2013;18(3):1-10.

Link utili

Centralized Information System
for Infectious Diseases (CISID)
<http://data.euro.who.int/cisid/>

European Committee on Antimicrobial
Susceptibility Testing (EUCAST).
Clinical breakpoints bacteria, Version 4.0
www.eucast.org/clinical_breakpoints/

*Gruppo di Studio per l'antibiotico-resistenza in gonococco

Ivano Dal Conte (Clinica SoS Infezioni Sessualmente Trasmesse, Ospedale Amedeo di Savoia, Torino); Valeria Ghisetti, Simonetta Del Re, Rosangela Milano (Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Dipartimento Malattie Infettive, Ospedale Amedeo Di Savoia, Torino); Aldo Di Carlo, Antonio Cristaudo, Guido Palamara, Grazia Prignano, Giampaolo Impara (IFO-IRCCS S. Gallicano, Roma); Marco Cusini, Livia Scioccati, Stefano Ramoni (UO di Dermatologia, Fondazione Policlinico Mangiagalli Regina Elena, Milano); Alberto Matteelli (Istituto di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Brescia, Brescia); Maria Antonia De Francesco (Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale, Università di Brescia); Maria Paola Landini, Vittorio Sambri, Antonietta D'Antuono, Francesca Cavrini, Caterina Vocale (Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico S. Orsola-Malpighi, Bologna); Raffaele Antonetti, Anna Di Taranto, Rossella De Nittis (Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali Riuniti, Foggia); Marina Gaino, Rosanna Predazzer, Patrizia Ober (UO di Microbiologia e Virologia, Ospedale Santa Chiara, Trento); Marina Buseti, Vincenzo Petix, Tatiana Rossi (Laboratorio di Batteriologia, IRCCS Burlo Garofolo, Trieste); Maria Agnese Latino, SS Batteriologia, PO Sant'Anna, Torino); Paola Pauri (Unità Operativa Patologia Clinica, Ospedale di Jesi); Antonella Mencacci, Marta Meucci (Laboratorio di Microbiologia, Ospedale Santa Maria della Misericordia, Perugia); Carmen Bonanno, Maria Carmela Cava (UO di Microbiologia e Virologia, Ospedale Sandro Pertini, Roma); Luigi Tagliaferro, Carla Colaci (Laboratorio Dr. Pignatelli, Lecce); Cristina Giraldi (UO Microbiologia e Virologia, Clinica Molecolare, PO Annunziata Azienda Ospedaliera, Cosenza).