



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE  
TECNOLOGICA

*Corso di Laurea Magistrale in  
Biologia Curriculum Biomedico e  
Biomolecolare*

***TESI DI LAUREA***

***Fast-track microbiology nella diagnosi di  
sepsi: comparazione tra protocolli di  
identificazione e antibiogramma rapido***

Relatore:

**Prof. Ranzato Elia**

Correlatore:

**Dott.ssa Tavano Cinzia**

Candidata: **Soncini Alessia**

Matricola 20021685

**Anno Accademico 2023/2024**

# INDICE

1.Introduzione .....	4
1.1 Sepsi .....	5
1.1.1 Segni .....	5
1.1.2 Incidenza.....	6
1.2 Diagnostica delle infezioni sistemiche.....	7
1.3 Gestione delle emocolture.....	11
1.3.1 Gestione delle emocolture positive .....	12
1.3.2 Tecnologie rapide .....	13
1.4 Terapia antimicrobica.....	17
1.4.1 Resistenze agli antibiotici.....	21
2. Scopo del lavoro .....	27
3. Materiali e metodi .....	30
3.1 Emocolture .....	30
3.2 Gestione emocolture positive – metodo colturale classico .....	32
3.3 Identificazione batterica tramite MALDI-ToF.....	33
3.3.1 Identificazione MALDI-ToF da colonia giovane.....	35
3.3.2 MBT Sepsityper®.....	36
3.4 BioFire FilmArray™.....	37
3.5 Antibiogramma .....	38
3.5.1 bioMérieux Vitek2®.....	38
3.5.2 Beckman Coulter MicroScan .....	40
3.6 Antibiogramma rapido QuickMIC® .....	43

3.7 Schema operativo per gestione di emocolture .....	45
4. Risultati.....	46
4.1 Campioni .....	46
4.2. Risultati antibiogramma diretto.....	48
4.3 Risultati QuickMIC® .....	65
4.4. Valutazione tecnica .....	66
5. Discussione .....	69
Allegati.....	74
Bibliografia e sitografia .....	84
Ringraziamenti.....	91

## 1.Introduzione

Le infezioni del torrente circolatorio, bloodstream infections o BSI, sono determinate dalla presenza di microrganismi proliferanti all'interno del torrente circolatorio.

Il sangue è un tessuto liquido sterile che può essere contaminato in seguito o in concomitanza ad una infezione a diretto contatto col circolo sanguigno come nel caso dell'endocardite o delle infezioni legate alla presenza di cateteri vascolari, o localizzata ad un organo o apparato ad esempio le infezioni delle basse vie aeree o del tratto urinario.

La sola presenza di batteri nel circolo sanguigno è definita batteriemia.

La presenza di microrganismi estranei nel torrente ematico scatena una risposta infiammatoria sistemica da parte del sistema immunitario, nel caso in cui tale risposta si riveli eccessiva e disregolata conduce a sepsi.

In caso di sospetto di tali forme infettive si rende necessario intraprendere la ricerca degli agenti patogeni che hanno causato l'infezione sistemica; l'identificazione di questi ultimi rappresenta una delle attività critiche per i laboratori di microbiologia, nonché una delle più importanti e caratterizzanti di questo settore. (Miller et al., 2018).

L'approccio alla sepsi richiede uno sforzo coordinato tra differenti discipline con il fine di raggiungere diagnosi corrette in modo tale da poter dispensare un'idonea terapia antimicrobica tenendo conto del crescente fenomeno delle multiresistenze (*antimicrobial stewardship*). Vi sono evidenze scientifiche a sostegno di come l'utilizzo di percorsi diagnostici fondati sulla combinazione di tecnologie innovative consenta un approccio diagnostico rapido, che a sua volta mostra un impatto positivo sulla riuscita di una terapia mirata precoce fondamentale per limitare i casi di decesso per sepsi. (Tiseo et al., 2022; Mangioni et al., 2019)

## 1.1 Sepsi

L'attuale definizione di sepsi, pubblicata nel febbraio 2016 da parte dell'European Society of Intensive Care Medicine e della Society of Critical Care Medicine, supera il concetto precedentemente utilizzato di SIRS e differenzia la risposta fisiologica del paziente all'infezione dal quadro di sepsi, che viene quindi intesa come anomala risposta dell'ospite che, in maniera indipendente dall'infezione, induce danno d'organo.

Con questa definizione si distingue nettamente il quadro di infezione con appropriata risposta flogistica dell'ospite, da quello di infezione accompagnata da una risposta flogistica abnorme e lesiva per l'organismo che la produce.

(Rhodes et al., 2017; Viscoli, 2016; Mandell et al., 2019)

### 1.1.1 Segni

I segni della sepsi possono essere sfumati, soprattutto in pazienti pediatrici e anziani, essi comprendono l'alterazione di parametri clinici, di laboratorio ed emodinamici. (NHS)

Si può definire un paziente come settico se, in concomitanza ad un'infezione diagnosticata in un altro distretto corporeo e ad almeno uno dei segni correlati ad insufficienza d'organo si rilevano:

- Temperatura corporea al di fuori del range di normalità, ipertermia o ipotermia
- Brividi
- Tachicardia
- Attività cardiaca anomala
- Iperventilazione dimostrata da una frequenza aumentata degli atti respiratori o da una  $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Ipossiemia
- Alterazione della conta leucocitaria con leucocitosi  $> 12000 \text{ GB}/\mu\text{L}$  o leucopenia  $< 4000 \text{ GB}/\mu\text{L}$
- Trombocitopenia
- Alterazione dello stato mentale

- Oliguria

In caso di shock settico le anomalie circolatorie, cellulari e metaboliche sono abbastanza profonde da aumentare sostanzialmente la mortalità (aumento oltre il 40%). Segni e sintomi caratteristici della sepsi si sommano a:

- Ipotensione persistente necessitante di vasopressori per mantenere una pressione arteriosa media di 65 mmHg
- Lattatemia >2 mmol/L nonostante adeguato ripristino della volemia.

In presenza di sepsi, per quanto riguarda le analisi condotte in laboratorio, si apprezza un rialzo della concentrazione plasmatica di: proteina C reattiva, lattati, procalcitonina e proadrenomedullina; si possono inoltre rilevare, come anticipato tra i sintomi patognomonici, attraverso un esame emocromocitometrico, leucocitosi, leucopenia o trombocitopenia. (De Plato et al.2019)

### **1.1.2 Incidenza**

L'incidenza dei casi di sepsi è elevata in tutto il mondo, ogni anno si verificano circa 50 milioni di casi, 1'200'000 dei quali sono registrati in Europa; sul totale, circa 11 milioni di casi, 157'000 per quanto riguarda il continente Europeo, si rivelano fatali. In Europa e Nord America la sepsi rientra tra le prime 7 cause di morte. Inoltre in circa il 50% dei sopravvissuti a sepsi si possono rilevare sequele fisiche, cognitive e psicologiche persistenti note come sindrome post-sepsi. Il totale recupero dall'evento può richiedere mesi o anni.

(Fitzpatrick et al., 2019; Goto et al., 2013; Markwart et al., 2020; Schlapbach et al., 2020)

Vi sono alcune categorie di persone maggiormente esposte al rischio di sepsi:

- Bambini di età inferiore a un anno
- Pazienti oncologici (rischio 10 volte maggiore)
- Pazienti immunodepressi
- Pazienti che hanno subito splenectomia

- Pazienti affetti da patologie croniche a cuore, fegato o polmoni
- Pazienti ricoverati in unità di terapia intensiva

Il fumo è un fattore di rischio di sepsi, poiché aumenta il rischio di infezione respiratoria.

Circa l'80% dei casi è di origine comunitaria, il restante 20%, nonostante non sia possibile ottenere una stima accurata, è correlabile con le pratiche assistenziali.

Per quanto riguarda l'eziologia dell'evento settico negli ultimi anni si è assistito ad una riduzione degli eventi provocati da Gram-positivi e da *methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*, con un'ascesa di infezioni provocate da batteri Gram-negativi (*Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.*) e da *Candida spp.* (in particolare da *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*).

Sulla sepsi insiste in modo importante il problema dell'antimicrobico-resistenza, in larga diffusione negli ultimi anni.

Nel mondo occidentale le infezioni a carico del tratto respiratorio rappresentano la più comune origine della sepsi con una percentuale pari al 35% del totale, incluso un gran numero di infezioni delle vie aeree inferiori e di infection-related ventilator-associated complications (IVAC) derivate dall'utilizzo di respiratori meccanici durante i ricoveri ospedalieri.

La sepsi ad origine urinaria appare in riduzione, nonostante rappresenti circa un quarto dei casi.

Una quota minore di episodi di sepsi ha inizio a partire dal tratto gastrointestinale o dalla cute e tessuti molli con un'incidenza dell'11% in ciascun caso.

(Suarez De La Rica et al., 2016; CDC, 2016)

## **1.2 Diagnostica delle infezioni sistemiche**

Le infezioni sistemiche sono determinate dall'attiva proliferazione di microrganismi nel torrente circolatorio; la presenza di questi ultimi è rilevabile mediante l'esecuzione di emocolture. L'emocoltura rappresenta il *gold standard* nella diagnostica microbiologica

di infezioni del torrente circolatorio; l'isolamento in coltura di batteri o funghi dal sangue ha importante valore diagnostico, poiché conferma la valutazione clinica, ha valore prognostico e terapeutico orientando la scelta dell'antimicrobico sulla base della specie alla quale appartiene il microrganismo ed alla sua sensibilità.

(Singer et al., 2016; Rhodes et al., 2017, De Plato et al., 2019)

La raccolta di campioni per emocoltura rientra tra le azioni comprese nella "hour-1 bundle" ovvero quelle azioni che vanno intraprese entro un'ora dal riconoscimento del caso di sepsi in modo tale da creare un protocollo standardizzato nella gestione dei pazienti per evitare trattamenti discontinui e tardivi, sottolineando così come la sepsi costituisca un'emergenza medica.

Identificazione precoce e gestione appropriata nelle prime ore migliora la prognosi di questi pazienti che necessitano di una valutazione iniziale dettagliata, di un trattamento urgente ed un monitoraggio continuo della risposta al trattamento.

Il bundle comprende:

- Misurazione dei lattati con ripetizione della misurazione nel caso in cui risultino  $>2$  mmol/L
- Raccolta di emocolture prima della somministrazione di antibiotici
- Somministrazione di antibiotici ad ampio spettro
- Somministrazione di 30 mg/Kg di cristalloidi per contrastare l'ipotensione se i lattati sono  $\geq 4$  mmol/L
- Somministrazione di vasocostrittori per paziente ipoteso durante o dopo il ripristino della volemia per mantenere una pressione arteriosa media  $\geq 65$  mmHg

(Levy et al., 2018)

Allo svolgimento delle operazioni descritte nel bundle è buona pratica integrare la richiesta di esami ematochimici utili a definire la gravità dell'evento come:

- Esame emocromocitometrico
- Creatinina e urea per definire la funzionalità renale
- Elettroliti: Na, K, Cl



- Glicemia
- proteina C reattiva come marcatore di flogosi
- Bilirubina totale e diretta, transaminasi (AST e ALT) per determinare la funzionalità epatica
- Valutazione dell'emostasi: PT, aPTT, fibrinogeno, D-dimero
- Procalcitonina come marcatore di sepsi

Le linee guida raccomandano di raccogliere 2 o più set di emocolture, in associazione a prelievi destinati alla coltura microbiologica da tutti i siti potenzialmente responsabili di sepsi prima di dare inizio alla terapia antimicrobica a patto che ciò non comporti un ritardo superiore a 45 minuti per l'inizio della terapia stessa. Nel caso in cui fosse necessario iniziare una terapia antibiotica nell'immediato, l'indicazione è di eseguire il prelievo per emocoltura subito prima di una nuova somministrazione oppure quando le concentrazioni ematiche di farmaco siano minime. (Evans et al., 2021; Rhodes et al., 2017)

Una diagnosi rapida ed accurata ha un impatto positivo sulla prognosi poiché determina un avvio tempestivo della terapia mirata nell'arco di 24-48 ore il che riduce del 20-30% la letalità associata all'infezione e contribuisce inoltre a prevenire l'uso indiscriminato di farmaci antinfettivi, riducendo i costi economici e il rischio di sviluppo di resistenze.

Considerando il grado di urgenza che comporta l'evento settico ed il fatto che questo non correli sempre con segni e sintomi specifici, il timing di esecuzione delle emocolture si rivela un fattore determinante, per questo motivo l'esame deve essere prescritto tempestivamente qualora vi sia sospetto clinico, non è indicato attendere la comparsa del picco febbrile per eseguire il prelievo in quanto questo non determina un aumento del tasso di positività all'esame. (Rhodes et al., 2017; Thompson et al., 1991)

Nonostante l'emocoltura rappresenti una procedura in apparenza semplice vede coinvolte nel processo numerose figure professionali come il clinico curante, l'infettivologo, il microbiologo, l'intensivista, il farmacista, i referenti del rischio clinico ecc.; per quanto riguarda l'atto del prelievo è bene che questo venga eseguito da personale infermieristico

formato, se possibile in presenza di due infermieri, ancor meglio sarebbe avere a disposizione un team di professionisti dedicato.

Per definizione un set di emocolture è composto da 2 flaconi, uno per microrganismi aerobi ed uno per anaerobi, l'ideale secondo linee guida sarebbe raccogliere 2 o 3 set per un totale di almeno 4, massimo 6 flaconi in un unico momento o entro un breve intervallo di tempo. Il prelievo in più flaconi agevola l'interpretazione dei risultati consentendo di distinguere una positività reale da una determinata da contaminanti con la valutazione del numero di set positivi per uno stesso microrganismo sul totale dei set prelevati.

(CLSI, 2007; Grohs et al., 2007; Hall et al., 2006; Kirn et al., 2013)

Per la raccolta ematica, è possibile operare con una strategia a singolo prelievo o a prelievi multipli; in caso di prelievo singolo il volume di sangue prelevato di circa 30/40 mL verrà distribuito nei set di flaconi. Nel caso di sospetto di sepsi in pazienti pediatrici il volume di sangue da prelevare viene definito in base al peso del paziente, avendo cura di non superare mai l'1-4.5% del volume ematico totale. Il volume ottimale da inoculare in ogni flacone è di 8-10 mL in modo da mantenere un rapporto tra sangue e brodo di coltura tra 1:5 e 1:10, è stato dimostrato come all'aumentare della quantità di sangue prelevata aumenti anche la sensibilità dell'esame a patto che non si superino i 10 mL di sangue per flacone. (AMCLI, 2014; AMCLI ETS, 2023; Lamy et al., 2016; Lin et al., 2013)

Così come sono molte le figure professionali coinvolte nel processo lo sono anche gli elementi che ne condizionano la riuscita ottimale, alcuni di questi sono già stati citati e sono suddivisibili in aspetti clinici e tecnici. Per quanto riguarda gli aspetti clinici:

- Momento del prelievo
- Intervallo tra i prelievi (la raccolta ad intervalli regolari è riservata a particolari sospetti clinici come ad esempio l'endocardite)
- Rapporto con la terapia antibiotica

aspetti tecnici:

- Sicurezza degli operatori
- Prodotti impiegati per l'antisepsi della cute e per il prelievo

- Modalità tecnica di prelievo (a prelievo singolo o multiplo)
- Volume di sangue prelevato (8-10 mL per flacone)
- Numero di emocolture eseguito (2-3 set)
- Modalità di conservazione e trasporto del campione (invio tempestivo al laboratorio senza sottoporre il campione a refrigerazione)

(AMCLI ETS, 2023)

### **1.3 Gestione delle emocolture**

Una volta raccolti, i campioni andrebbero affidati alla gestione del laboratorio di microbiologia nel minor tempo possibile in quanto l'incubazione deve avvenire entro al massimo a 2 ore dal momento del prelievo. Nell'attesa della consegna tali flaconi devono essere mantenuti a temperatura ambiente e non essere mai refrigerati o congelati.

Giunte in laboratorio le emocolture vengono poste in incubazione ad una temperatura di  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  per permettere agli eventuali microrganismi presenti al loro interno di crescere. I microrganismi patogeni si moltiplicano velocemente, ritardi nella consegna e nell'incubazione delle emocolture possono causare una mancata rilevazione della crescita da parte di sistemi automatizzati in quanto la curva di crescita potrebbe già aver raggiunto il plateau causando una mancata risposta per il paziente. Per garantire una gestione continua dei flaconi i laboratori che svolgono analisi chimico-cliniche in regime d'urgenza sono dotati di incubatori per emocolture.

(CLSI, 2022; Venturelli et al., 2017; Willems et al., 2012)

Il monitoraggio della curva di crescita è affidato ad incubatori automatizzati che mantengono i campioni in osservazione continua, ad una temperatura ottimale, per un tempo di 5 giorni. Mediante la lettura ad intervalli di 10 minuti di una fluorescenza proporzionale alla quantità di  $\text{CO}_2$  presente nel flacone viene generata una curva di crescita, una volta che questa supera una data soglia il campione viene indicato come positivo. Il tempo medio per la rilevazione di un'emocoltura positiva è compreso fra le

poche ore e i 3 giorni; Il 92–95% delle emocolture si positivizza entro le prime 24–48 ore di incubazione, la restante percentuale è dovuta a lieviti o microrganismi maggiormente esigenti. (Lamy et al., 2019)

### **1.3.1 Gestione delle emocolture positive**

Gli incubatori automatizzati generano dei segnali di allarme al momento della rilevazione di crescita significativa all'interno di un flacone, da questo momento l'emocoltura viene definita come positiva e la presa in carico del campione deve avvenire tempestivamente.

Vi è un protocollo standard da seguire per il processamento e prevede:

- Esame microscopico
- Subcoltura su terreni agarizzati
- Identificazione e antibiogramma fenotipico

L'esame microscopico prevede l'allestimento di un vetrino in strato sottile che verrà sottoposto alla colorazione di Gram ed alla successiva osservazione al microscopio ottico. Questo consente di raccogliere informazioni sulla morfologia, sulla tintorialità e sulla disposizione nello spazio dei microrganismi presenti nel campione. Questi dati sono sufficienti per fornire un referto preliminare al clinico o all'infettivologo informandolo del fatto che la positività sia dovuta a cocci, bacilli, coccobacilli o bastoncelli, Gram positivi o Gram negativi oppure che si tratti di lieviti. (CLSI, 2022)

Il materiale viene sottoposto a subcoltura su terreni solidi per poter visualizzare le colonie in seguito ad incubazione. Un primo flacone positivo per un paziente dovrà essere seminato su un terreno al sangue e su un agar cioccolato da incubare a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  in atmosfera arricchita di  $\text{CO}_2$  al 5%, nel caso si tratti di un flacone per anaerobi si deve inoculare anche un terreno per anaerobi non selettivo e non differenziale arricchito con vitamina K ed emina da incubare a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  in anaerobiosi. A seconda dei protocolli interni, dell'ecologia locale e sulla base dell'osservazione batterioscopica, è possibile seminare i campioni positivi anche su terreni selettivi o cromogenici. Per i flaconi positivi

successivi al primo si vanno a seminare un terreno al sangue o agar cioccolato ed un terreno per anaerobi dove necessario. La maggior parte dei microrganismi aerobi o anaerobi facoltativi crescono su terreni solidi dopo un'incubazione di 24-48 ore. Per quanto riguarda gli anaerobi stretti e i miceti si raccomanda di prolungare il tempo di incubazione (CLSI, 2022)

Partendo da colture pure cresciute su piastra è possibile, utilizzando metodi e strumentazioni disponibili nei vari laboratori di microbiologia, procedere all'identificazione dei microrganismi e all'esecuzione dell'antibiogramma (AST) con cui vengono fornite informazioni sulle MIC e su eventuali resistenze agli antimicrobici.

Questo metodo operativo standard consente la chiusura del referto da parte del laboratorio di Microbiologia in 24-72 ore dalla positivizzazione di un flacone.

### **1.3.2 Tecnologie rapide**

Come l'emocoltura rappresenta il *gold standard* nella diagnostica delle infezioni del torrente circolatorio, così la microbiologia tradizionale è lo standard d'eccellenza per l'identificazione dei patogeni responsabili di una sepsi; il limite che è stato riconosciuto nelle pratiche tradizionali è il tempo con cui viene fornita una risposta. Per questo motivo è fortemente consigliato l'impiego di tecnologie rapide che consentano una riduzione del *time-to-result*, così da ridurre il tempo con cui viene fornita una risposta e di conseguenza la durata della somministrazione di terapie ad ampio spettro, in favore del passaggio ad una terapia mirata.

(Bookstaver et al., 2017).

Tra le tecnologie rapide con le quali si possono dotare i laboratori di Microbiologia vi sono:

- Pannelli sindromici
- Antibiogramma da colonia giovane
- Antibiogramma fenotipico rapido

- MALDI-ToF
- Test fenotipici per la rilevazione di meccanismi di resistenza
- Test molecolari per la rilevazione dei meccanismi di resistenza

## **Pannelli sindromici**

I pannelli sindromici sono test molecolari in real time PCR o multiplex nested PCR coniugati con rilevazione su microarray. La maggior parte di questi pannelli consente in circa un'ora di identificare il microrganismo responsabile della positività di un'emocoltura fornendo anche indicazioni sulla presenza di geni di resistenza. Pannelli con un tempo di esecuzione maggiore consentono di identificare fino a 50 target. L'esecuzione di questa tipologia di test è molto semplice e rapida, partendo direttamente dal flacone positivo, con una manipolazione di 2-5 minuti, si ottiene una cartuccia pronta per essere sottoposta ad estrazione ed amplificazione completamente automatizzate. L'impiego di questi test permette di ottenere un risultato con 24-48 ore di anticipo rispetto alla microbiologia tradizionale. La loro struttura multitarget li rende utili per l'identificazione in colture polimicrobiche. L'esame colturale viene mantenuto a conferma del risultato di PCR e per poter proseguire con la refertazione di un antibiogramma. (Dien Bard et al., 2020)

## **Antibiogramma da colonia giovane**

Rappresenta una possibilità economica ed affidabile per ottenere un antibiogramma in tempi brevi sfruttando le capacità dei microrganismi subcolturati da emocoltura positiva di crescere rapidamente se incubati a  $42 \pm 2^\circ \text{C}$  in atmosfera arricchita di  $\text{CO}_2$  al 5%. Il terreno più adatto per la rapida identificazione e AST di batteri Gram-negativi è l'agar MacConkey, mentre quello per i Gram-positivi è l'agar sangue Columbia. (Frobose et al., 2021)

## **Antibiogramma fenotipico rapido**

La necessità di implementare questo tipo di tecnologie è data sia dalla necessità di fornire risposte più rapidamente sia dalla diffusione di microrganismi multiresistenti che rendono inefficaci le terapie empiriche ad ampio spettro; la pratica di utilizzare brodi di coltura positivi per anticipare i risultati di un antibiogramma è ampiamente diffusa nei laboratori, questo richiede che quindi vi sia una regolamentazione ed una standardizzazione. Alla base di tale pratica vi è la constatazione del fatto che la maggior parte delle emocolture positive è monomicrobica, a conferma di questo vengono in aiuto i pannelli sindromici e quindi a partire direttamente dai brodi di coltura positivi è possibile eseguire un antibiogramma; al contrario in caso di emocoltura polimicrobica l'antibiogramma non sarebbe eseguibile se non a partire da colonia in agar.

Il Comitato europeo sui test di sensibilità antimicrobica (EUCAST) e l'Istituto di standard clinici e di laboratorio (CLSI) hanno intrapreso la validazione di un metodo di disco-diffusione. Tale metodo prevede di partire direttamente da  $125 \pm 25 \mu\text{L}$  di brodo non diluito proveniente da emocoltura positiva da seminare su piastre di agar Mueller Hinton e Mueller Hinton Fastidious sulle quali verranno apposti dischetti di antibiotico e successivamente incubate a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  in aria ambiente o in atmosfere specifiche. Le letture atte a verificare l'inibizione verranno eseguite ad intervalli di 4, 6, 8 ore e a 16-20 ore, il diametro di inibizione verrà confrontato con specifiche tabelle riportanti i breakpoint per ciascuna molecola e le aree di incertezza tecnica o ATU che hanno l'obiettivo di ridurre risultati falsati dal breve tempo di incubazione. (AMCLI ETS, 2023) Sono stati inoltre brevettati sistemi in grado di produrre un'analisi di suscettibilità antibiotica completa di MIC in un intervallo di tempo ridotto partendo dal campione di emocoltura positivo.

Tra tali tecnologie si annoverano diversi sistemi:

- Accelerate Pheno® è un metodo in microdiluzione in brodo automatizzata su uno specifico rotore con un sistema di rilevamento basato sull'analisi morfocinetica dei batteri in crescita e quindi sull'elaborazione della MIC in base alle curve di crescita. Questo sistema consente l'identificazione in circa 2 ore e

l'antibiogramma rapido in 6-7 ore per un numero piuttosto limitato di microrganismi Gram-positivi, Gram-negativi e per *Candida albicans* e *C. glabrata*.

- bioMérieux Vitek® Reveal™ è un metodo di microdiluzione in brodo in micropiastra con un sistema di rilevamento della crescita batterica situato nel coperchio della micropiastra, che contiene indicatori della presenza di sostanze volatili provenienti dal metabolismo batterico. Il sistema è in grado di valutare 176 combinazioni microrganismo/antibiotico, ma solo su batteri Gram-negativi. Le MIC vengono determinate in media in 5 ore e mezza.
- Gradientech QuickMIC® è un metodo basato sulla formazione di un gradiente lineare di antibiotico in agar all'interno del quale viene inoculato il campione e sull'acquisizione di immagini in tempo reale. Attraverso le immagini acquisite, viene monitorata l'inibizione della crescita microbica in microcolonie nel tempo, con queste informazioni vengono ricavate la MIC in 2-4 ore. Anche questo metodo si applica solo a batteri Gram-negativi.

I limiti di questi metodi all'uso estensivo nei laboratori di microbiologia sono i costi, l'applicabilità a un numero abbastanza ristretto di microrganismi e la possibilità di utilizzo solo a fronte di infezioni monomicrobiche.

## **MALDI-ToF**

La tecnologia MALDI-ToF rappresenta una tecnologia solida e affidabile per l'identificazione di specie batteriche e fungine. Tramite l'identificazione di macromolecole in base al loro rapporto massa/carica, la generazione di spettri di massa di proteine presenti nei campioni ed il confronto con banche dati e profili standardizzati consente l'identificazione microbica.

La tecnica standard prevede che si parta da colonie pure in agar o brodocoltura, queste andranno poste in una matrice in grado di consentire la ionizzazione del campione. I frammenti ionizzati verranno accelerati in un campo magnetico e attraversando il tubo di



volò andranno a colpire un rilevatore che andrà a registrare uno spettro caratteristico, in questo modo è possibile identificare univocamente il microrganismo di partenza.

Con questa tecnologia è possibile eseguire un'identificazione di specie anche partendo da una coltura giovane o da brodocoltura, in questo modo si ottiene un'anticipazione del risultato di 12 ore rispetto all'indagine dopo semina ed incubazione overnight e di oltre 24 ore rispetto al protocollo standard con identificazione biochimica.

Sia che l'identificazione avvenga mediante il procedimento standard sia che si opti per un'identificazione rapida, non è possibile prescindere dall'osservazione batterioscopica e dall'utilizzo di campioni di partenza monomicrobici.

Partendo da flacone positivo è possibile allestire il campione per l'identificazione in modi differenti mediante:

- Centrifugazione e filtrazione
- Centrifugazione e successiva semina su piastra
- Arricchimento in brodo e centrifugazione
- Semina diretta su piastra

Ad eccezione della metodica che prevede la filtrazione di un concentrato è necessario che vi sia uno sviluppo colturale che prevede tempi di incubazione variabili da 1 a 5 ore. Raggiunti tali intervalli di incubazione l'identificazione mediante MALDI-ToF avviene con la preparazione standard utilizzando quanto concentrato o cresciuto su piastra ai vari intervalli di tempo. (Bhatti et al., 2014; Idelevich et al., 2014; Sarti et al., 2014)

## **1.4 Terapia antimicrobica**

La gestione di emocolture positive è finalizzata a fornire ai clinici informazioni fondamentali per intraprendere una terapia antimicrobica mirata per il paziente settico. Passare da una terapia empirica ad una mirata riduce la possibilità di sovrainfezioni dovute all'abbattimento della normale flora microbica residente e riduce il rischio di sviluppo di resistenze nei patogeni responsabili dell'infezione. Gli antibiotici sono

molecole di origine naturale o sintetica in grado di impedire lo sviluppo di batteri grazie alla loro tossicità selettiva. Sono quindi da impiegare nelle infezioni di origine batterica, solo su prescrizione medica, con dosi e posologia ben definite.

Gli antibiotici si classificano in base alla loro origine, struttura chimica, meccanismo d'azione e spettro d'azione. La classificazione in base allo spettro d'azione distingue antibiotici a:

- Ampio spettro, efficaci su molte specie batteriche
- Spettro ristretto, attivi su un numero limitato di specie
- Spettro selettivo, attivi su batteri appartenenti alla stessa specie
- Spettro mirato, efficaci verso una sola specie batterica

Prendendo in considerazione il meccanismo d'azione degli antibiotici si evidenzia come alcune molecole possiedono azione batteriostatica, ovvero inibiscono la crescita batterica permettendo al sistema immunitario del paziente di debellare l'infezione ed altre hanno azione battericida, provocando alterazioni tali da causare la morte dei batteri. L'attività antimicrobica viene valutata saggiando la minima concentrazione inibente, MIC, ovvero la concentrazione più bassa di molecola antibiotica, espressa in  $\mu\text{g/mL}$ , in grado di inibire la crescita batterica. L'azione antimicrobica può essere svolta tramite i seguenti meccanismi:

- Inibizione della sintesi del folato, antimetaboliti
- Danneggiamento delle funzioni della membrana plasmatica
- Inibizione della sintesi del peptidoglicano
- Inibizione della sintesi proteica
- Inibizione della sintesi di acidi nucleici

## **Inibitori della sintesi del folato**

Fanno parte di questa categoria i sulfamidici e le diaminopirimidine.

I sulfamidici sono farmaci batteriostatici ad ampio spettro che agiscono come inibitori competitivi nella sintesi di acido folico batterico andando a bloccare la diidropteroato sintetasi. Determinano carenza di acido folico che provoca una riduzione nella sintesi proteica e di conseguenza una diminuzione nella crescita batterica.

Le diaminopirimidine, come il trimetoprim, sono inibitori selettivi della diidrofolato reductasi batterica, si tratta di molecole ad ampio spettro con azione batteriostatica. Raramente è utilizzato da solo, viene associato al sulfametozazolo.

(Amico Roxas et al., 2005)

## **Molecole che danneggiano la membrana plasmatica**

In questa categoria si collocano i polipeptidi ciclici come la polimixina B e la polimixina E (colistina); sono molecole ad azione battericida. Fissandosi ai fosfolipidi delle membrane esterne e della membrana citoplasmatica ne alterano la permeabilità provocando la fuoriuscita di metaboliti citoplasmatici con conseguente morte cellulare.

(Madigan et al., 2007)

## **Inibitori della sintesi di peptidoglicano**

Il peptidoglicano è una struttura macromolecolare che compone la parete cellulare batterica, situata all'esterno della membrana plasmatica, essa preserva l'integrità della cellula e ne mantiene la morfologia. Gli antibiotici appartenenti a questa classe esprimono la loro attività battericida intervenendo a vari livelli nella sintesi del peptidoglicano, impedendo che questa arrivi a compimento.

Fanno parte di questa categoria  $\beta$ -lattamici quali penicilline, cefalosporine, monobattami e carbapenemi (ertapenem, imipenem, meropenem) accomunati dalla presenza di un

anello  $\beta$ -lattamico nella loro struttura. I  $\beta$ -lattamici si legano alle penicillin binding protein o PBP. Le varie molecole si differenziano per spettro d'azione e resistenza alle  $\beta$ -lattamasi, ovvero ad enzimi batterici in grado di distruggere l'anello che vengono sfruttati dai batteri per resistere all'azione antimicrobica; a questo scopo vengono impiegati degli inibitori suicidi, ovvero molecole che legate all'antibiotico lo proteggono subendo l'azione degli enzimi di resistenza e preservando così la molecola di antibiotico attiva, ne sono un esempio l'acido clavulanico, associato all'amoxicillina oppure il sulbactam combinato all'ampicillina. (Madigan et al., 2007)

Molecole come vancomicina, fosfomicina, bacitracina e cicloserina esplicano la loro attività battericida intervenendo in punti differenti della sintesi del peptidoglicano.

La vancomicina, nello specifico, è un antibiotico glicopeptidico tricyclico che va ad inibire la sintesi della parete cellulare legandosi con elevata affinità all'estremità D-alanil-D-alanina delle unità precursori della parete cellulare. Esplica la sua azione battericida nei confronti di microrganismi in divisione. Inoltre, altera la permeabilità della membrana cellulare batterica e la sintesi dell'RNA. Viene impiegata nel trattamento di infezioni sostenute da batteri Gram-positivi come *S. aureus*, *S.epidermidis*, (inclusi i ceppi meticillino-resistenti), *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* e nel trattamento di Enterococchi.

## **Inibitori della sintesi proteica**

Sono antibiotici avente come bersaglio il ribosoma batterico, il legame di queste molecole alle subunità ribosomiali blocca la sintesi proteica; hanno quindi attività batteriostatica, ad eccezione degli aminoglicosidi che possiedono attività battericida.

Tra gli aminoglicosidi si possono citare molecole come streptomina, gentamicina, amikacina e tobramicina, queste hanno azione battericida su microrganismi aerobi in quanto utilizzano un trasportatore ossigeno-dipendente per penetrare nella cellula batterica.

Le tetracicline sono antibiotici batteriostatici ad ampio spettro d'azione che si legano alla subunità ribosomiale 30S. Sono efficaci sia nei confronti di batteri aerobi che anaerobi, Gram-positivi e Gram-negativi.

I macrolidi come l'eritromicina sono inibitori reversibili della sintesi proteica, si legano alla subunità 50S. Hanno azione batteriostatica tempo-dipendente. Sono attivi nei confronti dei batteri Gram-positivi.

Il cloramfenicolo è un potente batteriostatico che appartiene a questa classe. Il suo legame avviene a livello della subunità 50S batterica, ma è in grado di bloccare la sintesi proteica mitocondriale interagendo con la subunità 70S in cellule eritropoietiche; la sua forte tossicità ne ha limitato l'impiego a casi in cui non sia disponibile una molecola alternativa. (Amico Roxas et al., 2005)

## **Inibitori della sintesi di acidi nucleici**

I farmaci appartenenti a questa classe hanno azione battericida. Chinoloni e fluorochinoloni bloccano due enzimi della classe delle topoisomerasi batteriche: DNA-girasi ATP-dipendente e topoisomerasi IV. Hanno elevato grado di affinità per le topoisomerasi batteriche e la loro azione è dipendente dalla concentrazione alla quale sono utilizzate, la loro attività decresce al diminuire del pH. Esempi di molecole sono acido nalidixico, ciprofloxacina e levofloxacina, si distinguono per il loro spettro d'azione. (Madigan et al., 2007)

### **1.4.1 Resistenze agli antibiotici**

Lo sviluppo e l'utilizzo di antibiotici ha rivoluzionato l'approccio al trattamento ed alla prevenzione di malattie infettive ed infezioni ritenute incurabili fino alla seconda metà del XX secolo. L'uso inappropriato ed eccessivo di questi farmaci però ha contribuito alla diffusione di meccanismi di resistenza da parte dei microrganismi.

Con il termine “resistente” si intende che un determinato microrganismo non viene inibito nella crescita da un dato antimicrobico. Le infezioni sostenute da batteri resistenti risultano più difficili da trattare, ancora di più lo sono quelle causate da batteri multi-resistenti (resistenti a 4 o più farmaci di diverse classi), in quanto le molecole a disposizione per debellarli si riducono e spesso possiedono molti effetti collaterali. Quello delle resistenze agli antimicrobici rappresenta un grave problema di salute pubblica a livello mondiale poiché comporta un aumento della morbilità, della letalità, della durata della malattia con possibilità di sviluppo di complicazioni e la possibilità di diffusione di vere e proprie epidemie; in questo scenario vi è anche una ricaduta economica dovuta al costo aggiuntivo richiesto per l’impiego di farmaci e procedure più costosi e al prolungamento delle degenze ospedaliere.

La resistenza ad un antibiotico può essere innata o acquisita. Per resistenza innata si intende un’insensibilità costituzionale che risulta immutabile nel tempo ed è geneticamente determinata, si manifesta in tutti i ceppi di una stessa specie e dipende dalle strutture del microrganismo e dalle caratteristiche dell’antibiotico in esame. La resistenza acquisita si sviluppa nel tempo in microrganismi originariamente sensibili ad una molecola, è favorita dall’elevata velocità di riproduzione dei batteri. Questo ultimo genere di resistenza può svilupparsi in seguito a mutazioni cromosomiche spontanee che si rendono evidenti a seguito dell’azione selettiva esercitata dall’antibiotico che debella batteri sensibili favorendo la diffusione di genotipi resistenti; oppure può instaurarsi per trasmissione orizzontale (extracromosomica), rappresenta la maggior parte delle resistenze acquisite e avviene attraverso meccanismi di coniugazione, trasformazione e trasduzione mediata da plasmidi. (Brunton et al, 2012)

Diversi sono i meccanismi messi in atto dalle cellule batteriche per resistere all’azione degli antibiotici, la resistenza avviene per:

- Ridotta permeabilità cellulare dovuta a cambiamenti strutturali nella membrana superficiale o per alterazione nel numero o nel lume dei canali di membrana (porine)

- Aumentato efflusso dell'antibiotico dall'interno della cellula per azione di pompe accoppiate a proteine canale
- Alterazione del bersaglio
- Produzione di enzimi inattivanti che privano l'antibiotico della sua attività come  $\beta$ -lattamasi, acetil-transferasi, fosfotransferasi

## Resistenza ai $\beta$ -lattamici

I meccanismi sopra descritti vengono messi in atto per resistere alla classe di antibiotici dei  $\beta$ -lattamici, in prevalenza però la resistenza viene operata da enzimi noti come  $\beta$ -lattamasi, in grado di idrolizzare l'anello  $\beta$ -lattamico caratteristico di questa classe di antimicrobici largamente utilizzati. Questi enzimi sono stati inizialmente identificati poiché responsabili della resistenza alla penicillina di *S. aureus*. Le  $\beta$ -lattamasi vengono suddivise in classi, A, B, C, D a seconda delle informazioni di sequenza e delle differenze nel meccanismo idrolitico; a loro volta le classi A, C e D rientrano tra le serino  $\beta$ -lattamasi, SBL; mentre la classe B appartiene alle metallo  $\beta$ -lattamasi, o MBL che sono zinco dipendenti. Tutte le classi sono state rilevate in più specie di batteri clinicamente significativi, sono particolarmente diffuse tra le *Enterobacteriaceae* come *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e tra altri Gram-negativi non fermentanti il lattosio come *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. (Tooke et al, 2019)

Le famiglie principali di enzimi includono:

- Classe A, TEM, SHV, CTX-M, KPC
- Classe B, NDM, IMP, VIM
- Classe C, AmpC, CMY, ADC
- Classe D, OXA (OXA-23, OXA 24/40, OXA-48)

Di gran rilievo è la resistenza alla classe dei carbapenemi, in larga e rapida diffusione tra le *Enterobacteriaceae*, risulta essere fonte di allerta sanitaria a livello globale in quanto infezioni sostenute da questo genere di microrganismi sono in forte aumento a causa della rapida diffusione e della difficoltà nel trattamento. La forza della diffusione di tali

resistenze sta nel fatto che i geni di resistenza si trovano su elementi genetici mobili, in particolare è stato identificato come gene codificante *bla*. (Bonomo et al, 2017)

Le carbapenemasi sono sempre state associate ad aree geografiche definite, l'incremento dei viaggi internazionali ha contribuito alla diffusione di questi meccanismi di resistenza, rendendo così necessaria l'ideazione di programmi di sorveglianza per poterne monitorare la diffusione.

$\beta$ -lattamasi di classe A e a spettro esteso, ESBL, sono ampiamente diffuse. Includono PC1 responsabile della resistenza alla penicillina in *S. aureus*, TEM una  $\beta$ -lattamasi identificata nei Gram-negativi attiva contro le aminopenicilline e le cefalosporine di prima generazione, CTX-M, cefotaximasi, attiva contro il cefotaxime ed altre cefalosporine di III e IV generazione; CTX-M rappresenta un gruppo in crescita tra le ESBL, in ultimo vi è la KPC, diffusa in Italia, Grecia e Stati Uniti e inizialmente identificata in *K. pneumoniae*. La produzione di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso è un meccanismo di difesa sviluppato dai batteri Gram-negativi a seguito dell'impiego di cefalosporine ad ampio spettro. (Medonça et al 2022; Tooke et al, 2019)

Nei confronti delle carbapenemasi a serina tipo KPC sono state recentemente sviluppate nuove combinazioni di cefalosporina-inibitore della  $\beta$ -lattamasi (ceftazidime/avibactam) e carbapenemico-inibitore della  $\beta$ -lattamasi (meropenem/vaborbactam o imipenem/relebactam).

$\beta$ -lattamasi di classe B, MBL, hanno uno spettro di attività molto ampio nei confronti delle molecole ad azione antimicrobica come penicilline, carbapenemi e cefalosporine. NDM e VIM, rilevate più comunemente in *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*, sono in rapida diffusione e sono responsabili del fallimento dei trattamenti con carbapenemi.

I microrganismi produttori di MBL conservano generalmente sensibilità ai monobattami (aztreonam). (Tooke et al, 2019)

$\beta$ -lattamasi di classe C sono distribuite in molte specie di Gram-negativi, a seguito di mutazioni indotte dall'utilizzo di  $\beta$ -lattamici si assiste ad un aumento delle resistenze; la rilevanza clinica di questa classe di enzimi è supportata dall'aumento della diffusione di enzimi come AmpC, CMY, FOX e DHA in *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*.



Soprattutto AmpC, la cui azione si limita solitamente alle penicilline combinate ad inibitore e alle cefalosporine di III generazione, può talvolta estendersi anche ai carbapenemi. (Tooke et al, 2019)

$\beta$ -lattamasi di classe D, o OXA sono le meno conosciute. Questa classe annovera enzimi attivi contro cefalosporine e carbapenemi, la loro diffusione è supportata da plasmidi. Non sono state rilevate soltanto in batteri Gram-negativi, ma anche in batteri Gram-positivi a dimostrare quanto sia ampia la loro diffusione. In particolare la diffusione di OXA-23 è responsabile della resistenza ai carbapenemi della maggior parte dei ceppi di *Acinetobacter baumannii*. (Tooke et al, 2019)

Ceppi penicillino-resistenti di *S. aureus* (e altri stafilococchi) producono le penicillinasi, le quali determinano resistenza ai  $\beta$ -lattamici. Per trattare le infezioni da stafilococchi penicillino-resistenti sono state quindi preferite meticillina, oxacillina e altre penicilline che non sono idrolizzate dalle penicillinasi. *S. aureus* ha acquisito PBP2a, esibendo resistenza alla meticillina. *S. aureus* resistente alla meticillina (MRSA) esprime il gene *mecA* codificato su plasmide e quindi trasmissibile orizzontalmente ad altri batteri. Questo gene codifica per PBP2a, una transpeptidasi alternativa con un sito di legame beta-lattamico inaccessibile, che rende quindi tutti i  $\beta$ -lattamici inattivi contro le popolazioni di *S. aureus* che la possiedono.

## **Resistenza alla vancomicina**

La vancomicina e i glicopeptidi sono farmaci impiegati nel trattamento di infezioni gravi causate da Gram positivi. L'azione antimicrobica è esercitata mediante legame alla parete cellulare batterica a livello dei residui D-Ala/D-Ala terminali, questo va ad interferire e ad interrompere il processo maturativo del peptidoglicano, provocando cedimenti strutturali nella parete batterica, stress osmotico e conseguente lisi cellulare, si pensava che questo meccanismo d'azione potesse essere immune a resistenze da parte dei batteri. Modificazioni amminoacidiche nei residui di D-Ala sono invece responsabili di una riduzione dell'affinità del legame della vancomicina al peptidoglicano in maturazione; i

geni responsabili di questa resistenza sono detti *vanA*, che conferisce resistenza a vancomicina e teicoplanina, e *vanB*, che conferisce resistenza alla sola vancomicina. La resistenza alla vancomicina è stata rilevata in varie specie di Enterococchi (VRE) ed è particolarmente diffusa in *E. faecium*, mentre più rari sono i casi di resistenza negli stafilococchi, in *C. difficile* e in *Streptococcus bovis*. (Stogios et al, 2020).

## 2. Scopo del lavoro

La sepsi rappresenta una vera e propria emergenza, comporta rischio di morte e, se non viene adeguatamente trattata, può avere ricadute a lungo termine con un'incidenza importante sulla qualità della vita per il paziente. Il numero di casi per anno la rende una tra le 7 cause di morte più frequenti al mondo.

Riuscire ad impostare una terapia corretta in tempi brevi per un paziente settico rappresenta uno degli obiettivi cardine della *stewardship* antimicrobica.

Questa tipologia di gestione vede coinvolte numerose figure professionali che adottano un modello comportamentale e decisionale volto ad ottimizzare l'outcome clinico e a contenere le conseguenze dannose determinate dall'utilizzo di terapie empiriche come: tossicità per il paziente, con conseguente necessità di ulteriori interventi e terapie per ridurre le conseguenze, e selezione di microrganismi patogeni con induzione di resistenze. Secondariamente, questa gestione mira a contenere i costi, ottimizzando le risorse disponibili, senza però compromettere la qualità delle cure. (Polidori et al, 2017)

La diffusione di microrganismi multi resistenti, MDRO, ha posto ulteriormente l'accento sulla necessità di avere a disposizione schemi di sorveglianza, gestione e terapie per fronteggiare e limitare l'espansione di tali germi, in quanto le possibilità terapeutiche per questo genere di infezioni sono ridotte ad un numero esiguo di molecole, difficili da gestire e con un'elevata tossicità.

Nella gestione dei pazienti settici si rivelano quindi fondamentali il passaggio alla terapia mirata ed il tempo nel quale avviene tale passaggio; per rendere questa operazione possibile è necessario conoscere il microrganismo responsabile della sepsi ed il suo profilo di sensibilità agli antimicrobici.

Questo compito viene affidato ai laboratori di microbiologia, che, a partire da prelievi ematici inoculati in flaconi da emocoltura, identificano e forniscono antibiogrammi per i campioni positivi a clinici ed infettivologi. Per ottenere tali dati con i metodi colturali classici, è necessario avere una crescita in agar dal flacone positivo in modo da utilizzare

colonie pure per i saggi, ciò richiede un tempo di 24-72 ore dalla positivizzazione di un flacone per generare un referto definitivo.

Tempistiche di questo genere, al giorno d'oggi, non sono compatibili con le esigenze di intervento sul paziente settico, sono state quindi messe a punto strategie operative e tecnologie rapide in grado di fornire informazioni ai clinici in tempi ridotti.

L'introduzione di metodiche di biologia molecolare, come FilmArray™ di BioFire Diagnostics Inc., ha permesso di ottenere informazioni sul microrganismo in 1 ora circa dalla positivizzazione del flacone; l'unione di questa metodica con l'utilizzo di colonie giovani per l'esecuzione dell'antibiogramma ha permesso di ridurre il tempo di refertazione a 24 ore dalla positività in caso di buona riuscita del processo. Questo percorso diagnostico, considerati i costi delle tecnologie molecolari, non risulta però applicabile ad ogni paziente e viene quindi riservato a casi critici.

La possibilità di effettuare identificazioni mediante MALDI-ToF ha permesso di garantire identificazioni in tempi ridotti per un maggior numero di campioni, grazie alla disponibilità in commercio di kit che consentono di ottenere un campione per l'identificazione a partire direttamente da flacone positivo, anziché da colonia; si ottengono quindi informazioni sul microrganismo in meno di 1 ora. Per quanto riguarda l'antibiogramma, la risposta più rapida la si può ottenere con una colonia giovane.

Qualunque strategia rapida si adotti è necessario avere a disposizione colonie seminate su terreni agarizzati cresciute dopo incubazione overnight a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  in caso di problematiche di crescita della colonia giovane o di identificazione e poiché la maggior parte dei saggi sopra citati non possono essere eseguiti in presenza di emocoltura positiva polimicrobica; in questi casi si rivela percorribile solo la strategia standard con esecuzione di identificazione e AST dopo crescita in piastra.

Risulta indispensabile per il laboratorio di microbiologia dotarsi di protocolli operativi che consentano una gestione ottimale delle emocolture in termini di tempo di risposta ed impiego di risorse, in relazione alla strumentazione disponibile, all'economia ed alla casistica dell'ambiente ospedaliero in cui ci si trova.

Scopo di questo lavoro, svolto presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale S. Andrea di Vercelli, è stabilire diversi protocolli di identificazione e antibiogramma rapidi a partire da diverse matrici, pellet batterico ottenuto dalla centrifugazione del brodo di emocoltura positivo, oppure da colonia giovane, e valutarne non solo la concordanza con il metodo di riferimento a partire da colonia isolata su subcoltura in terreno solido, ma anche gli aspetti economico-pratici, in modo da rendere più rapido l'iter diagnostico risparmiando sulle risorse impiegate e ottimizzando il lavoro del personale di laboratorio.

## 3. Materiali e metodi

### 3.1 Emocolture

I campioni di sangue per emocoltura vengono prelevati e posti in flaconi BD BACTEC™ dedicati. Il prelievo viene eseguito adottando tecniche sterili e per pazienti adulti il volume ematico raccomandato da inoculare in ciascun flacone è di 8-10 mL; per quanto riguarda pazienti in età pediatrica il volume da prelevare ed inoculare viene rapportato al peso e può variare tra 0.5-5 mL.

Tali flaconi rappresentano un sistema chiuso che non necessita di ulteriore manipolazione da parte dell'operatore prima dell'inizio dell'incubazione, quest'ultima deve avvenire nel minor tempo possibile dal prelievo.

I flaconi per emocoltura contengono una base di brodo di caseina di soia e una serie di elementi che li differenziano ed arricchiscono in modo da supportare la crescita di vari microrganismi, a questo scopo si differenziano come segue:

- BD BACTEC™ Plus Aerobic adatto alla ricerca di batteri aerobi obbligati, aerobi facoltativi e miceti. Questo flacone contiene resine cationiche e non ioniche in grado di neutralizzare molecole ad azione antibiotica e favorire il recupero di microrganismi (Wallis et al, 1980)
- BD BACTEC™ Lytic Anaerobic adatto alla ricerca di microrganismi anaerobi obbligati e facoltativi. Contiene saponina per lisare le componenti corpuscolate del sangue in modo da liberare patogeni intracellulari
- BD BACTEC™ Peds Plus per coltura e ricerca di batteri aerobi e miceti in campioni di volume inferiore a 3 mL; questa classe di flaconi contiene resine (Wallis et al, 1980)



Figura 1: flaconi di prelievo per emocoltura

Ogni flacone contiene sul fondo un sensore chimico in grado di emettere fluorescenza in risposta ad aumenti di CO<sub>2</sub> che viene prodotta dal metabolismo dei microrganismi eventualmente presenti nel campione. Gli aumenti nella fluorescenza del sensore sono proporzionali alla quantità di CO<sub>2</sub> presente nel flacone e vengono monitorati dallo strumento BD BACTEC™ FX.

La strumentazione BD BACTEC™ FX (BD Becton Dickinson Company, USA) rappresenta un sistema di monitoraggio continuo per emocolture in grado di garantire una temperatura di incubazione a  $35 \pm 1.5^\circ \text{C}$ , di mantenere i flaconi in agitazione ad intervalli cadenzati e di rilevare variazioni nella fluorescenza dei flaconi con letture ogni 10 minuti. Mediante la rilevazione della fluorescenza, il software dello strumento costruisce una curva di crescita che, superata una data soglia, identificherà il flacone come positivo; al contrario, nel caso in cui non vi siano rilevazioni significative, raggiunto il termine del protocollo di incubazione di 5 giorni, il flacone viene identificato come negativo per la crescita di microrganismi.



Figura 2: incubatore BD BACTEC™ FX

### 3.2 Gestione emocolture positive – metodo culturale classico

Alla rilevazione di un flacone positivo viene allestito un vetrino destinato all'osservazione al microscopio ottico dopo colorazione di Gram.

Successivamente il campione viene subcolturato su terreni agarizzati che permettano la crescita del microrganismo responsabile della positività del flacone, in questo modo, dopo una corretta incubazione a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  per 18-24 ore si ottengono colonie in quantità sufficiente per eseguire identificazione e AST seguendo il protocollo standard per la gestione di emocolture positive.

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Allestimento vetrino	~ 10 min
Colorazione di Gram	~ 10 min
Osservazione vetrino e subcoltura in agar	~ 10 min
Incubazione a $37^\circ\text{C}$	~ 18-24 h
Lettura piastra ed esecuzione identificazione e AST da colonia	~ 30 min
Verifica risultati AST e refertazione	18 h



### 3.3 Identificazione batterica tramite MALDI-ToF

Un approccio più rapido per l'identificazione batterica è dato dall'impiego di MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time of Flight) (MS; Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Questa tecnologia consente l'identificazione di microrganismi in pochi minuti. Per individuare il microrganismo in esame il sistema va ad eseguire un confronto dello spettro di massa del campione con quelli presenti all'interno di librerie.

Lo spettro viene ottenuto mediante la ionizzazione con un raggio laser delle proteine ribosomiali contenute nel campione, le quali verranno successivamente accelerate all'interno di un tubo di volo e forniranno picchi caratteristici in base alla loro quantità ed al tempo che impiegheranno a raggiungere il rivelatore; questo dato è dovuto al rapporto massa/carica delle molecole. A parità di carica, gli ioni aventi massa maggiore raggiungeranno il rivelatore in un tempo maggiore.

Il materiale di partenza per essere ionizzato viene posto in una matrice come l'acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA), questa, una volta colpita dal laser, cederà ioni al campione, i peptidi ionizzati raggiungeranno il rivelatore percorrendo un cilindro metallico sotto vuoto all'interno del quale vi è un campo elettrico in grado di accelerarli. (Suh et al, 2004).

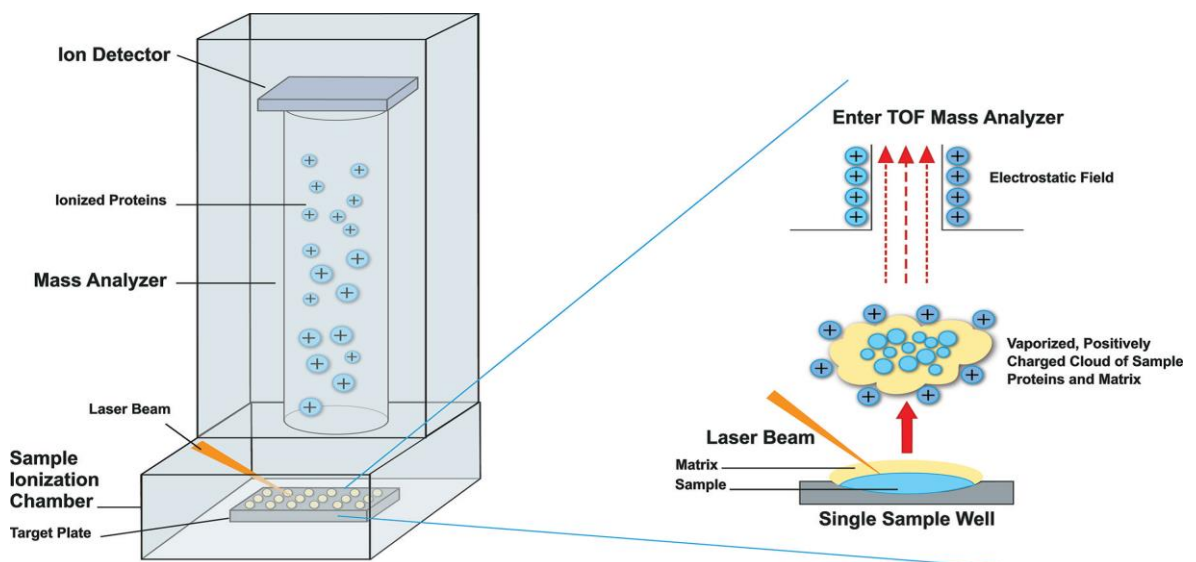


Figura 3: meccanismo d'azione MALDI-ToF

La procedura di esecuzione standard prevede che il materiale di partenza derivi da singola colonia cresciuta su terreno agarizzato dopo incubazione in termostato; questo approccio se utilizzato nella gestione di un'emocoltura positiva anticipa il tempo con cui viene fornita l'identificazione del microrganismo, poiché i tempi di analisi non superano la decina di minuti, ma richiede allo stesso modo 18-24 ore per permettere alla colonia di crescere.

L'identificazione con MALDI-ToF richiede che il campione venga posizionato su una piastra target, monouso in ceramica oppure riutilizzabile in acciaio inox.

Si provvede quindi a prelevare da una piastra di coltura una colonia batterica pura preferibilmente isolata, con un'ansa da inoculo oppure un bastoncino in legno o in plastica, e si trasferisce il materiale in una sede definita sulla piastra target MALDI-ToF; questa procedura è nota come applicazione "diretta". La maggior parte dei batteri viene identificata con un'applicazione diretta, senza ricorrere alla sovrapposizione di acido formico.

Lo spot sulla piastra target viene poi ricoperto con 1  $\mu$ L di matrice HCCA.

In alternativa, nel caso in cui il test con spot diretto fallisca o si stiano saggiando colonie piccole o molto mucose, le cellule batteriche possono essere ricoperte con 1  $\mu$ L di acido formico al 70% prima di aggiungere la matrice. Questo passaggio consente una lisi delle membrane cellulari e delle pareti batteriche che favorisce l'identificazione, è importante attendere che l'acido formico si asciughi prima di dispensare la matrice; questo passaggio richiede circa 5 minuti.

Lo spot sulla piastra target, una volta asciutto, viene ricoperto con 1  $\mu$ L di matrice HCCA. Per una buona riuscita dell'identificazione i campioni andrebbero ricoperti di matrice entro 30 minuti dalla deposizione sul target.

Una volta dispensata la matrice HCCA e trascorso un periodo di essiccazione a temperatura ambiente, o su piastra riscaldante a 35° C per circa 5 minuti la piastra viene inserita nella camera di ionizzazione dello spettrometro di massa per essere analizzata.

Una volta generato il vuoto e superato il controllo di qualità si ottiene l'identificazione del microrganismo in circa 1 minuto.

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Incubazione a 37°C	~ 18-24 h
Verifica crescita in piastra e richiesta di identificazione MALDI-ToF	~ 10 min
Applicazione diretta su target / Applicazione con aggiunta di acido formico 70%	~ 1 / 5 min
Applicazione matrice HCCA e asciugatura	~ 5 min
Identificazione MALDI-ToF e richiesta AST	~ 5 min

### 3.3.1 Identificazione MALDI-ToF da colonia giovane

Per ridurre il *time-to-result* è possibile procedere con l'identificazione a partire da colonia giovane: se dal Gram si osserva che si tratta di emocoltura monomicrobica, è possibile accelerare la crescita batterica con incubazione in atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub> al 5% a 42 ± 2° C, in questo modo in 4-6 ore si otterrà una crescita in piastra tale da poter consentire l'esecuzione di un'identificazione MALDI così da fornire informazioni sulla specie e contestualmente eseguire un AST fenotipico rapido partendo dalla medesima crescita.

Come da colonia isolata, anche nel caso della colonia giovane, ovvero della patina batterica cresciuta in terreni solidi in poche ore, l'allestimento dell'identificazione tramite MALDI-ToF avviene come descritto al paragrafo 3.3 e richiede solo pochi minuti, altrettanti ne richiede l'acquisizione e associazione degli spettri.

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Subcoltura in agar sangue in CO <sub>2</sub> e incubazione a 42°C	~ 4-6 h
Verifica crescita e richiesta di identificazione MALDI-ToF	~ 5 min
Applicazione diretta su target / Applicazione con aggiunta di acido formico 70%	~ 1 / 5 min
Applicazione matrice HCCA e asciugatura	~ 5 min
Identificazione MALDI-ToF e richiesta AST	~ 5 min

### 3.3.2 MBT Sepsityper®

Per abbreviare ulteriormente i tempi di risposta per l'identificazione, successivamente alla positivizzazione del flacone, all'osservazione del Gram e alla consapevolezza di lavorare con emocolture monomicrobiche è disponibile un kit che permette di eseguire un'identificazione con il sistema MALDI-ToF partendo direttamente dal flacone positivo. MBT Sepsityper® IVD Kit permette di ottenere, con una manipolazione di circa 5 minuti, un campione pronto per essere sottoposto ad identificazione a partire dal flacone positivo. Il protocollo contenuto in MBT Sepsityper® IVD Kit prevede che venga prelevato come materiale di partenza 1 mL di emocoltura positiva.

Ad esso verranno aggiunti 200 µL di buffer di lisi; si procede a miscelare mediante vortex per 15 s e a centrifugare in microcentrifuga ad una velocità di 14'000 rpm per 2 min.

Una volta rimosso il surnatante, il pellet viene risospeso in 1 mL di buffer di lavaggio e si procede quindi con una centrifugazione in microcentrifuga ad una velocità di 14'000 rpm per 1 min.

Il pellet ottenuto dopo la rimozione del surnatante e dopo una manipolazione di circa 5 minuti costituisce il materiale di partenza per l'allestimento del target per identificazione che avviene come precedentemente descritto al paragrafo 3.3.

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Osservazione del vetrino colorato con Gram e richiesta di identificazione MALDI-ToF	~ 10 min
Allestimento pellet con MBT Sepsityper® IVD Kit	~ 5 min
1 mL di campione + 200 µL buffer di lisi	
Centrifuga 14'000 rpm	2 min
Rimozione surnatante	
1 mL buffer di lavaggio e risospensione pellet	
Centrifuga 14'000 rpm	1 min
Rimozione surnatante	
Applicazione diretta su target / Applicazione con aggiunta di acido formico 70%	~ 1 / 5 min
Applicazione matrice HCCA e asciugatura	~ 5 min
Identificazione MALDI-ToF e richiesta AST	~ 5 min

### 3.4 BioFire FilmArray™

Nel percorso di identificazione dei microrganismi responsabili della positività di emocolture i pannelli sindromici ricoprono un ruolo centrale.

FilmArray™ di BioFire Diagnostics Inc. è un sistema chiuso in grado di eseguire una nested multiplex PCR che permette l'identificazione di microrganismi all'interno di diversi materiali biologici; il pannello BCID2 nello specifico è stato studiato appositamente per le emocolture. Questo sistema è semplice da utilizzare, a partire da flacone positivo, con una manipolazione di soli 2 minuti, per mezzo di dispensatori sottovuoto distinti con un codice colore, permette di ottenere una cartuccia sigillata all'interno della quale avverranno tutti gli step di PCR. Il pannello contiene differenti target molecolari in grado di identificare 33 patogeni tra batteri Gram-positivi, Gram-negativi e lieviti e 10 geni di resistenza agli antibiotici come *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>OXA-48 like</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* per le carbapenemasi, *bla<sub>CTX-M</sub>* (ESBL) ed il gene per la resistenza alla colistina *mcr-1* come descritto dall'allegato 1. Il tempo di analisi è di circa 1 ora. L'utilizzo di questo tipo di tecnologia aiuta il microbiologo a fornire una rapida risposta anche in caso di emocolture polimicrobiche in quanto l'approccio multitarget consente l'identificazione precisa ed accurata di più specie contemporaneamente.

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Osservazione del vetrino colorato con Gram e richiesta di identificazione FilmArray™	~ 10 min
Allestimento cartuccia BCID2 FilmArray™ ~200 µL di campione + sample buffer Miscelare per inversione Reidratazione cartuccia con buffer idratante Inoculo del campione nella cartuccia	~ 2 min
Identificazione FilmArray™	~ 1 h
<b>N.B.</b> Per l'esecuzione di AST è necessario allestire una coltura in agar secondo: Metodo standard Colonia giovane	~ 18-24 h ~ 4-6 h

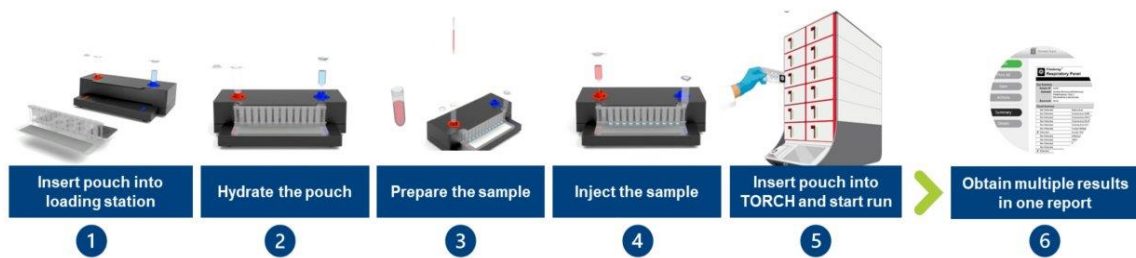


Figura 4: schema di preparazione Filmarray™

### 3.5 Antibiogramma

Refertare nel minor tempo possibile un antibiogramma è fondamentale, in caso di paziente settico, per poter avviare una terapia antibiotica mirata in quanto vengono fornite al clinico indicazioni sulle possibili resistenze del microrganismo e le MIC per diverse classi di antibiotici.

Per eseguire un antibiogramma fenotipico, sia che si tratti di una colonia giovane o di un pellet batterico ottenuto da flacone positivo, sia che la crescita sia avvenuta overnight, viene impiegata della strumentazione semi-automatizzata.

Presso il Laboratorio di Microbiologia dell’Ospedale S. Andrea di Vercelli, durante il periodo del tirocinio, sono stati utilizzati sia il sistema DxM 1096MicroScan WalkAway di Beckman Coulter che Vitek-2® di bioMérieux per l’esecuzione di antibiogrammi in modo semiautomatizzato.

#### 3.5.1 bioMérieux Vitek2®

Vitek-2® di bioMérieux è uno strumento che impiega delle card monouso dedicate all’identificazione e all’antibiogramma, a loro volta distinte in base alla tipologia di microrganismo da identificare ed ai differenti pannelli di antibiotici disponibili descritti nell’allegato 2.

Il punto di partenza è rappresentato da una sospensione di campione in soluzione fisiologica sterile alla concentrazione di 0.5 McFarland o più a seconda del pannello

utilizzato; questa sospensione verrà trasferita all'interno delle card mediante un vuoto esercitato dallo strumento che permetterà ad ogni pozzetto di riempirsi. Lo strumento funziona come incubatore, mantenendo una temperatura di  $35.5 \pm 1^\circ\text{C}$ , e come lettore ottico andando a rilevare variazioni di torbidità nei vari pozzetti ad intervalli di 15 minuti. Il tempo di incubazione può variare dalle 4 alle 18 ore. Ogni card presenta un controllo di crescita, nelle card dedicate all'identificazione avvengono delle reazioni colorimetriche e turbidimetriche in grado di fornire dati utili a stabilire la specie del microrganismo; nelle card AST la sospensione viene distribuita in pozzetti in cui vi sono concentrazioni crescenti di antibiotico, in base alla crescita che si sviluppa nei vari spot viene determinata la MIC.

Il campione con cui preparare la sospensione, come da indicazioni del produttore, è rappresentato dalla colonia isolata su terreno solido dopo crescita overnight. Sulla base dei risultati ottenuti da un lavoro di confronto tra metodi precedentemente svolto presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale S. Andrea di Vercelli, la sospensione può essere prodotta anche a partire da colonia giovane oppure da pellet batterico ottenuto per centrifugazione di un'aliquota di emocoltura positiva. Il metodo da colonia giovane si è dimostrato sovrapponibile all'antibiogramma da colonia isolata e per questo è stato adottato come protocollo *fast-track* su strumentazione Vitek2®.

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Richiesta identificazione e/o AST con Vitek-2® a partire da:	
Crescita standard	~ 18-24 h
Colonia giovane	~ 4-6 h
Pellet batterico	~ 5 min
Preparazione card Vitek-2®:	
Sospensione 0.5 McFarland in soluzione fisiologica sterile	~ 5 min
Associazione della card alla sospensione	
Caricamento cassetta con card e avvio analisi	
Verifica risultati AST e refertazione	4-18 h



Figura 5: strumentazione Vitek-2®.



Figura 6: card e sospensioni

### 3.5.2 Beckman Coulter MicroScan

DxM 1096MicroScan WalkAway di Beckman Coulter, è uno strumento in grado di fornire identificazione ed antibiogrammi mediante la lettura ottica della torbidità contro bianco in piastre a 96 pozzetti per microdiluzione in brodo. Sono disponibili pannelli differenti per identificazione, per AST, oppure in forma combinata per entrambi. Le piastre per AST sono costituite da 96 pozzetti comprendenti un controllo negativo, un controllo di crescita e differenti pozzetti sul fondo dei quali sono presenti antibiotici disidratati a concentrazioni crescenti ed in combinazioni differenti a seconda del pannello. I pannelli per AST si distinguono in base al microrganismo da testare, contengono molecole antibiotiche differenti a seconda delle possibilità terapeutiche e delle possibili resistenze dei batteri in esame, le molecole presenti nei pannelli e le relative concentrazioni saggiate, sono descritte nell'allegato 3.

Lo strumento consente l'incubazione a temperatura controllata di  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  e la lettura automatica dei pannelli al tempo 0, in modo da avere un valore di torbidità di riferimento, e dopo 18 ore; l'integrazione con il software permette l'interpretazione dei risultati secondo le linee guida EUCAST.

La preparazione standard del pannello prevede che si parta da una colonia batterica isolata, ottenuta dopo incubazione overnight, e che questa venga prelevata mediante un puntale sterile dedicato ed inoculata in un brodo Mueller-Hinton (M.H.).



Sulla base dei risultati ottenuti da un lavoro di confronto tra metodi precedentemente svolto presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale S. Andrea di Vercelli, è possibile preparare il brodo Mueller-Hinton anche come segue:

- Utilizzando una colonia giovane, metodo che in questo precedente studio è risultato sovrapponibile alla preparazione standard
- Inoculando 120 µL di una sospensione batterica a 0.5 McFarland ottenuta per centrifugazione di un'aliquota di emocoltura positiva e sospensione di quest'ultima in soluzione fisiologica sterile

Per il presente lavoro di tesi, il materiale di partenza con il quale viene preparata la sospensione è rappresentato dal pellet derivato dalla preparazione mediante MBT Sepsityper® IVD Kit.

Il brodo Mueller-Hinton, indipendentemente da come viene ottenuto, verrà quindi miscelato e dispensato all'interno dei pozzetti del pannello utilizzando un sistema multicanale a depressione che consente di dispensare lo stesso volume di inoculo in ogni pozzetto. Il brodo andrà a reidratare gli antibiotici e, a seconda della suscettibilità del microorganismo, verrà registrata o meno crescita (in turbidimetria) nei vari pozzetti.

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Richiesta AST con DxM 1096MicroScan WalkAway a partire da:	
Crescita standard	~ 18-24 h
Colonia giovane	~ 4-6 h
Pellet batterico	~ 5 min
Preparazione brodo Mueller-Hinton per AST a partire da colonia in agar:	
Prelievo di 3 colonie con puntale sterile	~ 2 min
Inoculo in brodo M.H. e miscelazione	
Preparazione brodo M.H. per AST a partire da pellet batterico:	
Sospensione 0.5 McFarland in soluzione fisiologica sterile	~ 5 min
Inoculo 120 µL di sospensione in brodo M.H.	
Miscelazione	

Preparazione pannello per DxM 1096MicroScan WalkAway:  dispensazione del brodo M.H. in vaschette monouso per inoculo  inoculo calibrato, mediante sistema a depressione, all'interno del pannello AST	~ 5 min
Caricamento del pannello e avvio analisi	
Verifica risultati AST e refertazione	18 h



Figura 7: fasi di preparazione pannello a partire da colonia.



Figura 8: strumentazione DxM 1096MicroScan WalkAway

### 3.6 Antibiogramma rapido QuickMIC®

In commercio sono presenti sistemi in grado di fornire antibiogrammi in tempi ridotti. Presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale S. Andrea di Vercelli è stato reso disponibile in prova il sistema QuickMIC® di Gradientech. Questo sistema consente di eseguire un'analisi di suscettibilità antibiotica per batteri Gram-negativi, direttamente da campione di emocoltura positivo in un intervallo di tempo di 2-4 ore. La sua tecnologia si basa su microfluidica e sull'acquisizione di immagini in tempo reale. L'antibiogramma viene ottenuto inoculando il campione in agarosio, il campione deve provenire da emocoltura positiva monomicrobica per batteri Gram-negativi; tale agarosio verrà fatto solidificare all'interno della cartuccia test. Questa cassetta contiene al suo interno un pannello di 12 antibiotici liofili, per le molecole si veda l'allegato 4, che vengono disciolti in brodo di Mueller Hinton al momento dell'utilizzo; l'aggiunta dell'agar consentirà la formazione di un gradiente di antibiotico lineare e stabile all'interno delle varie camere. In questo modo batteri e antibiotico vengono a contatto, nello strumento la temperatura è controllata ciò permette la crescita batterica sull'agar in forma di microcolonie, questa viene monitorata mediante l'acquisizione di immagini ad intervalli regolari, ove non verrà più registrata crescita verrà fornito il dato sulla MIC.

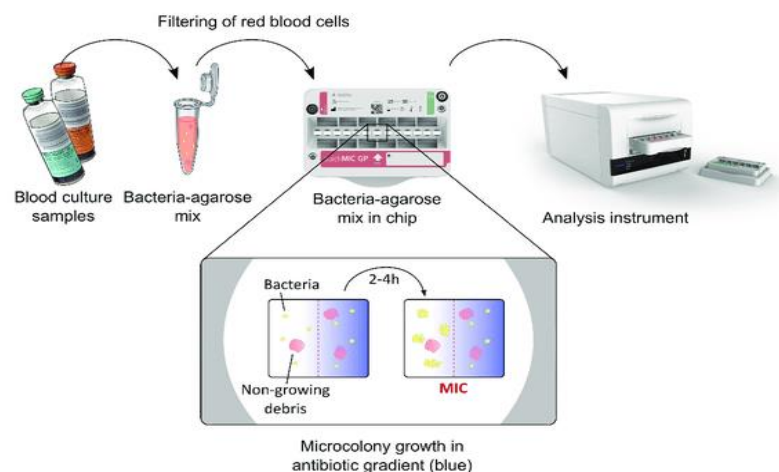


Figura 9: principio di funzionamento QuickMIC®

AZIONE	TEMPO DI ESECUZIONE
Osservazione del vetrino colorato con Gram e richiesta AST rapido QuickMIC®	~ 10 min
Preparazione della cassetta QuickMIC®:	
Porre il flacone di agarosio a 80°C per 5 min e mantenerlo a 38°C fino ad utilizzo (per essere utilizzato l'agarosio deve essere liquido)	~ 5 min
Attivare la cassetta mediante pressione	
Idratare gli antibiotici inoculando 20 mL di brodo M.H. nel circuito	~ 5 min
Miscelare 10 µL di campione in agarosio e miscelare	
Inoculare agarosio + campione nella cassetta	
Incubare a 2-8°C per permettere la solidificazione dell'agarosio e la formazione del gradiente antibiotico	15 min
Caricamento del pannello e avvio analisi	
Verifica risultati AST e refertazione	2-4 h

### 3.7 Schema operativo per gestione di emocolture



## 4. Risultati

### 4.1 Campioni

Per questo studio sono stati utilizzati 35 flaconi di emocoltura provenienti dai reparti del Presidio Ospedaliero S. Andrea di Vercelli. I campioni sono risultati positivi per microrganismi Gram-positivi in 13 casi, e per Gram-negativi nei restanti 22 campioni.

Nello specifico i Gram-positivi rilevati sono:

- *Enterococcus faecalis* (2)
- *Enterococcus faecium* (1)
- *Staphylococcus aureus* (3)
- *Staphylococcus capitis* (1)
- *Staphylococcus hominis* (3)
- *Staphylococcus warneri* (1)
- *Staphylococcus epidermidis* (1)
- *Streptococcus pneumoniae* (1)

Per quanto riguarda i microrganismi Gram-negativi, sono stati identificati:

- *Escherichia coli* (13)
- *Klebsiella pneumoniae* (7)
- *Pseudomonas aeruginosa* (1)
- *Salmonella spp.* (1)

Alla rilevazione della positività del flacone, l'identificazione del microrganismo è stata eseguita utilizzando la tecnologia MALDI-ToF; il materiale sottoposto a identificazione è stato il pellet batterico ottenuto con il kit MBT Sepsityper®. Contestualmente alla subcoltura in terreni agarizzati selettivi per incubazione overnight è stata seminata una piastra di agar sangue da incubare a 42°C in atmosfera arricchita di CO<sub>2</sub> al 5% per un tempo di 4-6 ore in base alla visibilità della crescita batterica.

Per i 35 campioni sono stati eseguiti i seguenti saggi di antimicrobico sensibilità:

- Da pellet batterico ottenuto mediante MBT Sepsityper® con pannelli Beckman Coulter DxM 1096MicroScan WalkAway
- Da colonia giovane con pannelli Beckman Coulter DxM 1096MicroScan WalkAway
- Da colonia giovane con pannelli bioMérieux Vitek2®.

In base a quanto esposto al paragrafo 3.5.2, la metodica di riferimento è rappresentata dall'AST fenotipico in microdiluzione eseguito con DxM 1096MicroScan WalkAway di Beckman Coulter a partire da colonia giovane.

Per due emocolture positive, entrambe per *Klebsiella pneumoniae*, non è stato possibile eseguire il test da colonia giovane con bioMérieux Vitek2®, mentre in un caso di emocoltura positiva per *Streptococcus pneumoniae* il pannello Beckman Coulter MicroStrep Plus 6 inoculato con pellet batterico è fallito per insufficienza di crescita.

Per i saggi di antibiogramma fenotipico rapido QuickMIC® sono stati processati 11 campioni di emocoltura positiva per microrganismi Gram-negativi così suddivisi:

- *Escherichia coli* (6)
- *Klebsiella pneumoniae* (2)
- *Pseudomonas aeruginosa* (1)
- *Serratia marcescens* (1)
- *Citrobacter koseri* (1)

Di questi un campione positivo per *Klebsiella pneumoniae* e il positivo per *Citrobacter koseri* sono falliti per un problema strumentale indipendente dal saggio di sensibilità.

Per i 9 microrganismi testati l'antibiogramma da colonia è stato eseguito con la strumentazione bioMérieux Vitek2® secondo le indicazioni del produttore.

La scelta di questa strumentazione è dettata dalla maggiore similarità tra il pannello Vitek® AST-N397 con il pannello disponibile su QuickMIC®.

## 4.2. Risultati antibiogramma diretto

I risultati degli AST sono stati analizzati per Concordanza Categorica (Categorical Agreement, CA), ovvero l'effettiva concordanza di sensibili (S) e resistenti (R) determinati dal metodo in esame rispetto alla metodica di riferimento. Il CA deve risultare  $\geq 90\%$  per determinare una concordanza ottimale tra i metodi.

Gli errori categorici sono stati definiti come Major Error (ME) nel caso di veri sensibili determinati come resistenti (falsi R) e come Very Major Error (VME) per i veri resistenti indicati come sensibili (falsi S); entrambi i parametri devono risultare  $\leq 3\%$  per determinare una concordanza ottimale. (ISO 20776-2:2021)

In aggiunta i risultati AST sono stati analizzati, ove possibile, in base alle concentrazioni di MIC testate nei diversi pannelli per Essential Agreement (EA), ovvero la riproducibilità del valore di MIC. In particolare la MIC testata deve rientrare in un intervallo di  $\pm 1$  diluizione rispetto alla MIC di riferimento. Il valore di EA totale deve risultare  $\geq 90\%$ . Dove non è stato possibile valutare il valore di MIC a causa di risultati inferiori o superiori alla soglia di rilevazione del pannello, si è analizzata la concordanza per valori limite di MIC in un intervallo di  $\pm 1$  fra i due pannelli (EA esteso). (ISO 20776-2:2021)

Per ogni metodo sono state valutate la concordanza o discordanza per tutti i campioni e tutte le molecole insieme a dare il "totale complessivo". Totali complessivi superiori a 30 sono considerati significativi.

È stata eseguita un'analisi complessiva di tutti i dati ottenuti con i diversi metodi valutando CA (tabella 1), ME (tabella 2), VME (tabella 3) ed EA (tabella 4) rilevando come, complessivamente, vi sia una buona concordanza di entrambi i metodi rispetto al metodo di riferimento.

<b>Tabella 1: Categorical Agreement per metodo</b>				
Metodo	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
Pellet batterico	18	672	690	97,39130435
VITEK	22	401	423	94,79905437



<b>Tabella 2: Major Error per metodo</b>				<b>Tabella 3: Very Major Error per metodo</b>			
Metodo	n° ME	Totale complessivo	%ME	Metodo	n° VME	Totale complessivo	%VME
Pellet batterico	3	690	0,434782 609	Pellet batterico	12	690	1,739130 435
VITEK	7	423	1,654846 336	VITEK	12	423	2,836879 433

Per quanto riguarda l'AST in microdiluizione in brodo da pellet batterico, è stato rilevato un CA del 97.4% (tabella 1) con un ME dello 0.4% (tabella 2) ed un VME di 1.7% (tabella 3), queste percentuali sono indice di una buona concordanza tra metodi.

<b>Tabella 4: Essential Agreement per metodo</b>				
Metodo	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%EA
Pellet batterico	22	701	723	96,9571231
VITEK	20	401	421	95,24940618

Considerando le MIC saggate complessivamente con i metodi in microdiluizione in brodo è possibile notare un EA di 96.9% (tabella 4), ampiamente al di sopra della percentuale indicata dalla ISO di riferimento.

Complessivamente, la comparazione degli antibiogrammi ottenuti con Vitek-2® di bioMérieux ha riportato un CA del 94.8% (tabella 1) con ME e VME accettabili, rispettivamente di 1.7% (tabella 2) e 2.8% (tabella 3).

Vi è una differenza tra le molecole presenti all'interno dei pannelli, poiché i due metodi sono differenti, tale per cui il "totale complessivo" risulta inferiore rispetto al metodo da pellet batterico.

Essendo inoltre differenti anche le concentrazioni delle molecole antibiotiche, è stato possibile mettere a confronto i valori di MIC ottenuti valutando l'Essential Agreement anche in modo esteso e si è ottenuta una percentuale di concordanza del 95.2% (tabella 4).

Da queste rilevazioni è possibile quindi dedurre che nel complesso i metodi sono concordanti, sia per quanto riguarda l'interpretazione che per le MIC.

Scendendo più nel dettaglio dell'analisi, dividendo i campioni in Gram-positivi e Gram-negativi, la concordanza tra metodi rimane accettabile. Si riportano di seguito i valori di CA (tabella 5 e tabella 7), ME (tabella 8), VME (tabella 9) ed EA (tabella 6 e tabella 10) degli AST in microdiluzione ottenuti da pellet batterico.

<b>Tabella 5: Categorical Agreement pellet batterico Gram-negativi</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
Amikacina		22	22	100
Amoxicillina/ac. clavulanico	2	17	19	89,47368421
Ampicillina		21	21	100
Aztreonam		22	22	100
Cefepime		22	22	100
Cefotaxime		21	21	100
Ceftazidime/avibactam		20	20	100
Ceftazidime	1	19	20	95
Ceftolozane/tazobactam		19	19	100
Cefuroxime		20	20	100
Ciprofloxacina		22	22	100
Colistina	1	20	21	95,23809524
Eravaciclina		6	6	100
Ertapenem		21	21	100
Fosfomicina	1	12	13	92,30769231
Gentamicina		21	21	100
Imipenem		15	15	100
Levofloxacina		22	22	100
Meropenem/vaborbactam		13	13	100
Meropenem		22	22	100
Piperacillina/tazobactam	1	21	22	95,45454545
Tigeciclina		13	13	100
Tobramicina	2	20	22	90,90909091
Trimetoprim/sulfametoxazolo		21	21	100
<b>Totale Pellet Gram-negativi</b>	<b>8</b>	<b>452</b>	<b>460</b>	<b>98,26086957</b>

Per quanto riguarda i microrganismi Gram-negativi il CA è del 98.3% (tabella 5) con un ME complessivo dello 0.43% (tabella 8) ed un VME complessivo dell'1.08% (tabella 9). Errori di interpretazione del tipo VME sono stati rilevati per amoxicillina/ac. clavulanico, colistina, fosfomicina, piperacillina/tazobactam e tobramicina.

Per la categoria dei Gram-negativi l'EA è risultato del 98.5% (tabella 6).

<b>Tabella 6: Essential Agreement pellet batterico Gram-negativi</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%EA
Amikacina		22	22	100
Amoxicillina/ac. clavulanico	2	17	19	89,47368421
Ampicillina		22	22	100
Aztreonam		22	22	100
Cefepime		22	22	100
Cefotaxime		22	22	100
Ceftazidime/avibactam		20	20	100
Ceftazidime	1	20	21	95,23809524
Ceftolozane/tazobactam		19	19	100
Cefuroxime		21	21	100
Ciprofloxacina		22	22	100
Colistina		21	21	100
Eravaciclina		7	7	100
Ertapenem	1	21	22	95,45454545
Fosfomicina	1	13	14	92,85714286
Gentamicina		22	22	100
Imipenem		15	15	100
Levofloxacina		22	22	100
Meropenem/vaborbactam		13	13	100
Meropenem	1	21	22	95,45454545
Piperacillina/tazobactam	1	21	22	95,45454545
Tetraciclina		1	1	100
Tigeciclina		21	21	100
Tobramicina		22	22	100
Trimetoprim/sulfametoxazolo		22	22	100
<b>Totale pellet Gram-negativi</b>	<b>7</b>	<b>471</b>	<b>478</b>	<b>98,53556485</b>

I risultati degli AST eseguiti su microrganismi Gram-positivi hanno dato un CA del 95.7% (tabella 7) con un ME e VME complessivi rispettivamente di 0.43% (tabella 8) e 3.04% (tabella 9); questo indicatore si trova appena sopra il limite consentito dalla ISO di riferimento.

<b>Tabella 7: Categorical Agreement pellet batterico Gram-positivi</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
Amikacina	1	8	9	88,88888889
Ampicillina	1	2	3	66,66666667
Azitromicina		9	9	100
Ceftarolina		3	3	100
Ciprofloxacina	1	11	12	91,66666667
Clindamicina		9	9	100
Daptomicina		9	9	100
Eritromicina		9	9	100
Fosfomicina		9	9	100
Gentamicina		12	12	100
Imipenem		2	2	100
Levofloxacina	1	11	12	91,66666667
Linezolid		12	12	100
Minociclina		8	8	100
Moxifloxacina		9	9	100
Ofloxacina		9	9	100
Oxacillina	1	8	9	88,88888889
Penicillina	1	6	7	85,71428571
Pristinamicina	1	8	9	88,88888889
Quinopristina/dalfopristina		12	12	100
Teicoplanina		6	6	100
Tetraciclina		9	9	100
Tigeciclina		12	12	100
Tobramicina	2	7	9	77,77777778
Trimetoprim/sulfametoxazolo	1	8	9	88,88888889
Vancomicina		12	12	100
<b>Totale pellet Gram-positivi</b>	<b>10</b>	<b>220</b>	<b>230</b>	<b>95,65217391</b>

ME (tabella 8) sono stati riscontrati solo nei confronti dell'amikacina, mentre VME (tabella 9) sono stati rilevati, nelle seguenti molecole: ampicillina, ciprofloxacina, levofloxacina, penicillina, tobramicina e trimetoprim/sulfametoxazolo.

<b>Tabella 8: Major Error pellet batterico Gram-negativi e Gram-positivi</b>				
Gram	Molecola	ME	Totale	%ME
NEG	Amoxicillina/ac.clavulanico	1	19	5,263158
	Tobramicina	1	22	4,545455
<b>NEG Totale</b>	<b>Major Error totale Gram-negativi</b>	<b>2</b>	<b>460</b>	<b>0,434783</b>
POS	Amikacina	1	9	11,111111
<b>POS Totale</b>	<b>Major Error totale Gram-positivi</b>	<b>1</b>	<b>230</b>	<b>0,434783</b>

<b>Tabella 9: Very Major Error pellet batterico Gram-negativi e Gram-positivi</b>				
Gram	Molecola	VME	Totale	% VME
NEG	Amoxicillina/ac.clavulanico	1	19	5,263157895
	Colistina	1	21	4,761904762
	Fosfomicina	1	13	7,692307692
	Piperacillina/tazobactam	1	22	4,545454545
	Tobramicina	1	22	4,545454545
<b>NEG Totale</b>	<b>Very Major Error totale Gram-negativi</b>	<b>5</b>	<b>460</b>	<b>1,086956522</b>
POS	Ampicillina	1	3	33,33333333
	Ciprofloxacina	1	12	8,333333333
	Levofloxacina	1	12	8,333333333
	Penicillina	1	7	14,28571429
	Tobramicina	2	9	22,22222222
	Trimetoprim/sulfametossaxolo	1	9	11,11111111
<b>POS Totale</b>	<b>Very Major Error totale Gram-positivi</b>	<b>7</b>	<b>230</b>	<b>3,043478261</b>

L'EA del metodo in microdiluizione da pellet per la categoria dei Gram-positivi è del 93.9% (tabella 10).

<b>Tabella 10: Essential Agreement pellet batterico Gram-positivi</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%EA
Amikacina	1	8	9	88,88888889
Ampicillina	1	2	3	66,66666667
Azitromicina		9	9	100
Ceftarolina		3	3	100
Ciprofloxacina	1	11	12	91,66666667
Clindamicina		9	9	100
Daptomicina	1	11	12	91,66666667
Eritromicina	1	11	12	91,66666667
Fosfomicina		9	9	100
Gentamicina		12	12	100

Imipenem		2	2	100
Levofloxacin	1	11	12	91,66666667
Linezolid		12	12	100
Minociclina	1	10	11	90,90909091
Moxifloxacin		9	9	100
Ofloxacin		9	9	100
Oxacillina	1	8	9	88,88888889
Penicillina		7	7	100
Pristinamicina	2	10	12	83,33333333
Quinopristina/dalfopristina	1	11	12	91,66666667
Teicoplanina		6	6	100
Tetraciclina	1	11	12	91,66666667
Tigeciclina		12	12	100
Tobramicina		9	9	100
Trimetoprim/sulfametoxazolo	1	8	9	88,88888889
Vancomicina	2	10	12	83,33333333
<b>Totale pellet Gram-positivi</b>	<b>15</b>	<b>230</b>	<b>245</b>	<b>93,87755102</b>

Mantenendo la stessa suddivisione tra Gram-positivi e Gram-negativi e prendendo in considerazione i risultati ottenuti con Vitek-2® di bioMérieux, si riportano per i Gram-negativi un CA del 95.7% (tabella 11), con ME dell'1.42% (tabella 14) e VME al 2.13% (tabella 15). L'EA è del 96.8% (tabella 12).

<b>Tabella 11: Categorical Agreement Vitek2® Gram-negativi</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
Amikacina	2	18	20	90
Amoxicillina/ac. clavulanico	2	15	17	88,23529412
Cefepime		20	20	100
Cefotaxime		19	19	100
Ceftazidime/avibactam		17	17	100
Ceftazidime	1	19	20	95
Ceftolozane/tazobactam		17	17	100
Ciprofloxacina		20	20	100
Colistina	2	17	19	89,47368421
Gentamicina	1	18	19	94,73684211
Imipenem		15	15	100
Meropenem		20	20	100
Piperacillina/ tazobactam	3	17	20	85
Tobramicina	1	18	19	94,73684211
Trimetoprim/sulfametoxazolo		19	19	100
<b>Totale Vitek Gram-negativi</b>	<b>12</b>	<b>269</b>	<b>281</b>	<b>95,72953737</b>

<b>Tabella 12: Essential Agreement Vitek2® Gram-negativi</b>				
Molecola	Discordanti	concordanti	Totale complessivo	%EA
Amikacina	2	18	20	90
Amoxicillina/ac. clavulanico		17	17	100
Cefepime		20	20	100
Cefotaxime		19	19	100
Ceftazidime/avibactam		17	17	100
Ceftazidime		20	20	100
Ceftolozane/tazobactam		17	17	100
Ciprofloxacina		20	20	100
Colistina	1	18	19	94,73684211
Gentamicina	2	18	20	90
Imipenem		15	15	100
Meropenem	1	17	18	94,44444444
Piperacillina/tazobactam	2	18	20	90
Tobramicina	1	18	19	94,73684211
Trimetoprim/sulfametoxazolo		19	19	100
<b>Totale Vitek Gram-negativi</b>	<b>9</b>	<b>271</b>	<b>280</b>	<b>96,78571429</b>

Valutando gli indici per la categoria dei Gram-positivi viene evidenziato un CA del 92.9% (tabella 13) con ME al 2.11% (tabella 14) e VME al 4.22% (tabella 15); l'EA risulta al 92.2% (tabella 16).

<b>Tabella 13: Categorical Agreement Vitek2® Gram-positivi</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
Ampicillina		3	3	100
Cefotaxime		1	1	100
Ceftarolina		3	3	100
Ciprofloxacina		3	3	100
Clindamicina	1	8	9	88,88888889
Daptomicina		9	9	100
Eritromicina		10	10	100
Gentamicina	3	9	12	75
Imipenem		2	2	100
Levofloxacina	1	12	13	92,30769231
Linezolid	1	12	13	92,30769231
Oxacillina		9	9	100
Penicillina		4	4	100
Teicoplanina		6	6	100

Tetraciclina	2	8	10	80
Tigeciclina		12	12	100
Trimetoprim/sulfametoxazolo	2	8	10	80
Vancomicina		13	13	100
Totale Vitek Gram-positivi	10	132	142	92,95774648

<b>Tabella 14: Major Error Vitek2® Gram-negativi e Gram-positivi</b>				
Gram	Molecola	ME	Totale	%ME
NEG	Amikacina	1	20	5
	Amoxicillina/ac. clavulanico	1	17	5,882353
	Piperacillina/tazobactam	2	20	10
NEG Totale	Major Error totale Gram-negativi	4	281	1,423488
POS	Gentamicina	1	12	8,333333
	Tetraciclina	2	10	20
POS Totale	Major Error totale Gram-positivi	3	142	2,112676

<b>Tabella 15: Very Major Error Vitek2® Gram-negativi e Gram-positivi</b>				
Gram	Molecola	VME	Totale	%VME
NEG	Amikacina	1	20	5
	Ceftazidime	1	20	5
	Colistina	2	19	10,52631579
	Gentamicina	1	19	5,263157895
	Tobramicina	1	19	5,263157895
NEG Totale	Very Major Error totale Gram-negativi	6	281	2,135231317
POS	Gentamicina	2	12	16,66666667
	Levofloxacina	1	13	7,692307692
	Linezolid	1	13	7,692307692
	Trimetoprim/sulfametoxazolo	2	10	20
POS Totale	Very Major Error totale Gram-positivi	6	142	4,225352113

<b>Tabella 16: Essential Agreement Vitek2® Gram-positivi</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%EA
Ampicillina		3	3	100
Cefotaxime		1	1	100
Ceftarolina		3	3	100
Ciprofloxacina		3	3	100
Clindamicina	1	8	9	88,88888889
Daptomicina	1	10	11	90,90909091
Eritromicina		10	10	100



Gentamicina	4	5	9	55,55555556
Imipenem		2	2	100
Levofloxacin	1	12	13	92,30769231
Linezolid	1	12	13	92,30769231
Oxacillina		9	9	100
Penicillina	1	3	4	75
Teicoplanina		6	6	100
Tetraciclina		10	10	100
Tigeciclina		12	12	100
Trimetoprim/sulfametoxazolo	2	8	10	80
Vancomicina		13	13	100
Totale Vitek Gram-positivi	11	130	141	92,19858156

A questo livello la concordanza tra i metodi rimane buona nonostante entrambi, per la categoria dei Gram-positivi, diano risultati meno soddisfacenti seppur accettabili secondo ISO, rispetto ai Gram-negativi. Fa eccezione la percentuale di VME (tabella 15) rilevata nel confronto del metodo di riferimento con Vitek-2® che risulta superiore al limite. Si rende necessario puntualizzare che il numero di microrganismi Gram-positivi in studio è ridotto.

Per entrambi i metodi sono riportati CA (tabella 17 e tabella 21) ed EA (tabella 20 e tabella 24) anche per le singole molecole antibiotiche e sono evidenziate in verde le percentuali di concordanza maggiori o uguali al 90%, ma avendo testato meno di 30 ceppi per categoria nessuno di questi dati è statisticamente significativo secondo ISO se analizzato singolarmente.

Andando ad analizzare i risultati ottenuti per le singole molecole antibiotiche senza suddivisione in base alla tintorialità batterica, si può rilevare come per il confronto con il metodo in microdiluzione siano state prese in considerazione 40 molecole, mentre per il confronto con Vitek-2® il numero di molecole si riduca a 28, a causa delle differenze di impostazione dei pannelli.

Considerando tutti gli isolati, alcune molecole sono state valutate per un numero di ceppi superiore a 30; le concordanze riscontrate per queste molecole risultano quindi significative e sono riportate in verde.

Scendendo nel dettaglio del confronto con il metodo in microdiluizione da pellet si può notare come per 5 molecole su 40 il CA non rispetti i canoni ISO (tabella 17); tali molecole sono:

- Amoxicillina/ac. clavulanico (CA 9.5%)
- Oxacillina (CA 88.9%)
- Penicillina (CA 85.7%)
- Pristinamicina (CA 88.9%)
- Tobramicina (CA 87.1%)

Va sottolineato come nella maggior parte di questi casi il numero di test effettuati per molecola sia inferiore a 20, ad eccezione del caso della tobramicina, in cui la concordanza non è accettabile poiché in 4 casi su 31 è stata fornita un'interpretazione discordante rispetto al metodo di riferimento; questo ha comportato contestualmente la rilevazione di un ME del 3.2% (tabella 18) ed un VME del 9.7% (tabella 19) per la molecola.

<b>Tabella 17: Categorical Agreement pellet batterico per molecola</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
Amikacina	1	30	31	96,77419355
Amoxicillina/ac. clavulanico	2	17	19	89,47368421
Ampicillina	1	23	24	95,83333333
Azitromicina		9	9	100
Aztreonam		22	22	100
Cefepime		22	22	100
Cefotaxime		21	21	100
Ceftarolina		3	3	100
Ceftazidime/avibactam		20	20	100
Ceftazidime	1	19	20	95
Ceftolozane/tazobactam		19	19	100

Cefuroxime		20	20	100
Ciprofloxacina	1	33	34	97,05882353
Clindamicina		9	9	100
Colistina	1	20	21	95,23809524
Daptomicina		9	9	100
Eravaciclina		6	6	100
Eritromicina		9	9	100
Ertapenem		21	21	100
Fosfomicina	1	21	22	95,45454545
Gentamicina		33	33	100
Imipenem		17	17	100
Levofloxacina	1	33	34	97,05882353
Linezolid		12	12	100
Meropenem/vaborbactam		13	13	100
Meropenem		22	22	100
Minociclina		8	8	100
Moxifloxacina		9	9	100
Ofloxacina		9	9	100
Oxacillina	1	8	9	88,88888889
Penicillina	1	6	7	85,71428571
Piperacillina/tazobactam	1	21	22	95,45454545
Pristinamicina	1	8	9	88,88888889
Quinopristina/dalfopristina		12	12	100
Teicoplanina		6	6	100
Tetraciclina		9	9	100
Tigeciclina		25	25	100
Tobramicina	4	27	31	87,09677419
Trimetoprim/sulfametoxazolo	1	29	30	96,66666667
Vancomicina		12	12	100

**Tabella 18: Major Error pellet batterico per molecola**

Molecola	ME	Totale complessivo	%ME
Amikacina	1	31	3,225806452
Amoxicillina/ac. clavulanico	1	19	5,263157895
Tobramicina	1	31	3,225806452

<b>Tabella 19: Very Major Error pellet batterico per molecola</b>			
Molecola	VME	Totale complessivo	% VME
Amoxicillina/ac. clavulanico	1	19	5,263157895
Ampicillina	1	24	4,166666667
Ciprofloxacina	1	34	2,941176471
Colistina	1	21	4,761904762
Fosfomicina	1	22	4,545454545
Levofloxacina	1	34	2,941176471
Penicillina	1	7	14,28571429
Piperacillina/tazobactam	1	22	4,545454545
Tobramicina	3	31	9,677419355
Trimetoprim/sulfametoxazolo	1	30	3,333333333

Migliori sono i dati di EA (tabella 20) per singola molecola dove sono state rilevate solo 4 molecole al di sotto dei valori di concordanza accettabili:

- Amoxicillina/ac. clavulanico (EA 89.5%)
- Oxacillina (EA 88.9%)
- Pristinamicina (EA 88.9%)
- Vancomicina (EA 83.3%)

Anche in questo caso il numero di ceppi valutati per ognuna di queste molecole è sempre inferiore a 20 e quindi non statisticamente significativo.

<b>Tabella 20: Essential Agreement pellet batterico per molecola</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%EA
Amikacina	1	30	31	96,77419355
Amoxicillina/ac. clavulanico	2	17	19	89,47368421
Ampicillina	1	24	25	96
Azitromicina		9	9	100
Aztreonam		22	22	100
Cefepime		22	22	100
Cefotaxime		22	22	100
Ceftarolina		3	3	100
Ceftazidime/avibactam		20	20	100
Ceftazidime	1	20	21	95,23809524

Ceftolozane/tazobactam		19	19	100
Cefuroxime		21	21	100
Ciprofloxacina	1	33	34	97,05882353
Clindamicina		9	9	100
Colistina		21	21	100
Daptomicina	1	11	12	91,66666667
Eravaciclina		7	7	100
Eritromicina	1	11	12	91,66666667
Ertapenem	1	21	22	95,45454545
Fosfomicina	1	22	23	95,65217391
Gentamicina		34	34	100
Imipenem		17	17	100
Levofloxacina	1	33	34	97,05882353
Linezolid		12	12	100
Meropenem/vaborbactam		13	13	100
Meropenem	1	21	22	95,45454545
Minociclina	1	10	11	90,90909091
Moxifloxacina		9	9	100
Ofloxacina		9	9	100
Oxacillina	1	8	9	88,88888889
Penicillina		7	7	100
Piperacillina/tazobactam	1	21	22	95,45454545
Pristinamicina	2	10	12	83,33333333
Quinopristina/dalfopristina	1	11	12	91,66666667
Teicoplanina		6	6	100
Tetraciclina	1	12	13	92,30769231
Tigeciclina		33	33	100
Tobramicina		31	31	100
Trimetoprim/sulfametoxazolo	1	30	31	96,77419355
Vancomicina	2	10	12	83,33333333

Appare evidente come vi sia una differenza tra le molecole elencate precedentemente, non tutte le discordanze evidenziate a livello categorico si ritrovano infatti anche a livello di MIC, in quanto il dato rilevato può trovarsi a cavallo di un breakpoint interpretativo ma comunque all'interno dell'intervallo di  $\pm 1$  diluizione accettabile e quindi essere concorde al metodo di riferimento.

Proseguendo a questo livello ma mettendo a confronto con il metodo di riferimento il sistema Vitek-2®, per le 28 molecole comuni ad entrambi i metodi si rilevano un CA < 90% in 6 casi (tabella 21) ed un EA < 90% in 3 casi (tabella24) così divisi:

- Amoxicillina/Ac. Clavulanico (CA 88.2% - EA 100%)
- Clindamicina (CA 88.9% - EA 88.9%)
- Colistina (CA 89.5-5 – EA 94.7%)
- Gentamicina (CA 87.1% - EA 79.3%)
- Piperacillina/Tazobactam (CA 85% - EA 90%)
- Tetraciclina (CA 80% - EA 100%)
- Penicillina (CA 100% - EA 75%)

<b>Tabella 21: Categorical Agreement Vitek2® per molecola</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
Amikacina	2	18	20	90
Amoxicillina/ac. clavulanico	2	15	17	88,23529412
Ampicillina		3	3	100
Cefepime		20	20	100
Cefotaxime		20	20	100
Ceftarolina		3	3	100
Ceftazidime/avibactam		17	17	100
Ceftazidime	1	19	20	95
Ceftolozane/tazobactam		17	17	100
Ciprofloxacina		23	23	100
Clindamicina	1	8	9	88,88888889
Colistina	2	17	19	89,47368421
Daptomicina		9	9	100
Eritromicina		10	10	100
Gentamicina	4	27	31	87,09677419
Imipenem		17	17	100
Levofloxacina	1	12	13	92,30769231
Linezolid	1	12	13	92,30769231
Meropenem		20	20	100
Oxacillina		9	9	100
Penicillina		4	4	100
Piperacillina/tazobactam	3	17	20	85
Teicoplanina		6	6	100
Tetraciclina	2	8	10	80

Tigeciclina		12	12	100
Tobramicina	1	18	19	94,73684211
Trimetoprim/sulfametoxazolo	2	27	29	93,10344828
Vancomicina		13	13	100

<b>Tabella 22: Major Error Vitek2® per molecola</b>			
Molecola	ME	Totale complessivo	%ME
Amikacina	1	20	5
Amoxicillina/ac. clavulanico	1	17	5,882352941
Gentamicina	1	31	3,225806452
Piperacillina/tazobactam	2	20	10
Tetraciclina	2	10	20

<b>Tabella23: Very Major Error Vitek2® per molecola</b>			
Molecola	VME	Totale complessivo	%VME
Amikacina	1	20	5
Ceftazidime	1	20	5
Colistina	2	19	10,52631579
Gentamicina	3	31	9,677419355
Levofloxacina	1	13	7,692307692
Linezolid	1	13	7,692307692
Tobramicina	1	19	5,263157895
Trimetoprim/sulfametoxazolo	2	29	6,896551724

<b>Tabella 24: Essential Agreement Vitek2® per molecola</b>				
Molecola	Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%EA
Amikacina	2	18	20	90
Amoxicillina/ac. clavulanico		17	17	100
Ampicillina		3	3	100
Cefepime		20	20	100
Cefotaxime		20	20	100
Ceftarolina		3	3	100
Ceftazidime/avibactam		17	17	100
Ceftazidime		20	20	100
Ceftolozane/tazobactam		17	17	100
Ciprofloxacina		23	23	100
Clindamicina	1	8	9	88,88888889
Colistina	1	18	19	94,73684211
Daptomicina	1	10	11	90,90909091

Eritromicina		10	10	100
Gentamicina	6	23	29	79,31034483
Imipenem		17	17	100
Levofloxacina	1	12	13	92,30769231
Linezolid	1	12	13	92,30769231
Meropenem	1	17	18	94,44444444
Oxacillina		9	9	100
Penicillina	1	3	4	75
Piperacillina/tazobactam	2	18	20	90
Teicoplanina		6	6	100
Tetraciclina		10	10	100
Tigeciclina		12	12	100
Tobramicina	1	18	19	94,73684211
Trimetoprim/sulfametoxazolo	2	27	29	93,10344828
Vancomicina		13	13	100

Date le differenze tra pannelli, l'unica molecola valutata in oltre 30 isolati è risultata la gentamicina, che risulta non soddisfacente né i criteri di Categorical Agreement (87%) (tabella 21) né di ME e VME (rispettivamente 3,22% e 9,67%) (tabella 22 e tabella 23).

In questo caso le differenze tra CA ed EA per le varie molecole risultano ancor più accentuate. Tra i metodi sussiste una differenza nella modalità di lettura delle MIC ed una differenza, come si può verificare dagli allegati 2 e 3, nei range di MIC disponibili nei vari pannelli; ciò ha reso necessaria l'adozione dell'Essential Agreement esteso poiché si era in presenza di risultati inferiori o superiori alla soglia di rilevazione del pannello, allargando quindi l'analisi della concordanza anche ai valori limite di MIC, sempre in un intervallo di  $\pm 1$  diluizione fra i due pannelli.



### 4.3 Risultati QuickMIC®

Considerando la necessità dei laboratori di microbiologia di dotarsi di tecnologie innovative per l'esecuzione rapida, non solo dell'identificazione di microrganismi responsabili di eventi settici, ma anche di saggi di suscettibilità antimicrobica, presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale di Vercelli è stata condotta una valutazione in prova con QuickMIC® di Gradientech. Si tratta di una strumentazione in grado di completare un AST in un tempo di 2-4 ore, il suo principio di funzionamento è stato descritto al paragrafo 3.6.

Poiché è un metodo che può essere utilizzato in caso di emocolture positive solo per microrganismi Gram-negativi e poiché il tempo a disposizione per la valutazione in prova è stato di un mese (aprile 2024), i dati raccolti sono esigui; è comunque interessante poter confrontare i risultati ottenuti con questa tecnologia con un metodo IVD per antibiogramma definitivo. Come metodo di riferimento, in questo caso, è stato preso l'AST fenotipico standard eseguito con Vitek-2®.

I dati sono stati ottenuti dall'analisi di 9 campioni di emocoltura positivi per microrganismi Gram-negativi così suddivisi:

- *Escherichia coli* (6)
- *Klebsiella pneumoniae* (1)
- *Pseudomonas aeruginosa* (1)
- *Serratia marcescens* (1)

Per i due metodi è stata rilevata una concordanza categorica, CA del 97.8% (tabella 25) con un EA complessivo del 91.5% (tabella 28), ME e VME risultano essere dell'1.08% (tabella 26 e tabella 27); differenze nella valutazione dei totali complessivi sono dovute a problematiche incontrate durante l'analisi per alcune molecole.

Tabella 25: Categorical Agreement QuickMIC			
Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%CA
2	91	93	97,8494623

Tabella 26: Major Error QuickMIC		
n° ME	Totale complessivo	%ME
1	93	1,075269

Tabella 27: Very Major Error QuickMIC		
n° VME	Totale complessivo	%VME
1	93	1,075269

Tabella 28: Essential Agreement QuickMIC			
Discordanti	Concordanti	Totale complessivo	%EA
8	87	95	91,5789473

#### 4.4. Valutazione tecnica

All'interno della valutazione dell'applicabilità di un metodo, oltre alla qualità dei dati ottenuti, si possono considerare anche gli aspetti tecnici, pratici, di complessità o facilità di allestimento e le tempistiche di processazione da parte del personale di laboratorio (*hands-on time*) e complessive (*time-to-result*).

I quattro metodi utilizzati presentano differenze e analogie, ma dal punto di vista del *time-to-result* vanno distinte l'identificazione e l'antibiogramma:

- L'identificazione può avvenire in tempi di circa un'ora solo con metodiche molecolari rapide (FilmArray™) o utilizzando il kit MBT Sepsityper® e l'identificazione tramite MALDI-ToF.
- L'identificazione tramite MALDI-ToF da colonia giovane consente comunque un anticipo dei tempi rispetto alle metodiche tradizionali di circa 24h permettendo la refertazione in giornata.

Dal punto di vista dell'antibiogramma, l'unico metodo tra quelli valutati che consente di ottenere un risultato in giornata, sebbene al momento rimanga un dato preliminare da confermare con un metodo di antibiogramma definitivo, è rappresentato da QuickMIC® di Gradientech.

I metodi da pellet batterico o da colonia giovane, indipendentemente dalla strumentazione utilizzata per eseguire l'AST, risentono invece delle tempistiche più lunghe di incubazione del pannello di sensibilità antibiotica (18-20h), pertanto, in una realtà come quella dell'ASL Vercelli che non prevede un servizio di Microbiologia h 24, non si riscontrano differenze in termini di riduzione delle tempistiche.

Riguardo le caratteristiche e le tempistiche dell'allestimento, invece, le preparazioni da colonia giovane sono complessivamente più semplici e rapide non richiedendo passaggi intermedi come centrifugazione, aggiunta di reattivi specifici, rimozione del surnatante, ecc. La maggiore semplicità riduce anche il rischio di errore durante la manipolazione del campione rendendo la procedura meno dipendente dall'esperienza dell'operatore.

La preparazione dell'identificazione MALDI-ToF a partire da colonia giovane è identica alla procedura da colonia isolata e non presenta particolari criticità.

Tra i due metodi di AST da colonia giovane considerati, Vitek2® risulta più rapido nell'allestimento rispetto ai pannelli MicroScan poiché i passaggi previsti sono inferiori per numero e per complessità (vedi paragrafi 3.5.1 e 3.5.2).

L'unico punto critico presente nell'allestimento dei pannelli Vitek2® è rappresentato dalla necessità di riprodurre una sospensione 0.5 McFarland, passaggio assente nella metodica MicroScan.

Nell'allestimento di MicroScan l'aspetto più critico invece è rappresentato dal pannello in micropiastra che, per le caratteristiche della procedura, viene esposto al rischio di contaminazione per il tempo che intercorre tra l'apertura del pannello e la dispensazione del brodo Mueller Hinton.

La preparazione del pellet batterico descritta al paragrafo 3.3.2, benché preveda un numero maggiore di passaggi richiede un tempo di manipolazione di poco superiore rispetto alla subcultura in agar. La criticità nell'allestimento è rappresentata principalmente dalla viscosità del pellet nel passaggio di rimozione del surnatante. Solo l'esperienza dell'operatore permette di minimizzare il rischio di perdita di materiale

procedendo a rimuovere meno surnatante dopo il primo passaggio di centrifugazione, per rimuoverlo completamente solo dopo il secondo. Superata questa difficoltà tecnica l'*hands-on time* nell'allestimento dell'identificazione e dell'AST è sovrapponibile al metodo da colonia giovane.

Nonostante sia la metodica migliore come *time-to-result*, QuickMIC® risulta essere la l'opzione tecnicamente più indaginosa e con tempistiche di allestimento più lunghe. Infatti i passaggi preparatori, descritti al paragrafo 3.6, prevedono tempi per l'incubazione e per la refrigerazione dell'agar più lunghi rispetto alle centrifugazioni di MBT Sepsityper® che risultano difficilmente utilizzabili dall'operatore per svolgere altre mansioni. Inoltre la tecnologia in microfluidica del kit richiede particolare attenzione nella fase di riempimento e altrettanta attenzione va posta durante la fase di solidificazione dell'agar che deve avvenire su una superficie perfettamente piana.

Non particolarmente impegnativo risulta l'allestimento invece dei pannelli di biologia molecolare rapida FilmArray™, che sono intuitivi e richiedono *hands-on time* e manualità minimi rendendo la metodica accessibile a qualunque livello di esperienza dell'operatore.

## 5. Discussione

L'aggiornamento tecnologico in microbiologia ha rivoluzionato le tempistiche tradizionalmente lunghe di questa diagnostica a favore di un approccio *fast-track*. In quest'ambito trova particolare campo di applicazione l'identificazione degli agenti causali di sepsi in modo da stabilire nel minor tempo possibile la terapia antimicrobica corretta così da non solo migliorare le condizioni dei pazienti, ma anche ridurre il consumo di antibiotici ad ampio spettro.

Le caratteristiche da ricercare nelle tecnologie da introdurre nei laboratori di microbiologia dovrebbero essere la coerenza con i risultati ottenuti con i tradizionali metodi colturali, la produzione di un referto in tempi rapidi, ma anche l'ottimizzazione delle risorse sia in termini di personale coinvolto che in termini di costi per il laboratorio. Ne è un esempio la diffusione dei servizi di microbiologia aperti h 24, che è al momento limitata ai soli centri più grandi, in quanto i costi di gestione e le risorse di personale non sono applicabili a tutte le realtà ospedaliere. Risulta invece di maggiore accessibilità l'implementazione di metodi di antibiogramma diretto paralleli o alternativi alla microbiologia tradizionale che permettano di ottenere l'antibiogramma con almeno 24 ore di anticipo e la diffusione di metodi molecolari o spettrometrici che consentano l'identificazione del microrganismo causa di sepsi nella stessa giornata in cui si rileva la positività dell'emocoltura.

Propedeutica al presente studio, è stata una precedente validazione di metodo che ha permesso di stabilire la sovrapposibilità tra l'AST da colonia giovane e quella da colture overnight. In questo studio ci si è focalizzati sull'identificazione di un protocollo da seguire per le emocolture positive che combini identificazione rapida e antibiogramma diretto. Sono stati pertanto valutati microrganismi identificati tramite il kit MBT Sepsityper® che consente l'utilizzo della spettrometria di massa MALDI-ToF come metodo di identificazione anche da pellet batterico senza necessità di crescita su terreno agarizzato. È stato quindi eseguito l'antibiogramma diretto sfruttando il medesimo pellet e sulla base dei risultati disponibili è possibile affermare che vi è un'ottima concordanza

con il metodo in brodo-microdiluzione a partire da colonia giovane. Questo rende i metodi applicabili all'interno della routine di laboratorio per quanto riguarda le performance.

Per completezza, avendo a disposizione un secondo metodo per testare la sensibilità antimicrobica, è stato eseguito un confronto tra la colonia giovane in brodo-microdiluzione e la colonia giovane in Vitek2®, metodo che prevede la deduzione delle MIC a partire da diluizioni prestabilite.

Il numero di campioni valutato è statisticamente significativo per un confronto complessivo, mentre per ottenere una statistica maggiormente accurata è necessario proseguire lo studio in modo da raccogliere un numero maggiore di dati per singola molecola infatti avendo valutato 22 isolati di batteri Gram-negativi, e solo 13 Gram-positivi, appare evidente come il numero di saggi per le molecole destinate alla terapia mirata dei Gram-positivi si riveli esiguo e anche il totale dei Gram-negativi sia insufficiente per avere una rilevanza statistica secondo norma ISO 20776-2.

Complessivamente sia il metodo da pellet batterico che il metodo Vitek2® da colonia giovane hanno mostrato concordanza categorica e di MIC ottimali e il metodo da pellet è risultato anche leggermente migliore rispetto a Vitek2®, pertanto sarebbe plausibile l'adozione di questi metodi nella routine diagnostica.

Come si può verificare con gli allegati 3 e 4, nei differenti pannelli sono presenti molecole comuni, che sono quindi state analizzate per la totalità dei campioni e molecole che per loro caratteristiche di azione antimicrobica sono destinate soltanto ad una categoria di microrganismi.

Dato il numero ridotto di isolati raccolti al momento della chiusura della stesura dell'elaborato, la significatività statistica per singola molecola è limitata ad alcuni fluorochinoloni, aminoglicosidi e al trimetoprim/sulfametoxazolo per quanto riguarda il metodo Beckman Coulter e alla sola gentamicina in bioMérieux Vitek2®. Sarebbe quindi fondamentale l'ampiamiento della casistica per raggiungere la significatività anche per i

$\beta$ -lattamici. Dal confronto delle singole molecole inoltre la tobramicina in MicroScan e la gentamicina in Vitek2® non hanno mostrato sufficiente concordanza.

Spostando il focus verso l'aspetto pratico, va segnalato come il metodo di riferimento rappresenti l'opzione più agevole, in quanto l'allestimento del materiale di partenza per l'AST avviene contestualmente all'allestimento dei terreni per incubazione overnight, dai quali non è possibile prescindere.

Il limite di questo percorso è rappresentato dal tempo di incubazione necessario per la crescita della colonia giovane: sebbene le ore destinate alla crescita non influiscano sui tempi di refertazione dell'antibiogramma, poiché l'analisi impiega 18 ore per raggiungere il completamento, sussiste un peso sulle tempistiche di identificazione, che genera invece un ritardo, pari al tempo di crescita della colonia, nella comunicazione al clinico del microrganismo responsabile della positività del flacone.

L'utilizzo estensivo di questo metodo non presenterebbe quindi particolare carico per il personale, ma richiederebbe una doppia comunicazione, prima del risultato dell'esame microscopico con colorazione di Gram e, a distanza di alcune ore, dell'identificazione del microrganismo.

La preparazione del pellet batterico può ridurre il tempo dell'identificazione e di conseguenza di comunicazione al reparto: l'allestimento risulta essere rapido, sebbene sia composto di più passaggi rispetto alla colonia giovane, e consente di avere informazioni sul microrganismo a circa un'ora dalla rilevazione della positività del flacone a parità dei ben più costosi metodi molecolari rapidi e senza le limitazioni di un pannello predefinito di microrganismi identificabili. Questa tempistica, se l'utilizzo di MBT Sepsityper® fosse applicato a tutti i pazienti, sarebbe pressoché sovrapponibile al tempo richiesto per l'allestimento e l'osservazione del batterioscopico, permettendo quindi la comunicazione immediata del microrganismo identificato.

Inoltre, la possibilità di sfruttare la preparazione del pellet batterico con MBT Sepsityper® per l'esecuzione dell'AST si connota come soluzione efficace da intraprendere, alla luce dei risultati di concordanza ottenuti da questo studio.

Infatti, la rapidità e facilità di allestimento sia dell'identificazione che dell'AST dal medesimo pellet ridurrebbero il tempo di gestione del campione evitando di dover, a distanza di alcune ore, eseguire l'AST dalla colonia giovane. Questi aspetti positivi vanno a giustificare il costo della metodica MBT Sepsityper® per il laboratorio. Si tratta di un costo superiore a quello di una subcoltura in agar, ma che non va ad influire in modo consistente sull'economia del laboratorio a differenza dei metodi molecolari rapidi.

Nella realtà del Laboratorio di Microbiologia di Vercelli una metodica rapida per l'esecuzione di AST, come QuickMIC® di Gradientech, apporterebbe un miglioramento circoscritto nella diagnostica, in quanto al momento il metodo è disponibile solo per i Gram-negativi. Inoltre inserire l'allestimento di metodiche di questo tipo nella routine risulterebbe complicato, in quanto si tratta di una manipolazione che richiede l'impegno di un operatore per un tempo maggiore rispetto alle altre alternative. In aggiunta non va dimenticato come, in generale, questo genere di tecnologie rappresenti un costo significativo per il laboratorio, che andrebbe giustificato con una corrispondente reale riduzione non solo del *time-to-result*, ma anche dei tempi in cui viene effettivamente modificata la terapia antibiotica.

Vanno menzionati anche i casi in cui la positività di un'emocoltura è dovuta alla presenza di più microrganismi, questo ha reso il campione non idoneo all'inserimento nello studio. Di fronte a casistiche di questo tipo l'unico percorso diagnostico attuabile è quello che vede come punto di partenza l'identificazione eseguita con metodiche di biologia molecolare. Disporre di tecnologie di questo tipo è ormai normalità all'interno dei laboratori di microbiologia, in quanto rappresentano l'unica possibilità di ottenere informazioni attendibili e rapidamente comunicabili (1 ora circa dalla positivizzazione). Non è possibile in questi casi allestire AST rapidi ed è necessario attendere la crescita su terreni selettivi. I report di biologia molecolare sopperiscono alla mancanza di



informazioni sulla sensibilità agli antibiotici fornendo informazioni sulla presenza di geni di resistenza nei microrganismi rilevati, questo dato è utile per il clinico nel passaggio ad una terapia mirata nell'attesa del referto definitivo, che in questi casi segue i tempi della diagnostica tradizionale.

In conclusione, è fondamentale che il laboratorio di microbiologia sia pronto ad allinearsi alle nuove disponibilità tecnologiche ambendo al miglioramento dei tempi e dei risultati della diagnostica e al contempo ottimizzando le risorse. Tuttavia, allo sforzo da parte dei laboratori deve corrispondere una parimenti tempestiva reazione da parte dei clinici che rende queste innovazioni utili per la gestione dei pazienti settici, ma anche la riduzione del consumo di antibiotici e il contenimento dell'antibiotico-resistenza.

## Allegati

Allegato 1: microrganismi e geni di resistenza identificabili con il pannello BCID2 FilmArray™ di BioFire Diagnostics

BATTERI GRAM-NEGATIVI	BATTERI GRAM-POSITIVI	LIEVITI	GENI DI RESISTENZA
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>	Carbapenemases
<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Candida auris</i>	IMP
<b>Enterobacterales</b>		<i>Candida glabrata</i>	KPC
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<b>Staphylococcus spp.</b>	<i>Candida krusei</i>	OXA-48-like
<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	NDM
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	VIM
<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> group		<i>Cryptococcus (C. neoformans/C. gattii)</i>	Colistin Resistance
<i>Proteus</i> spp.	<b>Streptococcus spp.</b>		
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Streptococcus agalactiae</i>		<i>mcr-1</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		ESBL
<i>Haemophilus influenzae</i>			CTX-M
<i>Neisseria meningitidis</i>	<b>Streptococcus pyogenes</b>		<b>Methicillin Resistance</b>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>mec A/C</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>mec A/C</i> and MREJ (MRSA)
			<b>Vancomycin Resistance</b>
			<i>van A/B</i>

Allegato 2: pannelli AST Vitek-2® di bioMérieux

AST-N379	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amikacin	2, 4, 16, 48
Amoxicillin/K Clavulanate	4/2, 8/2, 32/2
Cefepime	0.25, 1, 4, 16, 32
Cefotaxime	0.5, 2, 4, 8, 32
Ceftazidime	0.25, 1, 2, 8, 32
Ciprofloxacin	0.06, 0.12, 0.5, 1
Ertapenem	0.03, 0.12, 0.5, 2
ESBL	FEP 1, CTX 0.5, CAZ 0.5, FEP/CA 1/10, CTX/CA 0.5/4, CAZ/CA 0.5/4
Fosfomicin	8, 16, 32
Gentamicin	4, 8, 32
Imipenem	1, 2, 6, 12
Meropenem	0.5, 2, 6, 12

Nitrofurantoin	16, 32, 64
Piperacillin/Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1/19, 4/76, 16/304

<b>AST-N397</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amikacin	2, 4, 16, 48
Amoxicillin/K Clavulanate	4/2, 8/2, 32/2
Cefepime	0.25, 1, 4, 16, 32
Cefotaxime	0.5, 2, 4, 8, 32
Ceftazidime	0.25, 1, 2, 8, 32
Ceftazidime/Avibactam	0.06/4, 0.25/4, 1/4, 4/4, 8/4
Ceftolozane/Tazobactam	0.5/4, 1/4, 4/4, 8/4, 32/4
Ciprofloxacin	0.06, 0.12, 0.5, 1
Colistin	4, 16, 32
Gentamicin	4, 8, 32
Imipenem	1, 2, 6, 12
Meropenem	0.5, 2, 6, 12
Piperacillin/Tazobactam	2/4, 8/4, 24/4, 32/4, 32/8, 48/8
Tobramycin	8, 16, 64
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1/19, 4/76, 16/304

<b>AST-P658</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amoxicillin/K Clavulanate	2/2, 4/2, 16/2
Ampicillin	0.5, 4, 8, 32
Ampicillin/Sulbactam	4/2, 8/4, 16/8, 64/32
Ciprofloxacin	1, 2, 4
Daptomycin	0.5, 1, 2, 4, 16
High Level Gentamicin Resistance	150
Imipenem	2, 4, 8
High Level Kanamycin (synergy)	200
Levofloxacin	0.25, 2, 8
Linezolid	0.5, 1, 2
Nitrofurantoin	16, 32, 64
Chinupristin/Dalfopristin	0.25, 0.5, 2

High Level Streptomycin (synergy)	1.000
Teicoplanin	0.5, 2, 8, 32
Tigecycline	0.25, 0.5, 1
Trimetoprim	1, 2, 8, 32
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	8/152, 16/304, 32/608
Vancomycin	1, 2, 4, 8, 16

<b>AST-P659</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Benzylopicillin	0.125, 0.25, 1
Cefoxitin screen	6
Ceftaroline	0.25, 0.5, 1, 2
Clindamycin	0.06, 0.25, 1
Daptomycin	0.5, 1, 2, 4, 16
Erythromycin	1, 2, 4, 8
Fusidic acid	0.5, 1, 4
Gentamicin	8, 16, 64
Inducible Clindamycin Test	CM 0.5, CM/E 0.25/0.5
Levofloxacin	0.25, 2, 8
Linezolid	0.5, 1, 2
Mupirocin	1, 4
Oxacillin	0.5, 1, 2
Rifampin	0.015, 0.03, 0.125, 0.5
Teicoplanin	0.5, 2, 8, 32
Tetracycline	0.5, 1, 2
Tigecycline	0.25, 0.5, 1
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	2/38, 8/152, 16/304
Vancomycin	1, 2, 4, 8, 16

<b>AST-ST03</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Ampicillin	0.5, 1, 4, 8
Benzylopicillin	0.06, 0.12, 0.5, 2
Cefotaxime	0.25, 0.5, 1, 2
Ceftriaxone	0.12, 0.25, 1, 4
Chloramphenicol	1, 4, 8

Clindamycin	CM 0.12, CM 0.25, CM 0.5, CM/E 0.5/0.1
Erythromycin	1, 2, 4, 16
Gentamicin	512, 1024
Inducible Clindamycin Test <i>S. agalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i>	CM 0.5, CM/E 0.25/0.5
Levofloxacin	1, 2, 4, 16
Linezolid	2, 4
Moxifloxacin	0.5, 1, 4, 8
Rifampin	0.015, 0.03, 0.12, 0.5
Teicoplanin	0.5, 1, 4
Tetracycline	0.12, 0.5, 1, 4
Tigecycline	0.12, 0.25, 0.5
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	8/152, 16/304, 64/1216
Vancomycin	0.5, 1, 2, 4

AST-P576	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amoxicillin	0.06, 0.25, 1, 2
Benzylpenicillin	0.03, 0.06, 0.25, 0.5
Cefotaxime	0.06, 0.25, 0.5, 1
Ceftriaxone	0.06, 0.25, 0.5, 1
Chloramphenicol	2, 8, 16
Erythromycin	0.06, 0.125, 0.25
Imipenem	0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1
Levofloxacin	0.5, 1, 2
Linezolid	1
Moxifloxacin	0.25, 1, 2
Ofloxacin	1, 2, 4
Pristinamicina	0.5, 1
Quinopristina/Dalfopristina	0.25, 0.5, 1
Rifampin	0.25, 0.5, 1
Sparfloxacin	0.125, 0.25, 1
Telitromicin	0.06, 0.25, 1, 4
Tetracycline	0.5, 1, 2
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	2/38, 8/152, 16/304, 32/608
Vancomycin	0.5, 1

Allegato 3: pannelli AST MicroScan Beckman Coulter

<b>POS MIC STA 36</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amikacin	4–16
Azithromycin	0.5–2
Cefoxitin screen	4
Ceftaroline	0.12–2
Chloramphenicol	8
Ciprofloxacin	0.25–2
Clindamycin	0.12–0.5
Daptomycin	0.25–1
Erythromycin	0.5–2
Fosfomicin	32
Fusidic acid	2; 16
Gentamicin	1–4
Inducible Clindamycin Test	4/0.5
Kanamycin	8–16
Levofloxacin	0.5–4
Linezolid	2–4
Minocycline	1
Moxifloxacin	0.25–2
Mupirocin	4–8, 256
Nitrofurantoin	32–64
Ofloxacin	0.5–2
Oxacillin	0.25–2
Penicillin	0.03–0.12
Pristinamycin	0.5–2
Rifampin	0.5–2
Synercid	0.5–2
Teicoplanin	1–8
Tetracycline	1–2
Tigecycline	0.25–1
Tobramycin	1–4
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	1/19–4/76
Vancomycin	0.25–16

<b>POS MIC E 37</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amoxicillin/K Clavulanate	2/1–8/4
Ampicillin	1–8
Chloramphenicol	8–16
Ciprofloxacin	0.5–2
Clindamycin	0.25–1
Daptomycin	0.25–4
Erythromycin	0.25–4
Fosfomicin	32–64
Gentamicin Synergy Screen	500
Imipenem	2–8
Levofloxacin	1–4
Lincomycin	1–8
Linezolid	1–4
Minocycline	1–8
Moxifloxacin	0.25–1
Nitrofurantoin	32–64
Penicillin	0.06–8
Pristinamycin	0.5–2
Rifampin	0.5–2
Streptomycin Synergy Screen	1.000
Synercid	1–4
Teicoplanin	1–16
Tetracycline	1–8
Tigecycline	0.25–1
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	0.25/4.75–2/38
Vancomycin	0.25–32

<b>NEG MIC 62</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amikacin	8-16
Ampicillin/Sulbactam	8/4-16/18
Amoxicillin/K Clavulanate – E (EUCAST)	4/2-8/2,32/2
Ampicillin	4-8
Aztreonam	1-16
Cefepime	1 –8

Cefixime	1
Cefotaxime	1-32
Cefoxitin	8
Ceftazidime	0.25/4-4/4
Ceftazidime/Avibactam	2/4–8/4
Ceftolozane/Tazobactam	1/4-4/4
Ceftazidime	1-32
Cefuroxime	8
Cephalexin	16
Chloramphenicol	8
Ciprofloxacin	0.06, 0.25 – 1
Colistin	2–4
ESbL Confirmation – Cefotaxime/K Clavulanate	0.25/4-4/4
Ertapenem	0.12, 0.5–1
Fosfomicin	8,32
Gentamicin	2-8
Imipenem	1–4
Levofloxacin	0.5–1
Mecillinam	8
Meropenem	0.12, 1–8
Nalidixic Acid	16
Nitrofurantoin	64
Norfloxacin	0.5-1
Piperacillin	8-16
Piperacillin/Tazobactam	4/4–16/4
Ticarcillin	8-16
Tigecycline	0.5
Tobramycin	2–4
Trimethoprim	2-4
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	2/38–4/76

<b>NEG MDR MIC 2</b>	
<b>Antimicrobico</b>	<b>Concentrazione µg/mL</b>
Amikacin	8–16
Amoxicillin/K Clavulanate – E (EUCAST)	4/2-8/2,32/2
Ampicillin	4–8



Aztreonam	1–4,16
Cefepime	0.5–8
Cefotaxime	0.5–32
Cefoxitin	8–16
Ceftazidime	0.5–32
Ceftazidime/Avibactam	2/4–8/4
Ceftolozane/Tazobactam	0.5/4–4/4
Cefuroxime	4–8
Ciprofloxacin	0.06,0.25–1
Colistin	2–4
ESβL Confirmation – Cefotaxime/K Clavulanate	0.25/4–4/4
ESβL Confirmation – Ceftazidime/K Clavulanate	0.25/4–4/4
Ertapenem	0.12–1
ERV	0.5
Fosfomicin	8,32–64
Gentamicin	2–4
Imipenem	1–4
Levofloxacin	0.5–1
Meropenem	0.12,1–32
Meropenem/Vaborbactam	4/8–16/8
Piperacillin/Tazobactam	4/4–16/4
Ticarcillin	8–16
Tigecycline	0.5–1
Tobramycin	2–4
Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	2/38–4/76

<b>MICROSTREP PLUS 3</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amoxicillin/K Clavulanate	0.25/0.12–4/2
Ampicillin	0.03–8
Azithromycin	0.25–4
Cefaclor	1–2, 8–16
Cefepime	0.12–2
Cefotaxime	0.03–8
Cefuroxime	0.25–8

Chloramphenicol	1–8
Ciprofloxacin	0.06–2
Clindamycin	0.25–2
Erythromycin	0.25–4
Meropenem	0.06–4
Penicillin	0.03–8
Rifampin	0.5–2
Tetracycline	1–4
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	0.25/4.75–2/38
Vancomycin	0.5–8

<b>MICROSTREP PLUS 6</b>	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amoxicillin/K Clavulanate	1/0.5–4/2
Ampicillin	0.06–4
Azithromycin	0.12–2
Cefepime	0.25–2
Cefotaxime	0.25–2
Ceftriaxone	0.25–2
Cefuroxime	0.25–2
Chloramphenicol	2–8
Clarithromycin	0.12–2
Clindamycin	0.06–0.5
Daptomycin	0.25–2
Erythromycin	0.06–0.5
Levofloxacin	0.5–4
Linezolid	1–4
Meropenem	0.25–2
Minocycline	0.5–2
Moxifloxacin	0.25–2

Allegato 4: molecole testate nel pannello QuickMIC® Gradientech e relativi range di concentrazione

	Amikacin	Cefepime	Ciprofloxacina	Colistin	Cefotaxime	Ceftazidime/ avibactam	Ceftazidime	Gentamicin	Meropenem	Piperacillin/ Tazobactam	Tigecyclina	Tobramycin
<i>E. coli</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
<i>Klebsiella spp.</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●
<i>P. aeruginosa</i>	●	●	●	●		●	●		●	●		●
<i>A. baumannii</i>	●		●	●				●	●			●
<i>E. cloacae</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●
<i>Proteus spp.</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●
<i>Citrobacter spp.</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●
<i>S. marcescens</i>	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●		●

***Klebsiella spp.***  
*K. pneumoniae*  
*K. oxytoca*  
*K. aerogenes*  
*K. variicola*

***Proteus spp.***  
*P. mirabilis*  
*P. vulgaris*

***Citrobacter spp.***  
*C. koseri*  
*C. freundii*

QUICKMIC GN	
Antimicrobico	Concentrazione µg/mL
Amikacin	1.0-20
Cefepime	0.5-10
Cefotaxime	0.25-5
Ceftazidime	0.5-10
Ceftazidime/Avibactam	0.5-10/4-4
Ciprofloxacina	0.13-2.5
Colistin	0.5-5
Gentamicin	0.5-10
Meropenem	0.5-10
Piperacillin/Tazobactam	2.0-40/4-4
Tigecyclina	0.063-1.25
Tobramycin	0.5-10

## **Bibliografia e sitografia**

AMCLI. Infezioni del torrente circolatorio. Proposta di percorso diagnostico presentato durante il XXXVII Congresso Nazionale AMCLI – Stresa, 5-8 ottobre 2008. Revisione: settembre 2014.

AMCLI ETS. Percorso Diagnostico "Infezioni del torrente circolatorio" - Rif. 2023-13, rev. 2023.

Amico-Roxas M, Caputi AP, Del Tacca M. Compendio di farmacologia generale e speciale, 2005.

Bhatti MM, Boonlayangoor S, Beavis KG, Tesic V. Rapid identification of positive blood cultures by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry using prewarmed agar plates. *J Clin Microbiol.* 2014; 52(12).

Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. Carbapenemase-producing organisms: a global scourge, 2017.

Bookstaver PB, Nimmich EB, Smith TJ 3rd, Justo JA, Kohn J, Hammer KL, Troficanto C, Albrecht HA, Al-Hasan MN. Cumulative Effect of an Antimicrobial Stewardship and Rapid Diagnostic Testing Bundle on Early StreamLining of Antimicrobial Therapy in Gram-Negative Bloodstream Infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(9).

Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. Le basi farmacologiche della terapia, il Manuale, 2012.

CDC. Making health care safer: Think sepsi. Timematters. Vital Signs 2016.

CLSI. Principles and procedures for blood cultures; Approved Guideline. CLSI document M47-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Principles and Procedures for Blood Cultures. 2nd ed. CLSI guideline M47 (ISBN 978-1-68440-148-2). Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2022.

De Plato F, Fontana C, Gherardi G, Privitera GP, Puro V, Rigoli R, Viaggi B, Viale P. "Collection, transport and storage procedures for blood culture specimens in adult patients: recommendations from a board of Italian experts." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 57 (2019): 1680 - 1689.

Dien Bard J, McElvania E. Panels and Syndromic Testing in Clinical Microbiology. *Clin Lab Med.* 2020;40(4).

Fang C, Zhou Z, Li J, Chen X, Zhou M. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures in pediatric patients by MALDI-TOF MS: Sepsityper kit versus short-term subculture. *J Microbiol Methods.* 2020 May;172:105894. doi: 10.1016/j.mimet.2020.105894. Epub 2020 Mar 14. PMID: 32184161.

Fitzpatrick F, Tarrant C, Hamilton V, Kiernan FM, Jenkins D, Krockow EM. Sepsis and antimicrobial stewardship: two sides of the same coin. *BMJ Qual Saf.* 2019;28(9).

Froböse NJ, Idelevich EA, Schaumburg F. Short Incubation of Positive Blood Cultures on Solid Media for Species Identification by MALDI-TOF MS: Which Agar Is the Fastest? *Microbiol Spectr.* 2021;9(1).

Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2013;19:501-9.

Grohs P, Mainardi JL, Podglajen I, Xavier Hanras X, Eckert C, Buu-Hoi A, Varon E, Gutmann L. Relevance of Routine Use of the Anaerobic Blood Culture Bottle. *J. Clin Microbiol*, 2007, 45.

Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20(10).

ISO 20776-2:2021 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices against reference broth micro-dilution Published (Edition 2, 2021)

Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:513-20.

Lamy B, Dargere S, Arendrup MC et al. How to optimize the use of blood cultures for the diagnosis of bloodstream infections? A state-of-the art. *Front Microbiol* 2016;7:697.

Lamy B. Blood culture time-to-positivity: making use of the hidden information. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Mar; 25(3).

Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Med*. 2018 Jun; 44(6):925-928. doi: 10.1007/s00134-018-5085-0. Epub 2018 Apr 19. PMID:29675566.

Lin HH, Liu YF, Tien N, Ho CM, Hsu LN, Lu JJ. Evaluation of the blood volume effect on the diagnosis of bacteremia in automated blood culture systems. *J Microbiol Immunol Infect*. 2013;46(1).

Madigan MT, Mrtinko JM, Parker J. Diagnostica batteriologica e antibiotico sensibilità. Casa editrice Ambrosiana 2007.

Mandell, Douglas, and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases di Bennett - Dolin - Blaser 2019

Markwart R, Saito H, Harder T, Tomczyk S, Cassini A, Fleischmann-Struzek C, Reichert F, Eckmanns T, Allegranzi B. Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. Intensive Care Med. 2020; 46(8).

Mendonça J, Guedes C, Silva C, Sá S, Oliveira M, Accioly G, Baylina P, Barata P, Pereira C, fernandes R. New CTX-M group conferring  $\beta$ -Lactam resistance: a compendium of phylogenetic insights from biochemical, molecular and structural biology, 2022.

Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, Gonzalez MD, Jerris RC, Kehl SC, Patel R, Pritt BS, Richter SS, Robinson-Dunn B, Schwartzman JD, Snyder JW, Telford S 3rd, Theel ES, Thomson RB Jr, Weinstein MP, Yao JD. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018;67(6).

NHS. Taking blood cultures. A summary of best practice.

Polidori P, et al. Antimicrobial Stewardship in medicina: impatto/implementazione della figura del farmacista di dipartimento e /o di reparto nelle aziende sanitarie del SSN. Edizioni Il Campano, 2017.

Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, et al. Surviving Sepsis Campaign: International

Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 2017;43(3):304–377.

Sarti M, Farina C, Luzzaro F, Sambri V, Cellini A, Cosentino M, Mauri C, Nozzi D, Pedna MF, Pifferi L, Clerici P. Position paper AMCLI sulla possibilità di identificazione diretta dei microrganismi da emocoltura positiva con il dispositivo Vitek<sup>®</sup> MS 2014.

Schlapbach LJ, Kissoon N, Alhawsawi A, Aljuaid MH, Daniels R, Gorordo-Delsol LA, Machado F, Malik I, Nsutebu EF, Finfer S, Reinhart K. World Sepsis Day: a global agenda to target a leading cause of morbidity and mortality. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2020; 319(3).

Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315: 801-10.

Stogios PJ, Savchenko A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance, 2020.

Suarez De La Rica A, Gilsanz F, Maseda E. Epidemiologic trends of sepsis in western countries. *Ann Transl Med* 2016; 4:325.

Suh MJ, Limbach PA. Investigation of methods suitable for the matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of proteins from ribonucleoprotein complexes. *Eur. J. Mass Spectrom* 2004. 10: 89-99.

Thompson RJ, Evans B, Southerland J. Collecting blood for culture. *Generalist Microbiology Tech Sample No. G1.* American Society of Clinical Pathologists, 1991.

Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen V HA, Takebayashi Y, Spencer J.  $\beta$ -Lactamase and  $\beta$ -Lactamase inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol.* 2019 Aug 23; 431 (18): 3472-3500.



Viscoli C. Bloodstream Infections: The peak of the iceberg. *Virulence*. 2016;7(3).

Wallis C, et al. Rapid isolation of bacteria from septicemic patients by use of an antimicrobial agent removal device. *J. Clin. Microbiol.* 1980. 11:462–464.

Willems E, Smismans A, Cartuyvels R, Coppens G, Van Vaerenbergh K, Van den Abeele A-M, et al. The preanalytical optimization of blood cultures: a review and the clinical importance of benchmarking in 5 Belgian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:1–8.

<https://www.bd.com/en-eu/offerings/capabilities/microbiology-solutions/clinical-microbiology/blood-culture>

<https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/clinical-products/biofire-blood-culture-identification-2-panel.html>

<https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/clinical-products/biofire-blood-culture-identification-2-panel.html#tabs-6d83528eca-item-f6702863f3>

<https://www.biomerieux-microbio.com/it/in-che-modo-vitek-2-genera-i-valori-di-mic/>

<https://www.bruker.com/it/products-and-solutions/mass-spectrometry/maldi-tof.html>

<https://www.bruker.com/it/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-ivd-ce/mbt-sepsityper-ivd-kit.html>

<https://www.dopharma.nl/technical-support/diagnostiek-en-autovaccins/maldi-tof-ms/>

[https://www.eucast.org/rapid\\_ast\\_in\\_bloodcultures](https://www.eucast.org/rapid_ast_in_bloodcultures)

<https://gradientech.se/quickmic/specifications/>

[https://www.salute.gov.it/portale/news/p3\\_2\\_1\\_1\\_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie  
&p=dalministero&id=6344](https://www.salute.gov.it/portale/news/p3_2_1_1_1.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=6344)

<https://media.beckmancoulter.com//media/diagnostics/products/microbiology/microscan-systems/dxm-microscanwalkway/docs/dxm-microscan-walkaway-brochure-en.pdf?rev=8a85b9981ff94e778b75698b64831154>

[https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer\\_002519\\_035003\\_RCP.pdf&sys=m0b113#:~:text=Meccanismo%20d'azione%20La%20vancomicina,unit%C3%A0%20precursori%20della%20parete%20cellulare.](https://farmaci.agenziafarmaco.gov.it/aifa/servlet/PdfDownloadServlet?pdfFileName=footer_002519_035003_RCP.pdf&sys=m0b113#:~:text=Meccanismo%20d'azione%20La%20vancomicina,unit%C3%A0%20precursori%20della%20parete%20cellulare.)

[https://www.seremi.it/sites/default/files/2018-2019%20Corso%20FAD%20AMR\\_3\\_%20Antibiogramma.pdf](https://www.seremi.it/sites/default/files/2018-2019%20Corso%20FAD%20AMR_3_%20Antibiogramma.pdf)

## **Ringraziamenti**

Ringrazio il Professor Ranzato per la sua gentilezza e disponibilità, per aver accolto questo progetto ed averne permesso la realizzazione.

Desidero ringraziare la Dottoressa Tavano, per me esempio di passione e dedizione in ambito lavorativo, grazie per avermi accompagnata in questo progetto.

Ringrazio i colleghi del Laboratorio Analisi e Microbiologia dell'Ospedale S. Andrea di Vercelli per avermi supportata durante questi anni di percorso magistrale.

In particolare vorrei ringraziare Alessia per avermi aiutata con entusiasmo durante il periodo del tirocinio senza mai permettere che mi perdessi d'animo.

Ringrazio la mia famiglia, che in questi anni non ha mai smesso di starmi accanto dandomi affetto e comprensione. In particolare ringrazio i miei zii: Lucia, per il suo amore sconfinato e Piero, per avermi accompagnata durante tutte le prove di questi anni, non solo quelle di tipo accademico; il vostro sostegno e la vostra presenza sono da sempre fondamentali per me.

Infine ringrazio Jacopo, per tutti gli incoraggiamenti e per il conforto, per aver alleggerito i momenti difficili con amore e pazienza. Grazie per aver *sempre* creduto in me.