

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA
Corso di laurea in Biologia - Biomedico e Biomolecolare



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

TESI FINALE

CONFRONTO TRA TEST DI SENSIBILITA' IN VITRO:
performance analitiche e rapidità diagnostica

RELATORE: *Prof.ssa* MASINI Maria Angela

CORRELATORE: *Dott.* ROCCHETTI Andrea

CANDIDATA: INCARBONE LEANDRA

MATRICOLA: 20026821

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

INTRODUZIONE	3
1.1 'FAST MICROBIOLOGY'	5
1.2 INFEZIONI DEL FLUSSO SANGUIGNO	6
1.2.1 BATTERIEMIA	7
1.2.2 SEPSI	7
1.3 EPIDEMIOLOGIA	11
1.4 ANALISI SUI COSTI ASSOCIATI ALLA GESTIONE DELLA SEPSI	14
1.5 EZIOLOGIA	16
1.6 FISIOPATOLOGIA	18
1.7 GESTIONE DEL PAZIENTE SETTICO	20
1.8 WORKFLOW DIAGNOSTICI DELLA SEPSI	22
1.9 EMOCOLTURA	23
1.9.1 MODALITA' DI PRELIEVO	25
1.9.2 NUMERO DI SET	26
1.9.3 VOLUME DI SANGUE	26
1.9.4 TIPOLOGIA DI FLACONI	27
1.9.5 TRASPORTO	28
1.9.6 MODALITA' E TEMPI DI INCUBAZIONE	28
1.9.7 PROCESSAZIONE DELLE EMOCOLTURE	30
1.9.8 IDENTIFICAZIONE ISOLATI	33
1.9.9 SAGGI DI SENSIBILITA' (ANTIBIOGRAMMA)	39
1.9.10 COMUNICAZIONE DEI RISULTATI	43
1.9.11 REFERTAZIONE DEI RISULTATI	43
1.9.12 INDICATORI DEL PROCESSO	44
1.10 VITEK® REVEAL™	47
2. SCOPO DELLO STUDIO	50
3. MATERIALI E METODI	51
• 3.1 WORKFLOW GRAM-NEGATIVI	51
• 3.2 WORKFLOW EMOCOLTURE	59
4. RISULTATI	62
5. DISCUSSIONE	68
6. CONCLUSIONE	76
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	78

INTRODUZIONE

I laboratori di microbiologia clinica stanno attraversando un costante processo di evoluzione delle potenzialità analitiche che stanno mutando progressivamente la diagnostica infettivologica.

Questi cambiamenti richiedono un'attenzione particolare all'accuratezza dei risultati analitici e al contempo una maggior efficienza dei risultati in termini clinici, incidendo in maniera significativa su tutto il panorama della Medicina di Laboratorio.

I laboratori di microbiologia clinica, parallelamente, si ritrovano ad affrontare le sfide associate al fenomeno dell'antibiotico-resistenza che rappresenta attualmente uno dei rischi maggiori per la salute pubblica.

La World Health Organization (Who) ha infatti ribadito le sue raccomandazioni che ha bandito a livello nazionale. Infatti, in Italia il nuovo piano nazionale contro la resistenza agli antibiotici 2022-2025 (Pncar 2022-2025) è in pieno regime.

(Ferrara Francesco et al.,2023)

A partire dalla scoperta della penicillina da parte di Alexander Fleming alla fine degli anni 20', gli antibiotici hanno rivoluzionato il campo della medicina, contribuendo a salvare milioni di vite ogni anno e a ridurre le patologie di origine infettiva; inoltre, vengono utilizzati sia per il trattamento che per la prevenzione delle infezioni batteriche. (Martens Evan et al.,2017)

Oltre ai benefici che negli anni sono stati tratti dall'impiego degli antibiotici, si è sviluppato in contemporanea il fenomeno della resistenza antimicrobica.

Le cause sono dovute all'uso inappropriato e all'abuso di antibiotici, considerando anche il rapido ciclo replicativo dei batteri e il fatto che ad ogni ciclo vi è la possibilità di sviluppare una mutazione, che è una delle modalità con cui i batteri sviluppano la capacità di resistere agli antibiotici.

Poiché la velocità con cui si stanno sviluppando nuove resistenze è maggiore rispetto alla sintesi dei nuovi farmaci, si parla di una vera e propria emergenza con un notevole impatto economico e diverse implicazioni cliniche.

Le attuali metodologie impiegate in microbiologia clinica per l'identificazione dell'agente batterico e la determinazione del profilo di suscettibilità antimicrobica sono spesso caratterizzate da tempi prolungati e costi elevati.

Di conseguenza, i medici si affidano a terapie empiriche che risultano essere spesso la causa di insuccessi terapeutici, con conseguenti aumenti del tasso di mortalità e costi sanitari. (Maugeri Gaetano et al., 2019)

Il prolungamento del tempo di trattamento empirico può portare all'uso inappropriato degli antimicrobici, contribuendo all'insorgenza delle resistenze degli antibiotici.

L'impiego di antibiotici sistemici può causare un'alterazione del microbioma intestinale che può essere associata a varie complicazioni e disturbi, fattori che possono sia promuovere la resistenza, sia aumentare la suscettibilità alla colonizzazione e all'infezione.

Secondo uno studio, volto a sottolineare l'importanza della prescrizione giudiziosa degli antibiotici per ridurre gli effetti avversi derivati da una terapia antibiotica sistemica, il 20% dei pazienti trattati con antibiotici ha manifestato un effetto avverso al farmaco. (Tamma PD. et al., 2017).

L'obiettivo principale consiste nell'evitare di prescrivere antibiotici quando non è necessario e allo stesso tempo assicurarsi che, quando indispensabile, vengano somministrati al paziente gli antibiotici più appropriati.

Pertanto, uno scenario futuro potrebbe essere incentrato sullo sviluppo di nuove tecnologie più performanti, con l'obiettivo di:

- ✓ Potenziare il flusso di lavoro clinico;
- ✓ Migliorare la capacità diagnostica delle infezioni;
- ✓ Ridurre i tempi di refertazione;
- ✓ Intervenire tempestivamente sulla terapia della paziente;
- ✓ Migliorare la cura del paziente.

1.1 'FAST MICROBIOLOGY'

Quella che viene definita '*Fast Microbiology*' nasce in risposta alle necessità delle strutture ospedaliere.

Uno dei problemi che caratterizza le fasi cliniche, è il tempo di ottenimento dei risultati.

I tradizionali metodi coltura e caratterizzazione fenotipica spesso richiedono dai 3 ai 5 giorni per fornire risultati definiti e accurati al clinico, e i tempi si amplificano in presenza di microrganismi a crescita lenta o di difficile coltivazione.

Tale ritardo, assume particolare rilevanza nelle infezioni del torrente circolatorio (*BSI: Blood Stream Infection*) e nella gestione della sepsi.

In questi contesti il rischio di morte da shock settico aumenta di oltre il 7% per ogni ora di ritardo nell'avvio di una terapia antimicrobica mirata.

La riduzione del tempo di risposta influenza e migliora non solo lo stato di salute dei pazienti, riducendone la mortalità, ma risulta essere un fattore inderogabile anche per la struttura di ricovero in termini di diminuzione dei tempi di ricoveri e i costi associati.

(Debbia Eugenio Agenore,2018)

Negli ultimi anni, l'introduzione delle nuove tecnologie ha avuto un impatto positivo sia per quanto riguarda la diagnosi che per il trattamento delle infezioni.

Queste nuove strumentazioni stanno rivoluzionando i test di microbiologia clinica in diversi contesti.

1.2 INFEZIONI DEL FLUSSO SANGUIGNO

I punti principali nella gestione delle infezioni del flusso sanguigno sono:

- ❖ DEFINIZIONE: Le infezioni del flusso sanguigno (*BSI-bloodstream infection*) sono definite dalla presenza di colture ematiche positive in un paziente con segni sistemici di infezione.

Possono essere:

→ Primarie, quando l'origine dell'infezione non è identificata;

→ Secondarie, ad una fonte documentata, la cui origine è identificata.

- ❖ CARATTERISTICHE-BSI: I BSI acquisiti in comunità negli adulti immunocompetenti di solito coinvolgono batteri sensibili ai farmaci, mentre quelli associati all'assistenza sanitaria sono spesso dovuti a ceppi multi-resistenti (*MDR-Multi drug resistant*), a diversi tipi di antibiotici.

- ❖ IMPORTANZA DELLA TERAPIA ANTIMICROBICA PRECOCE: Una terapia antimicrobica precoce e adeguata è fondamentale per migliorare i risultati dei pazienti con BSI, soprattutto in quelli con criteri di sepsi o shock settico. La tempestiva somministrazione di antibiotici può aiutare a ridurre la diffusione dell'infezione e a prevenire complicanze gravi.

- ❖ SCELTA DEGLI ANTIMICROBICI: La scelta degli antimicrobici di prima linea dovrebbe essere basata sulle linee guida e sull'esame diretto dei campioni disponibili.

È importante considerare l'epidemiologia locale, la fonte sospetta dell'infezione, lo stato immunitario del paziente, la precedente esposizione antimicrobica e la colonizzazione documentata con batteri MDR.

Queste informazioni possono aiutare a guidare la scelta degli antibiotici più appropriati per il trattamento delle infezioni del flusso sanguigno.

(Timsit JF et al.,2020)

La gestione efficace delle infezioni del flusso sanguigno richiede una diagnosi tempestiva, una terapia antimicrobica appropriata e una valutazione attenta dei fattori di rischio e delle caratteristiche individuali del paziente.

La collaborazione tra i clinici e il rispetto delle linee guida cliniche può contribuire a migliorare i risultati dei pazienti affetti da BSI.

1.2.1 BATTERIEMIA

La batteriemia è una condizione caratterizzata dalla presenza transitoria di batteri patogeni nel sangue.

Differisce dalla setticemia e dalla sepsi perché non è necessariamente associata a una sintomatologia generale come febbre, brividi e alterazione dello stato mentale.

La batteriemia può verificarsi come complicazione di varie condizioni, inclusa l'infezione da batteri piogeni, ma può anche essere asintomatica o subclinica, cioè senza sintomi evidenti e può essere dimostrata solo da particolari test di laboratorio, come l'emocoltura, che consente di isolare e identificare i batteri presenti nel sangue. La gestione della batteriemia dipende dalla causa sottostante e dalla presenza o meno di sintomi o segni di sepsi o setticemia.

(Enciclopedia Treccani)

1.2.2 SEPSI

La sepsi viene definita come patologia “tempo dipendente” il cui esito dipende dalla rapidità con cui viene riconosciuta e gestita clinicamente a partire dalla prima ora, in quanto anche brevi ritardi nella diagnosi e nel trattamento possono portare a gravi conseguenze per il paziente.

Nonostante vi siano numerose evidenze scientifiche e campagne internazionali che promuovono l'adozione di pratiche ottimali per la gestione della sepsi, vi sono degli ostacoli significativi che impediscono una diffusione più ampia di queste pratiche, quali:

- La complessità dei protocolli di gestione può essere un deterrente per gli operatori sanitari, specialmente in un contesto frenetico come quello del Pronto Soccorso, dove il tempo è spesso un fattore critico. È essenziale semplificare e rendere accessibili le linee guida e i protocolli per garantire che possano essere facilmente implementati nella pratica clinica quotidiana.
- La mancata percezione della sepsi come una patologia tempo-correlata potrebbe derivare dalla mancanza di consapevolezza o da una priorità insufficiente assegnata alla sua gestione rispetto ad altre emergenze più visibili o conosciute.
- L'individuazione precoce del paziente settico è un passaggio cruciale nella catena di gestione della sepsi.

(Calci Mario.,2017)

La definizione del termine 'SEPSI' si è evoluta nel corso del tempo, contemporaneamente alla conoscenza medica, alla fisiopatologia della condizione, ai fattori eziologici che ne determinano la causa e alla progressione clinica.

Inizialmente i termini di sepsi, setticemia, batteriemia e shock settico venivano utilizzati come sinonimi e questo creava problemi nell'identificazione e nella diagnostica dello stato della malattia.

La prima definizione di Sepsis è stata formulata nel 1991 *dall'American College of Chest Physicians* e la *Society of Critical Care Medicine Consensus Conference* e si basava sui criteri della SIRS, sindrome da risposta infiammatoria sistemica, in risposta alle infezioni.

Successivamente, la definizione è stata poi affinata in base alla gravità della condizione, distinguendo tra sepsi, sepsi grave e shock settico.

(Bone RC et al.,1992)

Le definizioni di sepsi e shock settico sono state recentemente aggiornate alla luce delle nuove conoscenze fisiopatologiche emerse.

La '*Society of Critical Care Medicine*' ed '*European Society of Intensive Care Medicine*' ha stabilito che c'era un'importante necessità di identificare tutti gli elementi della sepsi che caratterizzano tale patologia, e per offrire uniformità, hanno stipulato il documento '*The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock*' pubblicato sul *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, in cui 19 esperti hanno aggiornato le definizioni, secondo cui:

- La **Sepsis** viene definita non come una patologia specifica ma come una sindrome caratterizzata da una patologia ancora incerta, e spesso viene identificata da un forte sospetto clinico di infezione scaturito dalla sintomatologia del paziente. È provocata dalla presenza persistente di un microrganismo patogeno in siti normalmente sterili e può avere come conseguenza una disfunzione d'organo che è causata da una risposta disregolata dell'ospite, considerata potenzialmente pericolosa per la vita, che scaturisce quando la risposta dell'organismo ad un'infezione danneggia gli stessi organi e tessuti.

- La **Sepsi grave** viene definita come una condizione clinica caratterizzata dalla presenza della sepsi e complicata dalla presenza di uno o più segni di disfunzione d'organo che potrebbero progredire fino a shock settico.
- Lo **Shock settico** è la manifestazione più grave che può avere come conseguenza la manifestazione della '*Multiple Organ Dysfunction Syndrome*' (MODS) o sindrome da disfunzione d'organo multipla, caratterizzato da gravi anomalie circolatorie, cellulari e metaboliche, compromettendo le funzioni vitali, e queste condizioni contribuiscono in maniera significativa all'aumento della probabilità di morte del paziente, molto più alta rispetto alla sola sepsi.
La tempestività nel riconoscere e trattare lo shock settico è fondamentale per migliorare le possibilità di sopravvivenza del paziente.

La SIRS può quindi rappresentare una risposta adattativa dell'organismo, ma in numerosi pazienti ospedalizzati sono stati osservati elementi di SIRS anche in quelli con esito negativo che non sviluppano mai un'infezione, mentre la sepsi è caratterizzata da una fisiopatologia più complessa, determinata dalla coesistenza tra infezione e SIRS.

(Singer Mervyn et al.,2016)

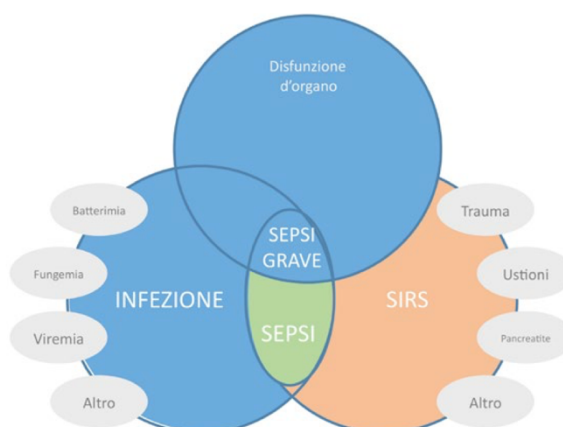


Figura 1: Relazione fra Infezione, SIRS, Sepsis e Sepsis Grave

L'organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) evidenzia l'urgenza di affrontare milioni di morti e disabilità causate dalla sepsi, molto spesso ostacolate da lacune nella conoscenza e comprensione della patologia che spesso si verifica nei paesi a basso e medio reddito.

Inoltre, l'utilizzo di diverse definizioni di sepsi e l'adozione di differenti criteri diagnostici utilizzati, rende difficile ottenere un quadro completo del vero impatto globale della sepsi.

(WHO., 2020)

Nonostante i notevoli progressi compiuti negli ultimi anni nella comprensione e nel trattamento della sepsi grave e dello shock settico, queste condizioni patologiche rappresentano ancora oggi una sfida significativa per la sanità a livello mondiale, con tassi di mortalità che rimangono inaccettabilmente elevati.

1.3 EPIDEMIOLOGIA

La reale incidenza della sepsi è difficile da determinare in quanto si tratta di una sindrome non sempre riconducibile ad una diagnosi primaria ma spesso si manifesta come una complicanza di altre patologie.

Di conseguenza, è possibile ipotizzare che il numero ufficiale dei casi conosciuti potrebbe essere inferiore rispetto alla reale incidenza.

Risulta quindi evidente quanto sia essenziale avere una diagnosi rapida che consenta al clinico di avviare un trattamento adeguato nel più breve tempo possibile.

Dalle Indicazioni del WHO fornite dall'OMS, emerge che circa l'85% dei casi di sepsi e decessi correlati si verificano nelle popolazioni più vulnerabili:



Bambini di età inferiore a uno. Ogni anno si verificano circa 49 milioni di casi di sepsi e la metà colpisce i bambini, con conseguenti 2,9 milioni di decessi, molti dei quali potrebbero essere evitati tramite una diagnosi precoce e un'accurata gestione clinica.



Donne in gravidanza. Le infezioni ostetriche acquisite dopo il taglio cesareo o dopo l'aborto, rappresentano la terza causa più comune di mortalità materna, stimando che su 1000 donne che partoriscono, 11 manifestano infezioni correlate, gravi disfunzioni d'organo e decessi.



La sepsi spesso origina da infezioni nosocomiali, in particolare il 49% dei pazienti settici nelle terapie intensive acquisisce l'infezione in ospedale. Si stima che il 27% delle persone con sepsi negli ospedali e il 42% di coloro che si trovano nelle unità di terapia intensiva moriranno a causa di questa condizione.



Persone con sistema immunitario indebolito o compromesso.

Figura 2: raffigurazione rispettivamente di bambini di età inferiore a uno, donne in gravidanza, pazienti ospedalizzati e sistema immunitario.

Il titolo del documento di Riferimento è impattante ‘L’OMS CHIEDE UN’AZIONE GLOBALE SULLA SEPSI- CAUSA 1 DECESSO SU 5 IN TUTTO IL MONDO’ e il direttore generale dell’OMS, Dott. Tedros Adhanom Ghebreyesus, afferma che *“Il mondo deve intensificare urgentemente gli sforzi per migliorare i dati sulla sepsi in modo che tutti i paesi possano rilevare e trattare questa terribile condizione in tempo, ciò significa rafforzare i sistemi di informazione sanitaria e garantire l’accesso a strumenti diagnostici rapidi e cure di qualità, compresi farmaci e vaccini sicuri e convenienti”*.

(World Health Organization., 2020)

Il ‘*THE GLOBAL BURDEN OF DISEASE*’ (GBD) è un consorzio costituito da ricercatori che studiano i problemi di salute più impattanti a livello globale.

Data l’elevata incidenza, la prevalenza e la mortalità della sepsi, quest’ultima non poteva non essere oggetto di studio da parte dei ricercatori che definiscono la sepsi come un ‘problema di salute globale’.

Hanno condotto uno studio fornendo dati basati sull’incidenza e mortalità della sepsi dal 1990 al 2017, e hanno stimato 49 milioni di casi e 11 milioni di decessi nel 2017, il doppio rispetto alle stime precedenti.

Inoltre, un aspetto particolarmente preoccupante che è emerso, è che la sepsi ha contribuito a quasi il 20% dei decessi di ogni anno nel mondo, con più di 20 decessi al minuto.

E in linea con i dati forniti anche dal WHO, la mortalità correlata alla sepsi colpisce le popolazioni più vulnerabili, e l’85% dei decessi si sono verificati nei Paesi a Basso e Medio Reddito (LMIC) lì dove le risorse sanitarie sono spesso limitate, così come l’accesso alle cure.

(Rudd KE et al., 2020)

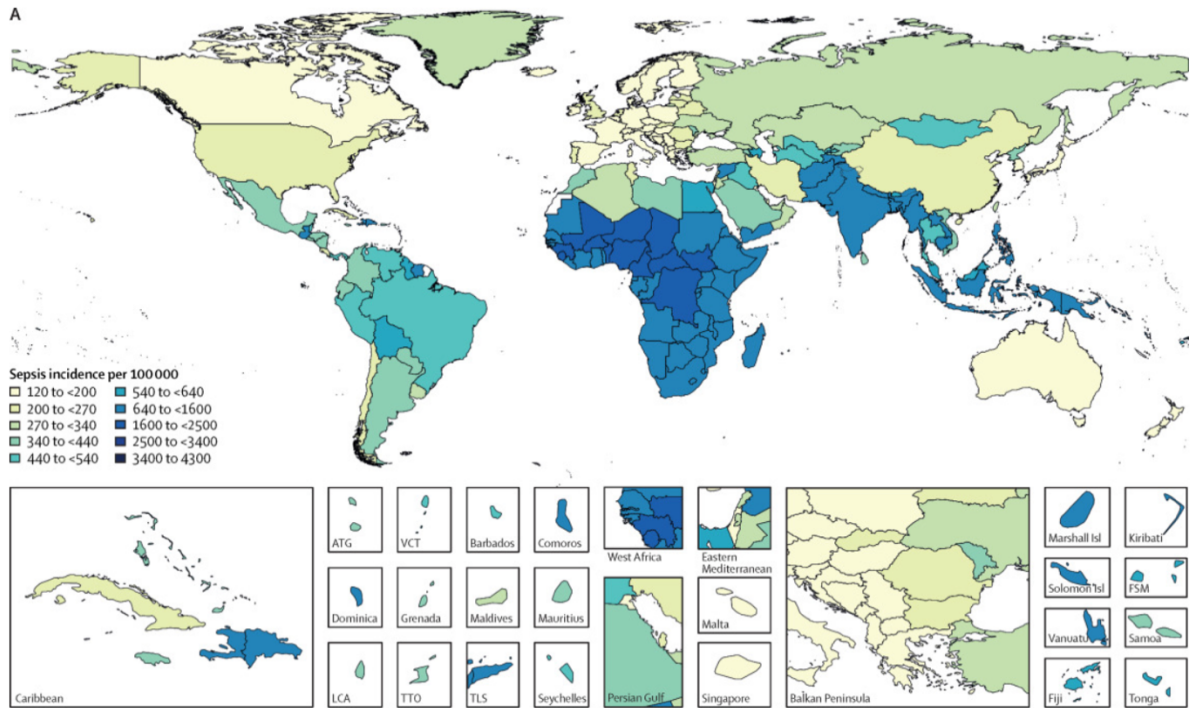


Figura 3: Incidenza di sepsi standardizzata per età, per 100 000 abitanti, per entrambi i sessi, nel 2017.

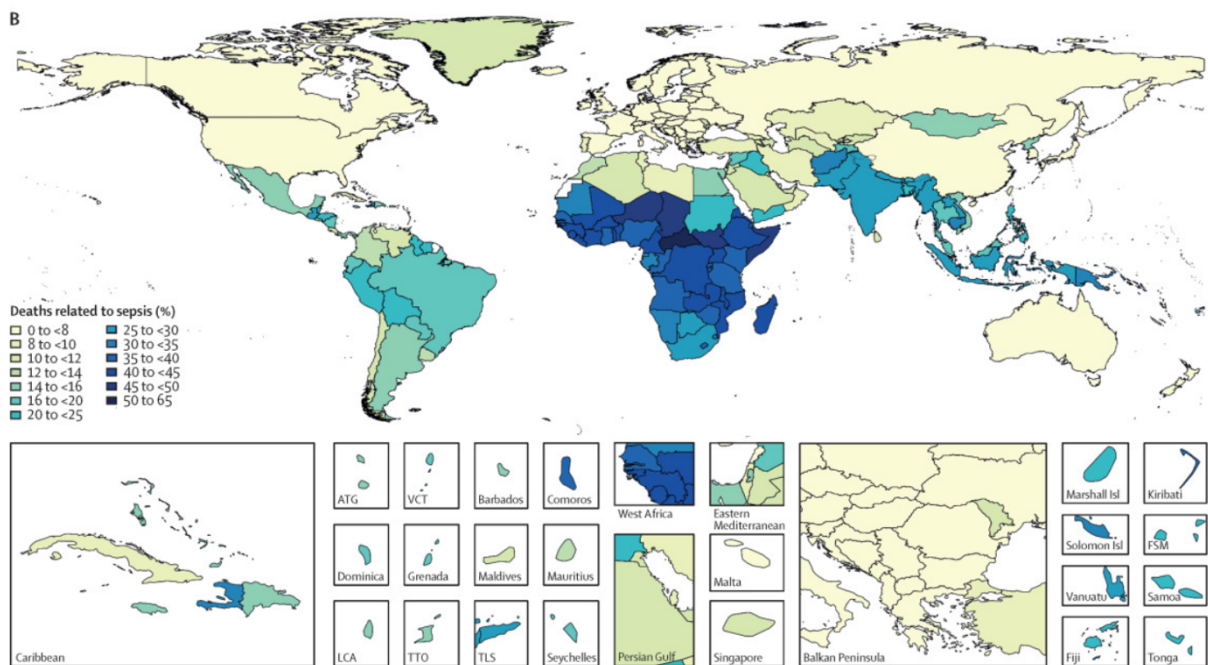


Figura 4: Percentuale di tutti i decessi correlati alla sepsi, standardizzata per età, per entrambi i sessi, nel 2017.

Secondo l'associazione microbiologi clinici italiani (AMCLI) la sepsi è un'emergenza sanitaria con 20.000.000-30.000.000 di persone colpite a livello mondiale, di cui 250.000 casi solo in Italia, con un tasso di mortalità di 1 su 4, per un totale di 60.000 morti all'anno.

La sepsi è strettamente correlata ad altri due problemi di salute pubblica:

1. Le infezioni ospedaliere
2. La resistenza agli antibiotici

Queste due condizioni si possono verificare in maniera indipendente l'una dall'altra, ma la sepsi può essere ulteriormente complicata da gravi infezioni ospedaliere, specialmente quando queste sono causate da batteri resistenti agli antibiotici.

(AMCLI., 2017)

1.4 ANALISI SUI COSTI ASSOCIATI ALLA GESTIONE DELLA SEPSI

In Italia è stato condotto uno studio volto a valutare i costi della gestione della sepsi, in cui sono stati arruolati 2.946 pazienti.



Figura 5: Costi di gestione del paziente settico e del paziente non settico

Secondo l'analisi statistica, il costo della gestione clinica di un solo paziente con sepsi aumenta dell'86% rispetto al paziente senza sepsi, questo è dovuto al fatto che la sepsi richiede spesso cure intensive, tra cui terapia antibiotica, monitoraggio continuo e supporto vitale avanzato.

L'aumento del 163% di permanenza nelle terapie intensive è anche un indice della criticità e gravità delle condizioni del paziente con sepsi.

Questi trattamenti possono essere estremamente costosi e possono aumentare significativamente il costo complessivo dell'assistenza sanitaria per i pazienti affetti da questa grave condizione.

Inoltre, il rischio di mortalità del paziente settico in terapia intensiva è tre volte superiore rispetto al paziente senza sepsi. (Lucioni C. et al.,2001)

In uno studio osservazionale condotto negli Stati Uniti, sono stati valutati i costi di gestione dei pazienti affetti da sepsi negli ospedali statunitensi.

Nello studio sono stati inclusi 2.566.689 casi di sepsi, il 50,8% dei quali era di sesso femminile, con un'età media di 65 anni.

La mortalità e i costi hanno subito una variazione e un aumento di tipo graduale in base alla gravità.

GRAVITA'	MORTALITA'	COSTI
SEPSI	5,60%	16.324 \$
SEPSI GRAVE	14,90%	24.638 \$
SHOCK SETTICO	34,20%	38.298 \$

Tabella 1: Gravità, mortalità e i costi associati alla gestione della sepsi

I costi hanno subito ulteriori variazioni a seconda della presenza o assenza di sepsi all'ammissione.

SEPSI ALL'AMMISSIONE	COSTI
PRESENZA	18.023 \$
ASSENZA	51.022 \$

Tabella 2: I costi relativi alla presenza o assenza della sepsi all'ammissione negli ospedali statunitensi

Con il risultato che il costo della gestione dei pazienti settici negli ospedali statunitensi è tra i più alti rispetto alle altre condizioni e il tasso dei ricoveri è in continuo aumento.

(Paoli CJ. et al.,2018)

Questi dati sottolineano l'importanza di identificare precocemente la sepsi e di iniziare tempestivamente il trattamento, comprese terapie come antibiotici e supporto emodinamico più appropriato, al fine di migliorare le probabilità di sopravvivenza dei pazienti in terapia intensiva.

Inoltre, evidenziano la necessità di strategie preventive per ridurre l'incidenza di sepsi e trattamenti diagnostici più efficaci per coloro che sviluppano questa condizione durante il loro soggiorno ospedaliero.

1.5 EZIOLOGIA

L'identificazione del microrganismo che causa la sepsi è importante per la gestione del paziente.

Lo studio '*Extended Prevalence of Infection in Intensive Care*' (EPIC II) ha condotto un'analisi su 13.796 pazienti adulti, mettendo in evidenza che a causare la sepsi fossero prevalentemente batteri Gram-negativi nel 62% dei casi, e nel 47% batteri Gram-positivi, mentre il 19% erano funghi. (Vincent JL et al.,2009)

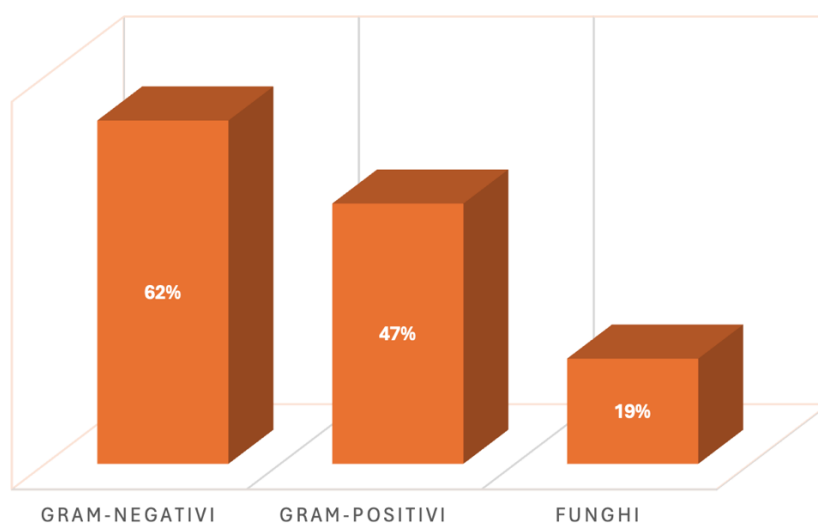


Figura 6: Prevalenza dei microrganismi nei pazienti infetti

Fino al 2020 i batteri erano quindi identificati come i principali agenti infettivi che causano la sepsi, e per questo motivo le Linee Guida della *Surviving Sepsis Campaign* suggeriscono la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro nei pazienti con sospetta sepsi o shock settico entro la prima ora dall'identificazione dei sintomi.

Ma secondo uno studio condotto da Umeman et al., nelle unità di terapia intensiva in Giappone, i patogeni più frequentemente isolati, causali la sepsi sono i batteri Gram-negativi, quali *Escherichia Coli* nel 21,5% dei casi, e *Klebsiella Pneumoniae* nel 9,0% dei casi.

Inoltre, sottolinea come una terapia antibiotica empirica non sia efficace per tutti i casi di sepsi, poiché la prevalenza cambia a seconda del sito di infezione, in quanto i batteri Gram-negativi sono l'agente patogeno più frequentemente isolato nelle infezioni addominali (38,4%) e nell'infezione del tratto urinario (72,0%); viceversa i batteri Gram-positivi sono i patogeni dominanti nell'infezione ossea/tessuto molle (55,7%) e nell'infezione cardiovascolare (52,6%).

(Vincent JL et al., 2009) (Umemura Yutaka et al., 2020) (Dyck Birte et al., 2024)

Queste informazioni mettono in evidenza come la mortalità della sepsi dipende principalmente da due fattori:

- A. Il tipo di microrganismo coinvolto;
- B. La sede dell'infezione.

Tuttavia, rimane essenziale e in alcuni casi anche vitale, agire tempestivamente con la somministrazione di una terapia antibiotica empirica per limitare il più possibile la progressione e la diffusione degli agenti patogeni, che deve poi essere modulata, una volta identificato il patogeno responsabile.

Questo approccio mira ad ottimizzare l'uso degli antibiotici, andando ad applicare una de-escalation della terapia antibiotica empirica, riducendo lo spettro dell'antibiotico quando il patogeno è sensibile ad un antibiotico più mirato, eliminando così gli antibiotici a largo spettro non necessari; o nel caso in cui i test microbiologici rivelino la resistenza ad un antibiotico specifico, il medico può decidere se cambiare l'antibiotico iniziale prescritto.

Per implementare una terapia antibiotica mirata, è fondamentale ottenere campioni biologici, come le emocolture, per isolare e identificare il patogeno responsabile dell'infezione, ed eseguire test di sensibilità agli antibiotici per determinare quali sono efficaci contro il patogeno isolato.

Una volta ottenuti i risultati dei test microbiologici, il medico può quindi valutare e selezionare gli antibiotici più appropriati, stabilirne il dosaggio corretto e la via di somministrazione più adatta, per trattare efficacemente l'infezione.

Questo approccio contribuisce a:

- ✓ Ridurre al minimo l'uso inappropriato degli antibiotici;
- ✓ Prevenire lo sviluppo di resistenza antimicrobica;
- ✓ Migliorare l'efficacia del trattamento.

È importante sottolineare che la terapia antibiotica mirata richiede una stretta collaborazione tra medici, microbiologi e farmacisti per garantire una gestione ottimale delle infezioni e dei loro agenti causali.

1.6 FISIOPATOLOGIA

L'elevata mortalità nella sepsi può essere attribuita all'interazione tra l'agente patogeno e la risposta immunitaria dell'ospite.

Sebbene quest'ultima sia inizialmente mirata a contrastare l'infezione, mediante il rilascio di mediatori pro-infiammatori con lo scopo di limitare l'infezione favorendo i processi riparativi e il successivo rilascio di mediatori antinfiammatori con lo scopo di limitare la risposta infiammatoria e ripristinare l'equilibrio, un'eccessiva attivazione o la mancata regolazione in maniera adeguata, può causare danni agli organi e contribuire alla progressione della sepsi.

Questi processi necessitano quindi di una fase di controllo, se ciò non avviene, i mediatori pro-infiammatori possono riversarsi nella circolazione sistemica, portando alla diffusa e incontrollata attivazione dell'infiammazione.

Fino a quando la risposta infiammatoria rimane localizzata e i mediatori rilasciati provocano solo una reazione infiammatoria sistemica (SIRS), c'è ancora una buona probabilità di controllo del processo.

Tuttavia, se la risposta pro-infiammatoria, probabilmente a causa di un'alterazione generalizzata dell'endotelio, causa un danno alla perfusione dei diversi tessuti, la prognosi peggiora significativamente.

L'azione delle tossine batteriche, in particolare l'endotossina, componente della parete cellulare dei batteri Gram-negativi, è fondamentale nell'attivazione di processi pato-fisiologici chiave nella sepsi. Queste molecole possono innescare la cascata della coagulazione e del complemento, oltre a stimolare il rilascio di numerosi mediatori infiammatori responsabili dei segni clinici della sepsi.

(Guzzo I. et al.,2006)

La disfunzione endoteliale è un momento cruciale nello sviluppo dello shock settico, poiché determina uno squilibrio tra vasocostrizione e vasodilatazione, spesso favorendo quest'ultima.

Questo squilibrio è spesso responsabile dell'elevata letalità e inefficacia terapeutica.

(Parodi O. et al., 2006)

Lo shock settico si manifesta quando microrganismi patogeni entrano nel flusso sanguigno e innescano una risposta infiammatoria generalizzata, causando un grave deterioramento della circolazione ematica.

La patogenesi di questa condizione coinvolge un complesso processo di attivazione cellulare che porta al rilascio di diversi mediatori pro-infiammatori.

Questa risposta infiammatoria attiva sia i leucociti che le cellule endoteliali e induce anche l'attivazione del sistema di coagulazione.

La risposta infiammatoria eccessiva osservata nello shock settico è principalmente mediata dalle citochine $TNF-\alpha$ e IL-1, che vengono prodotte dai monociti in risposta all'infezione.

Sebbene la risposta infiammatoria sistemica della sepsi causi profondi cambiamenti sia a livello macro-circolatorio che micro-circolatorio, con conseguente compromissione della perfusione tissutale, un altro meccanismo di rilievo nel processo di sviluppo della disfunzione acuta degli organi nello shock settico è rappresentato dall'apoptosi o morte cellulare programmata accelerata, che svolge un ruolo significativo aggravando l'evoluzione della sepsi e la disfunzione degli organi associata a questa condizione.

(Trzeciak Stephen et al.,2008)

1.7 GESTIONE DEL PAZIENTE SETTICO

Recentemente sono state pubblicate le nuove linee guida 2021 della *Surviving Sepsis Campaign* (SSC) per il trattamento della sepsi e shock settico.

La SSC ha svolto un ruolo fondamentale nel migliorare la gestione della sepsi sin dalla sua istituzione nel 2002.

Questa iniziativa, nata dalla collaborazione tra la *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e la *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM), ha avuto un impatto significativo sulle pratiche cliniche e sulla qualità della cura dei pazienti affetti da sepsi in tutto il mondo.

Le linee guida sono un insieme di raccomandazioni ricavate sulla base di conoscenze ed evidenze che vengono continuamente aggiornate, incrementando le nuove evidenze scientifiche e le migliori pratiche cliniche.

Ha quindi rivoluzionato la gestione della sepsi in tutto il mondo, fornendo linee guida altamente standardizzate, appropriate e omogenee.

LINEE GUIDA: SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN (SSC)

Le raccomandazioni vengono distinte tra:

* Raccomandazioni FORTI: sono supportate da numerose evidenze scientifiche che dimostrano l'efficacia dell'approccio raccomandato e consigliano il trattamento poiché è altamente probabile che porti a risultati positivi per il paziente.

* Raccomandazioni DEBOLI: si basano su prove meno certe riguardo l'efficacia e la sicurezza del trattamento; pertanto, i medici possono anche valutare altre strategie di trattamento.

Questo approccio a due livelli aiuta a fornire una guida chiara ai professionisti sanitari sulla gestione della sepsi, considerando sia le prove scientifiche disponibili ma anche la necessità di adattare le raccomandazioni alla varietà dei pazienti e al contesto clinico.

Le linee guida comprendono:

1. Screening e trattamento precoce: le linee guida hanno emesso una forte raccomandazione poiché questa procedura fa sì che i pazienti con sospetta sepsi vengano identificati precocemente e ricevano tempestivamente l'assistenza sanitaria.
2. Infezione: Questa sezione varia a seconda della gravità della condizione del paziente e alla probabilità di sepsi.
 - ◇ Per pazienti con sepsi confermata o probabile, le linee guida raccomandano fortemente la somministrazione di antimicrobici empirici entro 1 ora dal sospetto di sepsi.
 - ◇ Per pazienti sepsi non definita o probabile, si raccomanda una valutazione delle cause infettive e decidere, se è il caso, di somministrare gli antimicrobici entro 3 ore.
3. Gestione emodinamica: le linee guida hanno emesso una forte raccomandazione per l'uso di cristalloidi come fluidi di prima linea nei pazienti con sepsi e shock settico, grazie al fatto che sono ampiamente disponibili e a costi accessibili, e se utilizzati in dosi appropriate hanno un basso rischio di effetti avversi.

La gestione dei fluidi deve essere adattata al singolo paziente tenendo conto delle specifiche condizioni cliniche.
4. Ventilazione: le linee guida hanno emesso una raccomandazione debole per l'utilizzo dell'ossigenazione nasale ad alto flusso (HFNO).
5. Terapie aggiuntive: questa sezione si occupa delle terapie di supporto direttamente correlate alla sepsi, ed è in continuo aggiornamento per garantire che i pazienti ricevano la miglior cura possibile.
6. Obiettivi di cura e risultati a lungo termine: le linee guida raccomandano una discussione precoce sugli obiettivi di cura coinvolgendo attivamente anche i pazienti e le famiglie nella scelta decisionale del trattamento e cure intensive. (Oczkowski Simon et al., 2022)

1.8 WORKFLOW DIAGNOSTICI DELLA SEPSI

La diagnosi di sepsi viene stabilita sulla base dei segni e sintomi clinici del paziente. I segni e i sintomi della sepsi non sono specifici, in molti soggetti la sepsi determina un aumento improvviso della temperatura corporea con brividi, malessere e talvolta con manifestazioni cutanee (rash).

Tuttavia, questi sintomi non si manifestano in tutti i casi.

Nei neonati, negli anziani e nei pazienti in terapia con corticosteroidi o con farmaci antinfiammatori non steroidei, la febbre potrebbe non essere presente, e in alcuni casi rari, potrebbe verificarsi anche ipotermia.

(Rhodes Andrew et al.,2017)

Questa varietà, rende la sepsi una condizione difficile da diagnosticare solo in base ai sintomi.

Pertanto, la diagnosi rapida di sepsi è essenziale in quanto maggiore è l'intervallo di tempo tra lo sviluppo della sepsi e l'inizio di una terapia antibiotica, minore è la possibilità di esito favorevole per il paziente. (Siewers Karina et al., 2021)

Nel 2012 l'ospedale di Alessandria ha avviato un approccio multidisciplinare per migliorare la gestione e ridurre gli eventi di sepsi associati all'assistenza sanitaria.

Il progetto pilota è stato avviato tra il laboratorio di microbiologia e il pronto soccorso con l'obiettivo di:

- ✓ Introdurre un approccio per il test della sepsi presso il paziente, che mira ad avere una risposta terapeutica tempestiva;
- ✓ Aumentare la sicurezza del personale e dei pazienti evitando che i flaconi rimangano incustoditi prima dell'incubazione, garantendo la qualità e l'affidabilità dei test di laboratorio;
- ✓ Ridurre il tempo necessario per ottenere i risultati dei test delle emocolture.

La considerazione del tempo di incubazione come una variabile critica nel processo di ottenimento dei risultati delle emocolture dimostra una valutazione attenta dei fattori che influenzano l'efficienza del processo diagnostico, tra questi, il tempo che intercorre tra la raccolta del campione e l'incubazione nello strumento, la disponibilità del personale e la pianificazione degli orari di apertura del laboratorio, sono fattori chiave da considerare per garantire rapidi risultati e il miglioramento della qualità, evita il rischio di lasciare campioni preziosi in condizioni non ottimali.

L'implementazione di un modulo BD BAC-TEC™ FX (*Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA*) direttamente nel reparto del pronto soccorso, collegato al sistema di gestione dei dati (*EpiCenter™ BD*) e al sistema informativo dell'ospedale, ha permesso al laboratorio di monitorare in remoto lo stato delle fiale incubate nello strumento ED. Questo approccio satellitare, con l'incubazione immediata dei campioni di sangue, ha prodotto un significativo miglioramento dei tempi diagnostici, consentendo al Laboratorio di Microbiologia di comunicare informazioni cruciali ai medici per passare da una terapia empirica a una più mirata. (Rocchetti Andrea et al.,2016)

1.9 EMOCOLTURA

L'esame emoculturale è il *“gold standard”* nella diagnosi microbiologica della sepsi e delle infezioni del flusso sanguigno (BSI) ed è inclusa tra le azioni della *‘hour-1 bundle’* che sono una serie di azioni prioritarie da intraprendere entro la prima ora dal riconoscimento del caso di sepsi. (Levy MM et al.,2018)

Il laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria SS.Antonio e Biagio e C.Arrigo, segue l'intero percorso diagnostico e le modalità operative descritte di seguito, rivolte ai professionisti operanti in tutti i tre Presidi dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria: Presidio Civile, Presidio Infantile e Presidio Borsalino.

Lo scopo è di assicurare correttezza ed uniformità di comportamenti da parte dell'intero personale sanitario coinvolto, al fine di isolare il microrganismo responsabile della sospetta sepsi nel più breve tempo possibile, evitando possibili contaminazioni e garantire una corretta interpretazione del risultato.

Uno degli aspetti più importanti è la riduzione dei tempi di risposta o TAT-*turnaround time* (Tabak YP et al.,2018) in ogni fase del processo, dal trasporto dei campioni alla refertazione dei risultati, al fine di fornire informazioni diagnostiche per impostare un'un'appropriate terapia antimicrobica al più presto, così da contribuire a ridurre la morbilità, la mortalità ed i costi sanitari.

(Rocchetti Andrea et al., 2016)

La metodica di riferimento consiste nel porre un'aliquota di sangue del paziente in un flacone contenente brodo per coltura ed incubare il flacone ad una temperatura di 37°C per almeno 5 giorni. (Garcia RA et al.,2015) (Lamy B et al.,2016)

L'emocoltura prevede l'utilizzo di flaconi per aerobi (tappo blu) ed anaerobi (tappo viola).

L'emocoltura per pazienti pediatrici prevede l'utilizzo di specifici flaconi.

Inoltre, esistono flaconi specifici per miceti filamentosi e per micobatteri.

L'emocoltura prevede il prelievo di più set.

Per set si intende (flacone aerobio + flacone anaerobio).

L'isolamento del microrganismo attraverso la coltura del sangue permette di avviare una serie di accertamenti personalizzati in base alla gravità del quadro clinico che prevedono test molecolari multiplex, antibiogrammi genotipici, test fenotipici e genotipici di resistenza, identificazione di genere e specie, saggio in vitro di sensibilità ed analisi filogenetiche mediante *Next Generation Sequencing*.

(Truong WR et al.,2021)

1.9.1 MODALITA' DI PRELIEVO

Le emocolture vanno eseguite all'inizio del rialzo febbrile, in rapida successione, possibilmente prima dell'inizio della terapia antibiotica.

Nel paziente già in terapia antibiotica il prelievo per l'emocoltura va effettuato subito prima della somministrazione della dose successiva di antibiotici.

- Il prelievo deve essere eseguito in asepsi per ridurre al minimo il rischio di contaminazione;
- Eseguire un accurato lavaggio antisettico delle mani, immediatamente prima il contatto con il paziente, utilizzando acqua e detergente oppure frizionare con soluzione idroalcolica;
- L'uso di guanti sterili non è strettamente necessario purché venga fatta molta attenzione a non toccare nuovamente la zona cutanea individuata per il prelievo dopo l'esecuzione dell'antisepsi;
- Creare un'area sterile e usare una tecnica di prelievo asettica;
- Rimuovere i tappi di protezione dei flaconi per emocoltura, disinfettando la membrana sottostante con disinfettanti alcolici;
- Mantenere in verticale il flacone, nella fase di riempimento, per poter controllare il raggiungimento del volume corretto;
- Praticare l'antisepsi della cute del paziente o l'hub del CVC con clorexidina gluconato al 2% in alcol etilico o isopropilico 70% e lasciare asciugare per 30 secondi;
- Prelevare il sangue da una vena periferica e riempire prima il flacone aerobio se si usa il sistema Vacutainer;
- Etichettare il flacone con il codice a barre identificativo del paziente.

1.9.2 NUMERO DI SET

Per la maggior parte dei pazienti è consigliato il prelievo di due set poiché il prelievo di un eventuale terzo set aumenta la resa diagnostica e permette di identificare più facilmente potenziali contaminazioni, ma aumenta il rischio di contaminazione della coltura.

Il set n°1 e il set n° 2 ed eventualmente il n°3, devono essere caricati su di un'unica richiesta, indipendentemente dalla sede del prelievo (vena periferica e/o CVC); questa modalità di prenotazione consente di valutare tempi di positivizzazione dei singoli flaconi all'interno di un unico evento ed al microbiologo di interpretare correttamente il peso clinico degli isolamenti.

Il prelievo da CVC deve essere riservato esclusivamente ai casi di sospetta infezione correlata al catetere stesso e deve essere accompagnato da uno o due set contestuali prelevati da veni-puntura periferica per il calcolo dei tempi di positivizzazione (se il set prelevato da veni-puntura periferica si positivizza per lo stesso isolato due ore o più tardi rispetto a quello da CVC, aumenta la probabilità che si tratti di una sepsi CVC-mediata).

(Haddadin Y et al.,2024)

1.9.3 VOLUME DI SANGUE

Il volume dell'emocoltura è il fattore più significativamente associato all'isolamento di microrganismi durante batteriemia. Esiste una relazione diretta tra volume di sangue e probabilità di isolamento, con un aumento di circa il 3% per ml di sangue messo in coltura. Parallelamente, aumenta la probabilità di falsi negativi se vengono incubati volumi di emocoltura insufficienti. (Connell TG et al.,2007)

Per i pazienti adulti si raccomanda la coltura di 20-30ml di sangue per set, per un totale di sangue prelevato da 40-60ml a 60-90ml (a seconda che si eseguano 2 o 3 set).

Si raccomanda di non superare i 10ml di sangue per flacone.

(Mylotte JM et al.,2000) (Patel R et al., 2011)

Nei neonati e nei bambini i criteri per il calcolo dei volumi totali per l'emocoltura si basano sul peso o sull'età e tengono conto del volume totale del sangue del paziente, (Huber S et al., 2020) (Miller JM et al., 2018) il volume di sangue prelevato dovrebbe essere non più dell'1% del volume totale di sangue del paziente.

1.9.4 TIPOLOGIA DI FLACONI

Il sistema BD BACTEC® FX, attualmente in uso presso l'Azienda Ospedaliera, prevede i seguenti tipi di flaconi:

RICERCA	TIPO DI FLACONE	COLORE TAPPO FLACONE
Aerobi/Miceti	Bactec Plus Aerobic/F	Blu
Anaerobi	Bactec FX Lytic/10 Anaerobic	Viola
Aerobi/miceti in pazienti pediatrici	Bactec Peds Plus/F	Rosa
Miceti filamentosi	Bactec Mycosis IC/F	Verde
Micobatteri	Bactec Myco/F Lytic	Rosso

Tabella 3: Flaconi BD BACTEC® di emocoltura in uso presso l'Ospedale di Alessandria

E' richiesto un rapporto sangue:brodo di circa 1:15 per eliminare gli effetti antibatterici del sangue umano normale, questo può essere ridotto a 1:5-1:10 aggiungendo 0,05% di sodio polianetol sulfonato, un anticoagulante in grado di neutralizzare l'effetto del lisozima, inibire la fagocitosi, inattivare gli aminoglicosidi, ed inibire in parte la cascata del complemento.

I flaconi BD BACTEC® Plus aerobi ed i flaconi pediatrici, contengono resine cationiche e non ioniche per l'assorbimento degli antibiotici eventualmente presenti nel campione e consentono quindi l'eliminazione del loro effetto inibitore sulla crescita dei microorganismi presenti, diminuendo il rischio di falsi negativi.

Il flacone BD BACTEC® anaerobi contiene saponina, un detergente in grado di lisare sia i globuli rossi che i globuli bianchi presenti nel campione, rilasciando eventuali organismi intracellulari.

1.9.5 TRASPORTO

Il trasporto dei flaconi inoculati è parte integrante della corretta esecuzione dell'esame e richiedono da parte del reparto una valutazione tecnica ed organizzativa. Il trasporto e la conservazione dei flaconi influenzano il risultato finale dell'analisi in quanto un ritardo nella incubazione dei campioni può diminuire il "recovery" di microrganismi in coltura.

Secondo le Linee Guida i flaconi dovrebbero essere incubati immediatamente e comunque entro 1 ora dal prelievo.

Lo standard è fissato a 2 ore e la soglia di allarme è di 4 ore, che non devono essere superate.

I flaconi vanno conservati a temperatura ambiente e a temperature ottimali (non superiori a +30°C) e mai refrigerate.

Inoltre, devono essere trasportati in contenitori idonei (valigetta *biohazard*) negli incubatori presenti in Ospedale.

1.9.6 MODALITA' E TEMPI DI INCUBAZIONE

Secondo le linee guida, i flaconi dovrebbero essere incubati immediatamente o comunque il prima possibile, poiché eventuali ritardi possono influenzare negativamente la crescita batterica.

Viene fissato lo standard ≤ 2 ore nel 90% dei flaconi incubati.

(Dellinger RP et al., 2013) (CLSI., 2007) (UK standards for Microbiology Investigations.,2014)

I Flaconi possono essere inseriti in incubatori BD BACTEC FX dislocati in quattro punti dell'Ospedale:

1. Pronto Soccorso
2. Laboratorio Analisi
3. Laboratorio di Microbiologia
4. Presidio Riabilitativo del Borsalino (distante 4 km dall'edificio principale dell'Ospedale Civile)

I flaconi inoculati presso il Presidio Infantile devono essere inviati via posta pneumatica al Laboratorio Analisi dove verranno prelevati dagli operatori della SC Microbiologia per essere inseriti nell'incubatore presente in Microbiologia.

Gli incubatori di: Pronto Soccorso, Laboratorio Analisi e Presidio Borsalino sono collegati in remoto, tramite il software BD EpiCenter, con il laboratorio di Microbiologia.

Questo sistema consente al personale del laboratorio di monitorare in maniera continua lo stato dei flaconi e dello strumento, segnalando eventuali positività. La positività di un campione in incubazione viene segnalata anche dagli strumenti BACTEC mediante allarmi sonori e visivi.

I flaconi inoculati devono essere incubati nello strumento 24 ore al giorno.

Si raccomanda quindi di non superare la tempistica di 2 ore trascorse dal momento del prelievo all'incubazione.

L'incubatore BD BACTEC FX è costituito da uno o più cassette contenenti le postazioni per i flaconi e da un computer munito di *software* gestionale integrato con un'interfaccia "*touch screen*".

Il modulo strumentale è costituito da tre stazioni di lavoro integrate:

- Incubatore: che mantiene una temperatura di 35 °C +/- 1,5;
- Agitatore: che sottopone i flaconi a movimenti oscillatori ad intervalli di 30 minuti;
- Lettore: che permette di effettuare una lettura della crescita microbica ogni 10 minuti.

Ogni flacone contiene nel fondo un sensore chimico che può rilevare l'aumento di CO² prodotta dai microorganismi in crescita, mediante un metodo fluorimetrico. L'aumento di fluorescenza del sensore è direttamente proporzionale all'aumento di CO² presente.

Viene raccomandata un'incubazione di 5 giorni a 35°C.

Il 95-97% dei microrganismi patogeni cresce entro 3-4 giorni di incubazione. (Lambregts MMC et al., 2019)

Trascorso il tempo di incubazione previsto ed in assenza di rilevazione di potenziali positività da parte dello strumento, il flacone viene rimosso e refertato come negativo da parte della SC di Microbiologia.

In presenza di potenziale positività segnalata dal dispositivo, il flacone viene rimosso dallo strumento nel più breve tempo possibile e trasportato al laboratorio di Microbiologia per essere processato.

1.9.7 PROCESSAZIONE DELLE EMOCOLTURE

Questo processo avviene durante l'orario di apertura del laboratorio di Microbiologia e viene considerato un processo critico che ha la priorità su altre lavorazioni.

La procedura seguita è la seguente:

1. **L'ESAME MICROSCOPICO:** viene eseguito per ogni flacone positivo di ogni set, in quanto a volte i microrganismi isolati possono essere diversi.

Dopo aver effettuato lo striscio, è importante lasciare asciugare i vetrini sotto la cappa a flusso laminare.

La preparazione del vetrino per l'esame microscopico può essere eseguita anche dal sistema automatico di preparazione dei campioni WASP (*Walk away specimen processing*) prodotto dalla ditta COPAN, che ha rivoluzionato notevolmente:

- ✓ I tempi di lavoro
 - ✓ La standardizzazione dei processi
 - ✓ L'organizzazione dello spazio
 - ✓ La gestione delle attività laboriose
 - ✓ I tempi di consegna dei risultati
 - ✓ La riduzione dell'errore umano
 - ✓ Rischio ridotto di infezioni acquisite in laboratorio
- (Copan., 2023)



Figura 7: Strumentazione automatizzata Wasp®Lab utilizzata per la preparazione dell'esame microscopico delle emocolture

Dopodiché vengono posizionati nell'apposito supporto dello strumento di colorazione automatica dei Gram e a fine colorazione i vetrini vengono osservati mediante un microscopio ottico a vari ingrandimenti per riconoscere morfologia, disposizione spaziale ed affinità tintoriale di batteri e/o miceti. I batteri Gram-positivi appaiono in blu porpora mentre i Gram-negativi appaiono in rosa-viola. I miceti appaiono come i Gram-positivi. Il referto dell'esame microscopico viene inserito dal Dirigente che ha eseguito l'esame, sul sistema informatico ospedaliero per renderlo visibile ai clinici.

2. ALLESTIMENTO DELLE SUBCOLTURE: tutte le emocolture positive devono essere sottoposte a subcoltura.

Sia per i flaconi aerobi che per quelli anaerobi si esegue una semina su un set appropriato di terreni solidi di coltura, come rappresentato nella Tabella (4).

Come convenzione, si semina il primo flacone che si è positivizzato.

TERRENO	ATMOSFERA DI INCUBAZIONE	FINALITA'
Chocolate Agar PolyVitale X (PVX)	Arricchita di CO ₂ al 5-7%	Tutti i microrganismi
Columbia Agar + sangue di montone al 5% (COS)	Aerobiosi	Batteri Gram-positivi e Gram-negativi, metabolicamente esigenti e non; Miceti
Agar CHROMID® CPS® Elite (CPSE)	Aerobiosi	Terreno differenziale cromogeno
Agar Schaedler (SCS)	Anaerobiosi	Batteri anaerobi obbligati/facoltativi

Tabella 4: Terreni solidi per subcolture standard di emocoltura positiva

In base all'esame microscopico possono essere eseguite subcolture su terreni aggiuntivi per selezionare o separare più isolati nel caso di emocolture miste.

(Tabella 5)

TERRENO	ATMOSFERA DI INCUBAZIONE	FINALITA'
Sabouraud Agar Gentamicin Chloramphenicol 2 (SGC2)	Aerobiosi	Ricerca specifica miceti
Mac Conkey Agar (MCK)	Aerobiosi	Isolamento selettivo bacilli Gram-negativi aerobi/anaerobi facoltativi
Columbia + sangue di pecora al 5% + colistina e acido nalidixico (CNA)	Aerobiosi	Isolamento selettivo per cocci/bacilli Gram-positivi aerobi/anaerobi facoltativi

Tabella 5: Terreni solidi addizionali per subcolture particolari di emocoltura positiva

Dopo la semina le piastre vengono messe a incubare per circa 24 ore ad una temperatura di 37°C.

1.9.8 IDENTIFICAZIONE ISOLATI

1. IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA-VITEK 2®

Dalle colonie sviluppatesi su terreni di subcoltura, l'identificazione biochimica classica, ancora considerata il metodo di riferimento, (Reimer LG et al.,1997) prevede l'utilizzo di dispositivi (card) contenenti vari reagenti tra carboidrati, amminoacidi ed altri composti nelle quali viene posta un'aliquota di una sospensione batterica/fungina standardizzata da una provetta inserita in una cassetta.

In relazione ai diversi pattern di assimilazione, mediante un sistema di spettrofotometria, il dispositivo semiautomatico VITEK-2® fornisce una identificazione associata ad un valore di confidenza in percentuale.

L'identificazione mediante sistemi semiautomatici, anche se richiede dalle 18 alle 24 ore per l'identificazione di un isolato, è la più diffusa.



Figura 8: VITEK 2® e card per identificazione GN, GP e YST

Le card GN vengono utilizzate per l'identificazione accurata oltre 150 bacilli Gram-negativi fermentanti e non fermentanti.

Le card GP vengono utilizzate per l'identificazione accurata di 120 microrganismi Gram positivi.

Le card YST vengono utilizzate per l'identificazione accurata a livello di specie dei lieviti patogeni, e identificano fino a 50 lieviti.

(VITEK 2®;Biomeriux)

2. FILMARRAY®

Per ridurre i tempi di risposta, in casi selezionati di sepsi, è possibile eseguire il test di identificazione direttamente dai flaconi di emocolture positive mediante metodica molecolare basata sull'amplificazione degli acidi nucleici.

Il FimArray® è un sistema PCR Multiplex, che integra le fasi di preparazione, amplificazione, rilevamento e analisi del campione, in un unico test, piuttosto che richiedere tutta una serie di test individuali e specifici per ogni patogeno che indubbiamente porterebbe a ritardare l'avvio del trattamento, e contribuirebbe alla diffusione della malattia anche nella comunità. (Ramanan P. et al., 2017)

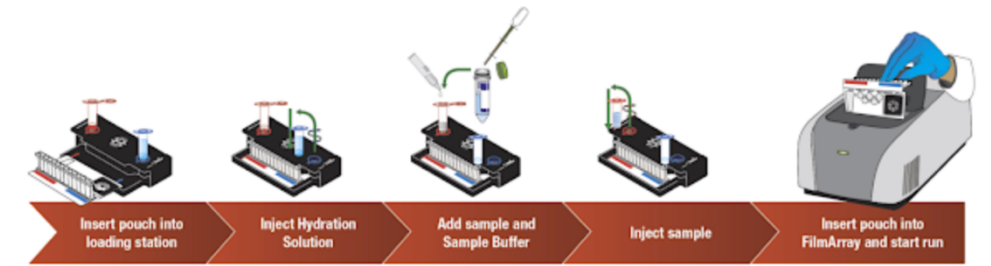


Figura 9: Sistema PCR multiplex FimArray®

Il pannello di identificazione di emocoltura positiva per il FimArray® consente un rilevamento rapido e accurato dei principali agenti patogeni causali di sepsi e dei più frequenti geni di resistenza agli antibiotici.

(Salimnia Hossein et al., 2016)

(Kang Chun-Min et al., 2020)

Gram+ Bacteria	Gram- Bacteria
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus lugdunensis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus- baumannii</i> complex <i>Bacteroides fragilis</i> Enterobacterales <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> group <i>Proteus</i> <i>Salmonella</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Neisseria meningitidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Yeast	Antibiotic Resistance
<i>Candida albicans</i> <i>Candida auris</i> <i>Candida glabrata</i> <i>Candida krusei</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	Carbapenemases IMP KPC OXA-48-like NDM VIM Colistin Resistance <i>mcr-1</i> ESBL CTX-M Methicillin Resistance <i>mecA/C</i> <i>mecA/C</i> and MREJ (MRSA) Vancomycin Resistance <i>vanA/B</i>

Figura 10: Pannello FimArray® emocolture, utilizzato per le emocolture positive

- Tempo di preparazione di 2 minuti;
- Identifica 43 target contemporaneamente;
- Identifica i principali geni di resistenza agli antibiotici beta-lattamici e glicopeptidi;
- Tempo di esecuzione dell'analisi di circa un'ora.

Il costo iniziale dello strumento FimArray® 2.0 è di 60.000 e il costo dei kit per ogni pannello, si aggira intorno ai 200€.

(BIOMÉRIEUX; Listino Biomeriux Italia., 2017)

3. VITEK® MS (MALDI-TOF)

Per l'identificazione dei microrganismi nei casi in cui non sia necessario l'utilizzo del FimArray®, se le colonie sul terreno solido dopo la subcoltura sono sufficientemente sviluppate, si utilizza la spettrometria di massa MALDI-TOF.

La spettrometria di massa è una tecnica analitica in cui i composti chimici vengono trasformati in molecole cariche tramite ionizzazione, e successivamente viene misurato il rapporto tra la loro massa e la carica (m/z).

Il termine MALDI-TOF deriva dall' acronimo in lingua inglese *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight - Mass Spectrometry*, ovvero spettrometria di massa in tempo di volo per ionizzazione laser e desorbimento assistita da matrice; questa tecnica ha sicuramente rivoluzionato l'identificazione di routine nel laboratorio di microbiologia clinica.

Questo permette di fornire l'identificazione con circa 12 ore di anticipo rispetto ai metodi biochimici classici basati su saggi di assimilazione, è affidabile ed ampiamente validata; pertanto, è sempre più diffusa nei Laboratori di Microbiologia Clinica.

(Dingle TC et al., 2013) Croxatto A et al.,2012) (Bizzini A et al.,2010)

Il flusso di lavoro di un MALDI-TOF inizia con la preparazione di una piastrina metallica sulla quale viene depositato il campione biologico.

Il campione biologico è rappresentato dalle colonie pure, ottenute mediante semina su terreni agarizzati, dalle quali viene prelevata una piccola aliquota e deposta sullo spot della piastrina metallica. Dopodiché il campione viene mescolato con una soluzione di un composto organico, la matrice, costituita da molecole cristallizzate con la funzione di assorbire l'energia e distribuirla in maniera uniforme e graduale, altrimenti il laser posto all'interno dello strumento colpirebbe il campione e ne provocherebbe la distruzione. (Singhal N et al.,2015)

Ciò che si verifica è la co-cristallizzazione della matrice e del campione, il solvente organico di cui è costituita evapora, così il campione è pronto per la ionizzazione.

La piastrina metallica utilizzata in laboratorio è costituita da 3 quadranti, ognuno dei quali è costituito da 17 spot, di cui uno posto al centro dove viene posizionato il campione di controllo, costituito da un ceppo ATCC di E. coli.

Negli altri 16 spot vengono deposte le colonie pure; ogni colonia viene stemperata in 2 spot. In totale, ogni piastrina può contenere 24 colonie batteriche e/o fungine che vengono lette dallo strumento.

Quest'ultimo può contenere fino a 4 piastri per ogni ciclo di lettura.

La piastrina viene poi introdotta all'interno dello strumento.

Il tempo impiegato dai frammenti per raggiungere la membrana analizzatrice, viene definito 'tempo di volo' che varierà in base alla dimensione molecolare.

Quello che si ottiene è un profilo proteico unico per ciascun microrganismo, come se fosse un'identità digitale, che verrà confrontato con gli spettri dei profili memorizzati all'interno del software, per la determinazione delle specie.

L'accuratezza percentuale della strumentazione MALDI-TOF oscilla tra il 98% e il 99%, rendendolo un '*gold standard*' in diagnostica microbiologica clinica.

(Squitieri Damiano, 2022)

Tramite un PC di controllo del MALDI-TOF si può monitorare l'analisi in tempo reale, grazie ad una fotocamera presente all'interno dello strumento per l'acquisizione delle immagini, e una volta terminata la lettura dello spot, quest'ultimo, in relazione al risultato, acquisirà il colore verde se lo strumento è riuscito ad ottenere uno spettro ben differenziato e a identificare il microrganismo in esame, mentre acquisirà il colore rosso nel caso in cui non è stato prodotto uno spettro riconoscibile o in casi rari è possibile che lo strumento produca uno spettro ben differenziato che però non corrisponde a nessuno degli spettri presenti nel database del *software*.

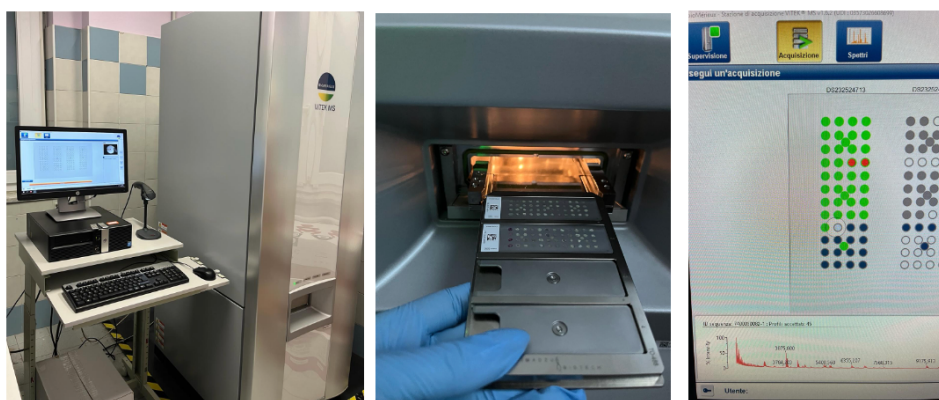


Figura 11: Strumentazione VITEK® MS (MALDI-TOF)

Terminato il ciclo di lettura, i risultati vengono letti ed interpretati mediante un software che prende il nome di MYLA, presente sul PC in laboratorio.

Il programma produce un foglio elettronico di lettura in cui per ogni spot vengono generate le seguenti informazioni:

- ID PAZIENTE
- NOME PAZIENTE
- ID CAMPIONE
- ID MICRORGANISMO
- VALORE DI CONFIDENZA
- LIVELLO DI CONFIDENZA

Il vantaggio di questa nuova strumentazione è dato da molteplici fattori:

- L'accuratezza nell'identificazione della maggior parte dei ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi, fatta eccezione per alcuni ceppi difficili e la tipizzazione e identificazione a livello di sottospecie, ha dimostrato il suo ruolo come strumento potenzialmente efficiente.
(Antony Croxatto et al.,2012).
- I tempi di preparazione dell'intera piastrina sono relativamente brevi, 10 minuti circa, da un tecnico di laboratorio che può essere istruito in soli 2 giorni.
- Tempi di analisi piuttosto rapidi, lo strumento impiega circa un'ora per analizzare un'intera piastra, qualche minuto circa per ogni spot.
- Il costo per l'analisi di un singolo campione è piuttosto basso.
L'analisi di una piastra MALDI di 96 campioni richiede 0,53 € di reagenti e materiali di consumo. (Chabriere E. et al., 2018)

Questa nuova tecnologia introdotta non è però priva di difetti:

- Il costo dell'acquisto dello strumento MALDI-TOF MS si aggira intorno ai 160.000€ per un sistema completo e la manutenzione circa 25.000 € all'anno.
- L'identificazione viene eseguita su monoculture microbiche pure e non su colture miste.
- In casi rari è possibile che lo strumento produca uno spettro ben differenziato che però non corrisponde a nessuno degli spettri presenti nel database del software.
- Mancata identificazione di specie strettamente correlate in base allo spettro proteico, come il complesso *Mycobacterium tuberculosis* e il complesso *Enterobacter cloacae*. (Godmer Alexander et al., 2021)

1.9.9 SAGGI DI SENSIBILITA' (ANTIBIOGRAMMA)

L'antibiogramma/antimicogramma è un saggio in vitro in cui i batteri/miceti vengono sottoposti a diverse concentrazioni di antibiotici/antimicotici ed in funzione del pattern di sviluppo viene prodotta una stima della probabilità di successo o insuccesso terapeutico nel paziente.

La sua esecuzione prevede l'esposizione del microrganismo in esame a una serie di definite concentrazioni di farmaci e fornisce la concentrazione minima inibente (MIC) cioè la più bassa concentrazione di antimicrobico in grado di inibire la crescita del microrganismo, che andrà interpretata secondo le linee guida internazionali adottate EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) o CLSI (*Clinical & Laboratory Standard Institute*) che permetteranno di tradurla nelle categorie elencate di seguito, mediante dei criteri interpretativi detti "*Breakpoint Clinici*".

- ❖ Sensibile
- ❖ Intermedio, ricodificato come 'Sensibile a dosaggio aumentato'
- ❖ Resistente

I metodi impiegati presso il Laboratorio di Microbiologia dell'Ospedale Civile di Alessandria sono:

1. TEST IN MICRODILUIZIONE IN BRODO CON METODICA SEMIAUTOMATICA (VITEK 2®)

Si tratta dello stesso dispositivo semiautomatico già descritto sopra per l'identificazione biochimica dei microrganismi, in questo caso si utilizza la stessa sospensione batterica/fungina standardizzata anche per saggiare la resistenza agli antibiotici/antimicotici.

Per eseguire l'antibiogramma vengono utilizzate le card AST (*Antimicrobial Susceptibility Testing*) che forniscono il rilevamento della resistenza per cocci Gram-positivi, bacilli Gram-negativi clinicamente importanti e lieviti.

Offre una serie di test antimicrobici e di resistenza per un'ampia varietà di microrganismi:

- Enterobacteriaceae
 - Non fermentanti
 - Stafilococchi
 - Enterococchi
 - Streptococchi (inclusi *S. pneumoniae*, *S. viridans* e Streptococchi beta-emolitici)
 - Lieviti
- (VITEK 2® Biomeriux)

Come per l'identificazione già descritta, i pozzetti di reazione della card vengono letti da un sistema in spettrofotometria.

Per ogni antimicrobico, il dispositivo converte i valori letti dallo spettrofotometro con quelli di MIC e li interpreta in categoria SIR (Sensibile, Intermedio, Resistente) secondo le linee guida adottate, generando un referto.



Figura 12: Card ID e AST inserite nella cassetta che verrà introdotta all'interno dello strumento VITEK 2®

2. TEST IN MICRODILUIZIONE IN BRODO MANUALE (SENSITITRE® e SUNRISE®) E SEMIAUTOMATICA (OPENTRONS)

Si prepara una sospensione di microrganismi a partire da colonie separate a concentrazione variabile (espressa in unità di misura McFarland) in relazione alle indicazioni delle linee guida utilizzate EUCAST o CLSI.

Nella maggior parte dei casi si utilizza una concentrazione pari a 0,5 McFarland.

- ◇ Un'aliquota della sospensione batterica/fungina viene inoculata in brodo da coltura specifico e viene miscelata adeguatamente.

Da tale seconda sospensione di microrganismi e brodo, vengono prelevate aliquote standard (generalmente 100µl) con una pipetta multicanale e deposte nei micropozzetti di una piastra che contiene concentrazioni crescenti di antibiotici/antimicotici liofilizzati.

Nel laboratorio di microbiologia dell'Ospedale di Alessandria, viene utilizzato il sistema 'OPENTRONS', robot automatico di pipettaggio per la deposizione delle aliquote nelle micropiastre, un modo rapido per risparmiare tempo in laboratorio consentendo anche all'operatore di dedicarsi ad altre mansioni e allo stesso tempo l'automazione contribuisce a standardizzare i processi, garantendo una maggior coerenza dei risultati, migliorando la qualità delle analisi di laboratorio. (Opentrons)

Le piastre così ricostituite, vengono poi incubate secondo le indicazioni delle linee guida utilizzate, per circa 24 ore.

- ◇ La lettura finale può essere manuale (SENSITITRE®) o automatica mediante dispositivo (SUNRISE®).
- ◇ Anche in questo caso verrà generato un referto finale secondo le categorie SIR (Sensibile, Intermedio, Resistente) per ciascun antimicrobico.

3. TEST A GRADIENTE DI CONCENTRAZIONE (E-TEST®)

E DISCO-DIFFUSIONE

- ◇ In questo caso, la stessa sospensione batterica/fungina già descritta sopra viene seminata per spatolamento (diffusione) sul terreno Mueller-Hinton Agar (MHE) o Muller Hinton Agar sangue (MHF) secondo le linee guida utilizzate;
- ◇ Una striscia (nel caso del test a gradiente di concentrazione) o un disco (nel caso della disco-diffusione), impregnata di antimicrobico viene posta sulla piastra seminata.
- ◇ La piastra viene incubata a seconda delle indicazioni date dalle linee guida per circa 24 ore
- ◇ Nel caso del test a gradiente di concentrazione viene letta la MIC in corrispondenza dell'intersezione dell'alone di inibizione con la striscia.
- ◇ Nel caso della disco-diffusione, si legge il diametro dell'alone di inibizione attorno al disco e si interpreta nelle categorie SIR (Sensibile, Intermedio, Resistente) mediante le linee guida sopradescritte.

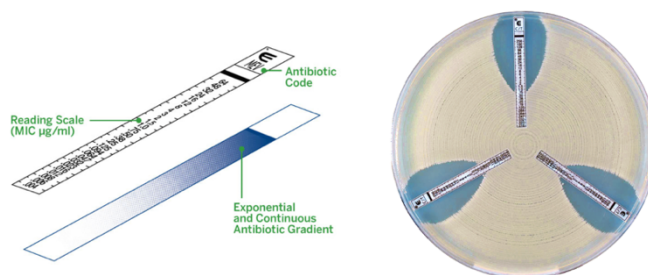


Figura 13: Striscia E-TEST per determinare la concentrazione minima inibente (MIC) di antibiotici, agenti antifungini e agenti antimicobatterici.

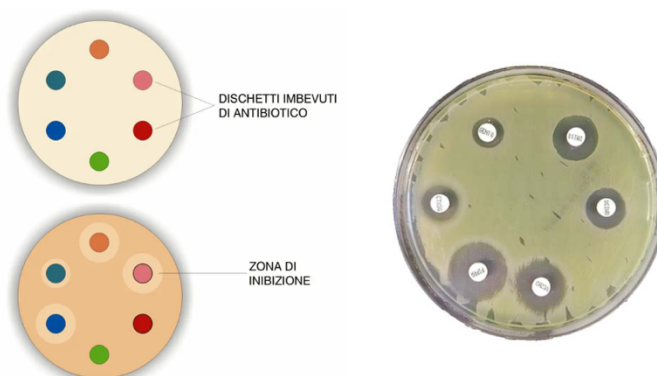


Figura 14: Dischetti imbevuti di antimicrobico per determinare la concentrazione minima inibitoria (MIC)

1.9.10 COMUNICAZIONE DEI RISULTATI

La comunicazione dei risultati parziali e definitivi riveste nel caso dell'emocoltura una particolare importanza.

In virtù della necessità di accelerare l'iter diagnostico, i reparti devono sapere che tutti i flaconi positivi vengono lavorati entro 2 ore dalla positività, compatibilmente con l'orario di apertura.

La maggior parte delle emocolture positive per microrganismi a crescita rapida vengono refertate al mattino con un referto preliminare dopo la validazione e firma da parte del dirigente, visualizzabile su *TrakCare* (il sistema di gestione degli esami e dei referti dei pazienti nella cartella clinica virtuale).

Viene generato dal microbiologo un "warning informatico" dopo l'esame microscopico, visibile sul *TrakCare* da tutti i reparti, che segnala la positività della coltura per il paziente e l'inizio del protocollo di lavorazione.

In casi particolarmente critici e selezionati, può essere richiesta dai reparti una comunicazione telefonica in caso di positività.

Il Comitato delle Infezioni Ospedaliere (CIO) riceve giornalmente la comunicazione degli *alert*, periodicamente il report sugli indicatori di qualità, annualmente il report sulle antibiotico-resistenze e coordina gli interventi di sorveglianza e controllo degli eventi epidemici.

Il gruppo aziendale di *Antimicrobial Stewardship* (branca del CIO), alla luce dei report suddetti prodotti dalla Microbiologia insieme ai dati di consumo degli antibiotici forniti dalla Farmacia, organizza attività di audit periodici con i reparti.

1.9.11 REFERTAZIONE DEI RISULTATI

Il referto preliminare e definitivo può essere visualizzato sul *TrakCare* solo dopo la validazione tecnica e la firma del dirigente microbiologo.

L'implementazione del sistema di refertazione automatizzato ha ridotto drasticamente i tempi di refertazione.

Il referto si compone di più informazioni che tengono conto delle analisi eseguite per la stesura del referto, quali esami fenotipici e genotipici di resistenza agli antibiotici.

1.9.12 INDICATORI DEL PROCESSO

◆ TEMPI DI PROCESSAZIONE

Dalle raccomandazioni APSI-SIMPIOS sull'emocoltura nel paziente settico emerge l'importanza di monitorare e registrare i tempi delle diverse fasi del processo di lavorazione delle emocolture per poter identificare eventuali punti critici, al fine di intervenire per ridurre non solo i tempi di risposta, ma anche per migliorare l'efficienza complessiva del laboratorio.

Per ottimizzare questa fase si potrebbe suddividere il processo diagnostico in fase preanalitica, analitica e post-analitica per controllare e verificare la fase in cui si possono verificare ritardi e per migliorare la TAT (*Tourn Around Time*).

Tutte queste fasi dovrebbero essere completate entro il tempo raccomandato così come indicato nella tabella sottostante:

(Rocchetti Andrea et al.,2016)

Punto	Contenuto	Note	Commento
T1	Tempo di inerzia tra prelievo ed incubazione	≤ 4 ore	La rilevazione di questo dato necessita di un'architettura informatica non ampiamente diffusa. L'importanza di un'incubazione precoce dei flaconi e la possibilità di rilevamento del tempo può essere considerata un obiettivo di miglioramento della qualità assistenziale.
T4	Tempo esecuzione e refertazione del GRAM	≤2 ore	Il tempo viene misurato dal momento del segnale strumentale di positività
T6	Identificazione isolato (MALDI-Tof, FISH, Microarray, etc)	Possibilmente in giornata, in ogni caso, ≤24 ore	Il tempo necessario per la refertazione dei test di sensibilità dipende dal tipo di isolato e dalla carica batterica e viene misurato dal momento del segnale strumentale di positività.
T6	Identificazione isolato (metodi convenzionali)	≤48 ore	Il tempo necessario per la refertazione dei test di sensibilità dipende dal tipo di isolato e dalla carica batterica e viene misurato dal momento del segnale strumentale di positività.
T7	Sensibilità isolato (metodi convenzionali)	≤48 ore	Il tempo necessario per la refertazione dei test di sensibilità dipende dal tipo di isolato e dalla carica batterica e viene misurato dal momento del segnale strumentale di positività.
T7	Sensibilità isolato mediante antibiogramma preliminare (Diretta)	≤24 ore	La necessità di eseguire un test di sensibilità agli antibiotici preliminare deve essere concordata con il clinico.

Tabella 6: Raccomandazioni APSI-SIMPIOS: Fasi della lavorazione delle emocolture e le loro tempistiche accettabili

Il TAT dal prelievo alla refertazione è compreso in generale tra uno e cinque giorni (più a lungo se si sospetta un'infezione fungina, se è richiesta un'incubazione prolungata o se gli isolati sono inviati per conferma a un laboratorio di riferimento. (Gonzales MD et al.,2020)

I tempi di processazione raccomandati dalle linee guida inglesi (*UK Standards for Microbiology Investigations.*, 2019) e adottati dal laboratorio dell'Azienda Ospedaliera sono riportati nella tabella sottostante:

INDICATORE	DESCRIZIONE	STANDARD DURATA (ore)	ALERT DURATA (ore)
T1	Intervallo prelievo ↳ Incubazione	≤ 2	≥ 4
T2	Intervallo positività ↳ Refertazione Gram	≤ 2	≥ 4
T3	Identificazione isolato con metodiche rapide	≤ 6	≥ 12
T4	Identificazione isolato con metodiche convenzionali	≤ 24	≥ 48
T5	Antibiogramma molecolare	≤ 6	≥ 12
T6	Antibiogramma convenzionale	≤ 48	≥ 72

Tabella 7: Tempi di processazione raccomandati dalle linee guida inglesi *UK Standards for Microbiology Investigation* e soglie di allarme

◆ CORRETTA ESECUZIONE DELLE EMOCOLTURE

La fase preanalitica rappresenta una delle criticità più importanti del processo, in quanto influenza i dati di sensibilità ed i tempi di rilevamento delle positività.

Il tempo preanalitico influisce sulla qualità dell'esame sia in termini di rapidità diagnostica che di *'time-to-detection'* che di *'recovery'*, e il tempo delle risposte microbiologiche sia parziali che definitive sono in grado di influenzare l'*outcome* del paziente.

Le emocolture prelevate in set singolo (solitarie o *'single'*) e le percentuali di contaminazione rappresentano dei buoni indicatori per valutare l'appropriatezza diagnostica delle sepsi, al fine di evitare falsi positivi e falsi negativi.

Dalle raccomandazioni APSI-SIMPIOS, i possibili indicatori di processo per la corretta esecuzione delle emocolture sono:

INDICATORI	VALORE E FREQUENZA DI VERIFICA
% set positivi per patogeni certi sul totale dei set raccolti	5-15%. ANNUALE
% di emocolture contaminate sul totale delle emocolture prelevate	≤ 3%. MENSILE con report a reparti con problemi
% di emocolture solitarie (set singoli) del totale delle emocolture prelevate	≤ 5%. MENSILE
% set raccolti da solo CVC senza corrispondenza di set da vena periferica.	≤ 5%. ANNUALE

Tabella 8: Raccomandazione APSI-SIMPIOS: Elenco di possibili indicatori

Tali indicatori sono calcolati da dati estratti mediante strumenti informatici che consentono di verificare periodicamente le performance di qualità preanalitica. (Rocchetti Andrea et al., 2016) (Hall KK et al., 2006) (Kirn TD et al.,2013) (Weinstein MP et al.,2011) (Baron EJ et al.,2005) (Roth A et al.,2010) (Garcia RA et al.,2015)

Spesso viene richiesto al Laboratorio di ridurre il TAT dell'emocolture introducendo nuove metodiche e modificando il proprio assetto organizzativo.

Non si conosce viceversa, quale sia la rapidità con cui il clinico traduce l'informazione diagnostica in scelta terapeutica ragionata (dopo il referto dell'esame microscopico per l'identificazione dei GRAM) o mirata (dopo identificazione definitiva e relativo antibiogramma) né quanto la scelta dell'antibiotico segua le indicazioni suggerite dalle linee guida in termini di appropriatezza prescrittiva nella sepsi severa e shock settico.

Un approccio innovativo che potrà apportare delle novità al panorama descritto sta nell'evoluzione e nello sviluppo delle nuove tecnologie che rappresenta un valore fondamentale che si integra in un laboratorio sempre più automatizzato.

1.10 VITEK® REVEAL™

Appena un anno fa, durante il 50° Congresso Nazionale AMCLI, BioMérieux ha lanciato il nuovo strumento VITEK® REVEAL™ per celebrare il suo sessantesimo anniversario che è stato progettato per ottimizzare i tempi nella gestione della terapia del paziente settico.

Si distingue per la sua ampia gamma di copertura antimicrobica contro le infezioni del flusso sanguigno causate da batteri Gram-negativi, offrendo risultati fenotipici dei test di suscettibilità agli antibiotici in una media di 4,6 ore direttamente da campioni di emocoltura positivi.

Questo contribuisce significativamente a ottimizzare la gestione delle infezioni del flusso sanguigno, consentendo una diagnosi e un trattamento più rapidi ed efficaci. (VITEK® REVEAL™ Biomeriux)

Lo strumento SPECIFIC REVEAL™ è un lettore/incubatore ad agitazione continua dei campioni, in grado di effettuare un monitoraggio ottico della variazione di sensori colorimetrici chimicamente diversi posti sul pannello di lettura, in grado di rilevare un cambiamento di colore quantitativo ai composti organici volatili (VOCs) che sono un sottoprodotto metabolico della crescita dei microrganismi.

Questo sistema è costituito dalla seguente strumentazione:



Figura 15: Strumentazione VITEK® REVEAL™

Il pannello SPECIFIC REVEAL™ AST GN01 è costituito da 96 pozzetti all'interno dei quali sono presenti diversi antibiotici a diverse concentrazioni, ed è presente un pozzetto di **controllo positivo** (pozzetto contenente MHB) e da un pozzetto di **controllo negativo** (pozzetto vuoto).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	4	8	16	4/2	8/2	16/2	4	8	0.06	0.25	0.5	1
	Ak	Ak	Ak	Aug-E	Aug-E	Aug-E	Am	Am	Cp	Cp	Cp	Cp
B	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	2	4
	Cpe	Cpe	Cpe	Cpe	Cpe	Cpe	Cpe	Cpe	Cpe	Cpe	To	To
C	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	2	4
	Caz	Caz	Caz	Caz	Caz	Caz	Caz	Caz	Caz	Caz	Gm	Gm
D	0.12	0.25	0.5	1	2	4	0.25/4	0.5/4	1/4	2/4	4/4	8/4
	Cft	Cft	Cft	Cft	Cft	Cft	Caz/CA	Caz/CA	Caz/CA	Caz/CA	Caz/CA	Caz/CA
E	1	2	4	8	16	G	C	Lvx	0.25	0.5	1	8
	Azt	Azt	Azt	Azt	Azt	Azt	Azt	Lvx	Lvx	Lvx	Cfx	Cfx
F	4/4	8/4	16/4	0.25/4	1/4	2/4	4/4	8/4	16/4	1/4	2/4	4/4
	P/T	P/T	P/T	CZA	CZA	CZA	CZA	CZA	CZA	C/T	C/T	C/T
G	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	2/8	4/8	8/8	0.5	1
	Mer	Mer	Mer	Mer	Mer	Mer	Mer	MEV	MEV	MEV	Tgc	Tgc
H	1	2	4	8	0.12	0.25	0.5	1	8	16	2/38	4/76
	Imp	Imp	Imp	Imp	Etp	Etp	Etp	Etp	Pi	Pi	T/S	T/S

BIOMÉRIEUX

Figura 16: Pannello AST GN-01

I SENSORI SPECIFIC REVEAL™ sono composti da un array di Sensori di Piccole Molecole (SMS), si tratta di indicatori colorimetrici chimici attivi incorporati in una matrice nanoporosa per rilevare l'emissione di VOCs (tra cui ammine, aldeidi, aromatici, chetoni, esteri ...)

Ogni sensore è in grado di rilevare basse concentrazioni (1 parte per miliardo) di composti organici volatili emessi dai microrganismi durante la crescita.

Ogni pozzetto è costituito da 7 sensori volatili e i VOCs producono un cambiamento nel colore dei sensori che sono controllati ogni 10 minuti con una semplice scansione. Il viraggio del colore avviene in risposta ai piccoli metaboliti emessi durante la crescita dei microrganismi, la crescita batterica e la valutazione dell'efficacia degli antibiotici sono quindi correlate con i VOCs emessi.

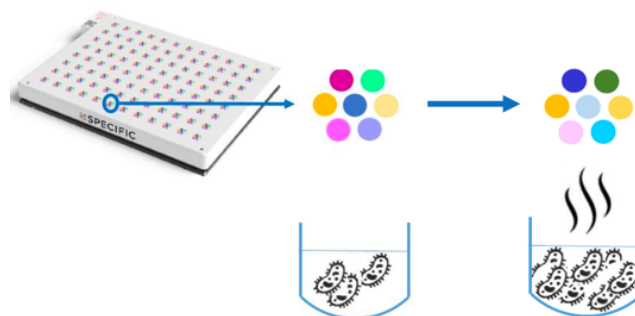


Figura 17: Sensori VITEK® REVEAL™ con uno spostamento di colore in risposta ai VOCs emessi durante la crescita dei microrganismi

Il sistema utilizza i principi della micro-brodo-diluizione con monitoraggio in tempo reale dei risultati della concentrazione minima inibente (MIC) per farmaci testati e in combinazione con l'identificazione delle specie, fornisce una determinazione Sensibile/Intermedio/Resistente (S/I/R) per la specie testata.

Nell'esempio riportato nella figura sottostante, il pozzetto di controllo positivo è raffigurato dalla curva nera, mentre i pozzetti *Ertapenem* a concentrazione 1µg e inferiore sono rappresentati dalle curve rosse, gialle e verdi, che indicano la crescita batterica.

Mentre il controllo negativo è raffigurato dalla curva grigia, ed *Ertapenem* a concentrazioni 2µg e superiori sono rappresentati dalle curve viola e blu, che indicano nessuna crescita batterica.

La divergenza della risposta del sensore nei pozzetti di crescita dal controllo negativo consente la determinazione della MIC.

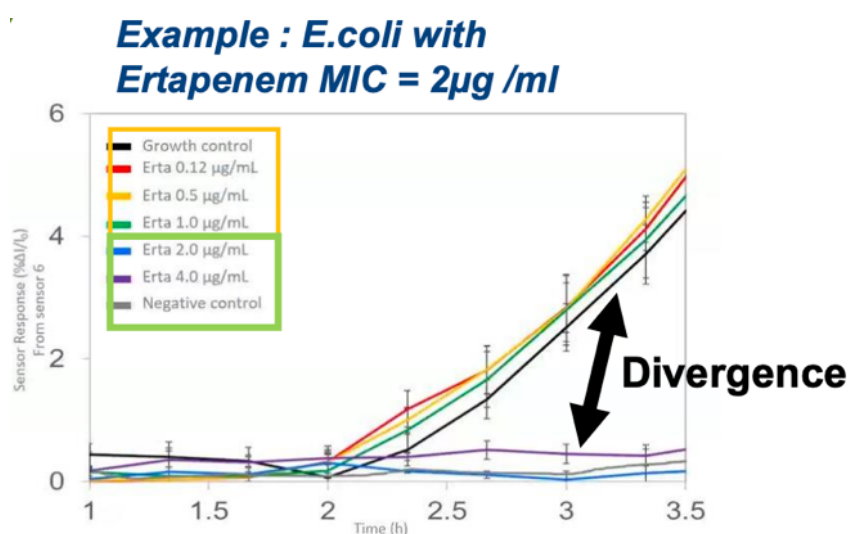


Figura 18: Esempio di Escherichia Coli per la determinazione della MIC di *Ertapenem* (Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™)

2. SCOPO DELLO STUDIO

Questo studio è stato condotto nel laboratorio di Microbiologia presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria.

All'interno dei protocolli diagnostici per le batteriemie e nel contesto della gestione del paziente settico, è stato introdotto un nuovo strumento diagnostico

VITEK® REVEAL™ su cui è stata condotta un'analisi preliminare per valutare l'efficienza dell'innovativo sistema di test rapido utilizzato per determinare la suscettibilità dei microrganismi agli antibiotici.

In questo studio sono stati confrontati tre test di sensibilità in vitro per valutarne le performance analitiche e la rapidità diagnostica, con l'obiettivo di ridurre i tempi necessari per ottenere i risultati dei test, migliorando così la tempestività delle decisioni terapeutiche nella gestione della sepsi.

L'analisi è stata condotta su:

- ✚ 60 ceppi di batteri Gram-negativi, selezionati dalla ceppoteca.

Questo sistema ha permesso di poter includere nello studio e poter esaminare un ampio spettro di ceppi batterici, includendo microrganismi con specifici meccanismi di resistenza ai carbapenemi, consentendo una valutazione completa delle prestazioni degli strumenti utilizzati.

Questi sono stati testati e confrontati simultaneamente con VITEK® REVEAL™, VITEK-2® e SUNRISE®.

- ✚ 10 emocolture positive per Gram-negativi, che sono state testate simultaneamente con VITEK® REVEAL™ e VITEK-2®.

3. MATERIALI E METODI

3.1 WORKFLOW GRAM-NEGATIVI

Per effettuare l'analisi, abbiamo selezionato 60 batteri Gram-negativi, grazie alla presenza di ceppi crio-conservati a -20°C mediante il sistema "Cryovials a biglie" nella ceppoteca, presente all'interno del laboratorio di Microbiologia, in modo da includere nello studio anche microrganismi con differenti meccanismi di resistenza ai carbapenemi.

Il Sistema *Cryovials* a biglie si è dimostrato un ottimo sistema per la raccolta e la conservazione delle colture batteriche. Le provettine utilizzate contengono all'incirca 25 biglie trattate chimicamente in una soluzione criogenica aggiunta all'interno del quale viene inoculato il campione.

Prima del congelamento, viene applicata un'etichetta identificativa del paziente, della tipologia della coltura, del microrganismo inoculato e dell'eventuale meccanismo di resistenza, se presente.



Figura 19: Sistema Cryovials a biglie per la conservazione e la raccolta delle colture batteriche

Così come riportato nella figura n sottostante, la procedura di scongelamento dei ceppi che abbiamo seguito, consiste nel:

1. Recuperare la provettina dal congelatore;
2. Prelevare una perlina con un'ansa sterile;
3. Deposare la perlina in un terreno COS (Columbia Agar + sangue di montone al 5%) ed effettuare la semina.

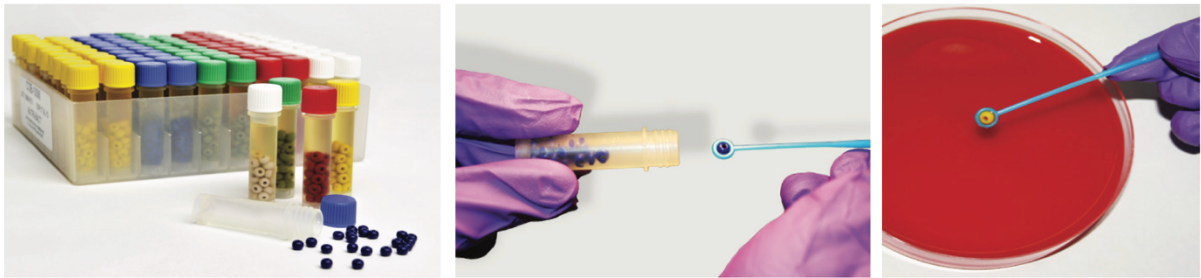


Figura 20: Procedura per l'estrazione del ceppo batterico crio-conservato

Una volta completata la procedura di scongelamento e applicata l'etichetta identificativa, contenente informazioni cruciali, il terreno è stato posto in termostato a 37°C per circa 24 ore, al fine di favorirne la crescita.

Questa metodologia assicura un ambiente ottimale per la ripresa della crescita dei ceppi dopo il periodo di conservazione a -20°C.

Dopo circa 24 ore, una volta verificata la crescita e la purezza della coltura, sono stati eseguiti Test di sensibilità in vitro:

- VITEK-2®
- SUNRISE®
- VITEK® REVEAL™

VITEK-2®

I 60 ceppi batterici Gram-negativi selezionati per l'analisi sono stati testati con il sistema VITEK-2®.

Questo sistema consente di eseguire in automazione l'identificazione e l'antibiogramma di numerose specie microbiche e risulta composto da:



Figura 21: Sistema VITEK-2®; step per la preparazione dei campioni.

Il protocollo di caricamento dei campioni prevede diversi step:

1. Nella stazione *Smart Carrier*, caricare una cassetta inserendo una provetta per l'identificazione e una provetta vuota nella posizione successiva, per la card dell'antibiogramma;
2. Preparare la sospensione microbica dispensando 3ml di soluzione salina sterile in una provetta;
Con un tampone sterile o un'ansa prelevare preferibilmente una colonia e stemperarla nella provetta con la salina in modo da rendere la sospensione omogenea;
3. Misurare con il *Densicheck* la torbidità;
Per le identificazioni e gli antibiogrammi si deve utilizzare una torbidità McFarland pari da 0.5 a 0.63 per batteri Gram-positivi e batteri Gram-negativi;
4. Inserire la cassetta preparata all'interno dello strumento VITEK-2® per il processamento;
5. Controllare sul computer con il programma di gestione Vitek-2 *System Web* lo stato di incubazione dei campioni.

I 60 ceppi di batteri Gram-negativi sono stati testati mediante l'utilizzo della Card VITEK-2® AST-N397.

La Card AST rappresenta un sistema ottimale per l'esecuzione di test di sensibilità antimicrobica di routine. Ciascuna Card AST contiene antibiotici selezionati in varie concentrazioni, essiccati insieme a un terreno di coltura microbiologica.

Costituisce essenzialmente una versione miniaturizzata e automatizzata, costituita da un pozzetto di controllo, contenente solo terreno di coltura microbiologico.

I restanti micropozzetti contengono quantità predefinite di antibiotici specifici combinati con il terreno di coltura.

RISULTATI DEL CAMPIONE

- Stato pannello AST
- TTR: *Time to Result* alla fine dell'analisi.
- MIC e interpretazioni Sensibili/Intermedio/Resistente per ogni antibiotico testato.
- Segnalazione di eventuali *Alert*.
- Conclusioni AES (*Advanced Expert System*): *software* che fornisce informazioni sull'isolato clinic testato, determinando il livello di coerenza dei risultati AST.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Completato il tempo di incubazione, lo strumento fornisce i risultati dell'identificazione e dell'antibiogramma, in base alla card VITEK-2® utilizzata.

Insieme alla MIC, viene refertata una categoria di interpretazione definite da EUCAST o CLSI:

- ❖ R: Resistente
- ❖ S: Sensibile
- ❖ I: Sensibile, Sensibile ad aumentata esposizione (Intermedio)
- ❖ Pos: Test ESBL positivo
- ❖ Neg: Test ESBL negativo
- ❖ Ind: Indeterminato

(Istruzione operativa- Gestione strumento Vitek-2)

SUNRISE®

Questo sistema è considerato il metodo “*gold standard*” tra i test di sensibilità in vitro basati sulla tecnica della microdiluizione in brodo, per l'interpretazione dei risultati dei test di sensibilità agli antibiotici.

Si basa sui risultati reali della concentrazione inibente minima (MIC), che è la concentrazione più bassa di un antibiotico che impedisce la crescita di un batterio, e tiene conto delle raccomandazioni e dei criteri di interpretazione dei *breakpoint* stabiliti da organismi regolatori come la FDA (*Food and Drug Administration*), EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Il protocollo prevede la preparazione di una serie di diluizioni di antibiotico in brodo nutritivo contenente il batterio da testare.

Il test di sensibilità utilizza le piastre *Micronaut* e si basa sulla reidratazione degli antibiotici mediante l'aggiunta di una sospensione batterica standardizzata.

Dopo l'incubazione per 18-24h a 35-37 °C il risultato viene letto con il lettore di piastre SUNRISE® e valutato con il *software Micronaut*.

Il protocollo per la preparazione del campione relativo ai Gram-negativi prevede:

- ❖ Preparare una soluzione con 1.5ml di soluzione salina NaCl 0.9%
- ❖ Prelevare diverse colonie singole di una coltura pura di massimo 24 ore dall'Agar Sangue (COS) e omogeneizzarle nella soluzione salina fino a raggiungere la torbidità di 0.5 *McFarland*, misurata con *Densicheck*.
- ❖ Per i batteri Gram-negativi, viene trasferito 50µl della sospensione batterica in 11.5ml di brodo *Mueller Hinton* e omogeneizzare il tutto.

Per la fase di inoculazione del campione nelle piastre, abbiamo utilizzato questo sistema in combinazione con l'apparecchiatura automatica OPENTRONS.

Si tratta di un sistema automatizzato progettato per esecuzione la tecnica di pipettaggio, consentendo l'inoculazione del campione nelle piastre in modo preciso ed efficiente, riducendo al minimo la manipolazione dei campioni da parte dell'operatore.

Le piastre sono state disposte nei pannelli all'interno dello strumento che termina l'inoculazione di 4 piastre, dispensando 100 μ l per pozzetto, in circa 6 minuti.

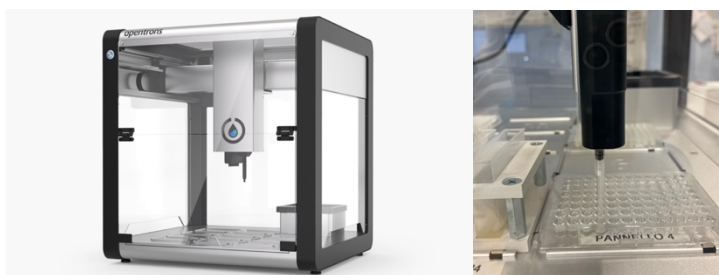


Figura 22: Sistema automatizzato OPENTRONS e piastre Micronaut-S

- ◇ Dopo l'inoculazione coprire la piastra del test con la pellicola sigillante non perforata e porre in incubatore a 35-37 °C per 18-24 ore;
- ◇ La lettura delle piastre viene effettuata dopo la rimozione della pellicola sigillante e la piastra viene collocata all'interno dello strumento SUNRISE®.
- ◇ La valutazione viene effettuata mediante la lettura fotometrica e la plausibilità viene verificata con il software Micronaut, dal quale è possibile stampare il referto finale.

Sotto i risultati del test possono apparire osservazioni che indicano una crescita insufficiente o possibili fenotipi di resistenza, batteri notificabili.

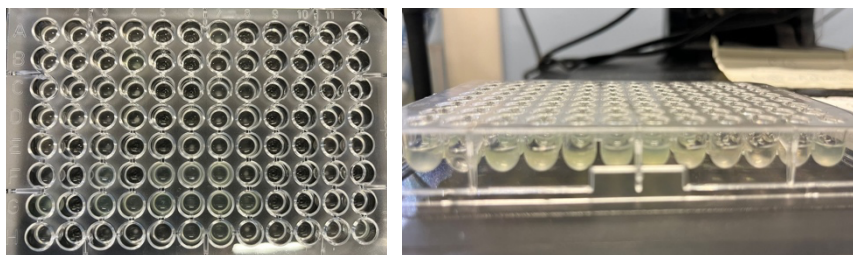


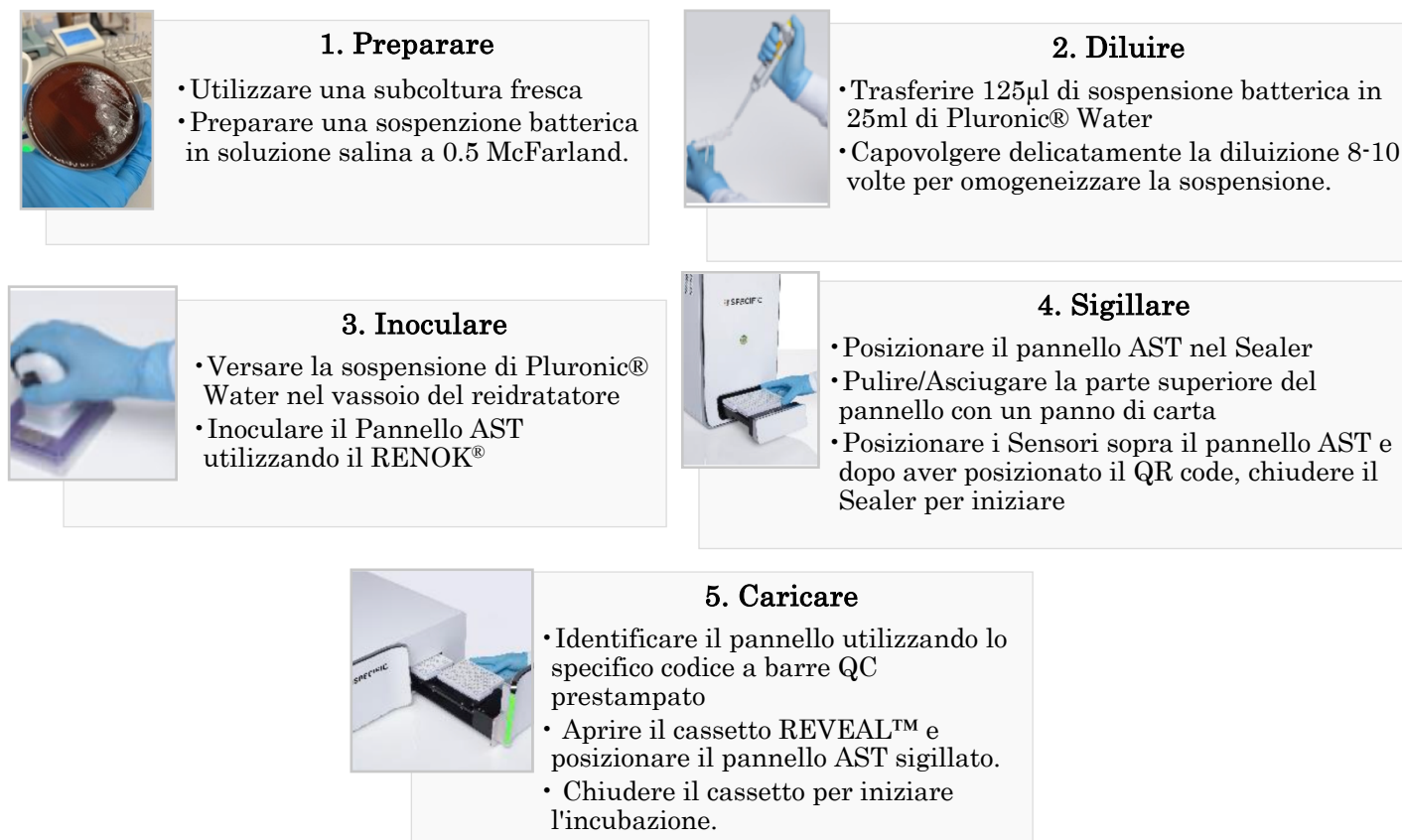
Figura 23: Piastra Micronauts dopo l'incubazione a 35-37 °C per 18-24 ore e dopo la rimozione della pellicola sigillante, pronte per essere collocata all'interno dello strumento SUNRISE®



Figura 24: Lettore di piastre SUNRISE®

VITEK® REVEAL™

Per l'analisi dei 60 ceppi batterici Gram-negativi, abbiamo seguito il Workflow dei Controlli di Qualità (QC) previsti per lo strumento che consiste in 5 step:



Una volta caricato il pannello all'interno dello strumento tramite il Software di Gestione è possibile monitorare i risultati in tempo reale e questo risulta essere estremamente vantaggioso rispetto ai sistemi che forniscono i risultati solo al termine dell'intera lettura.

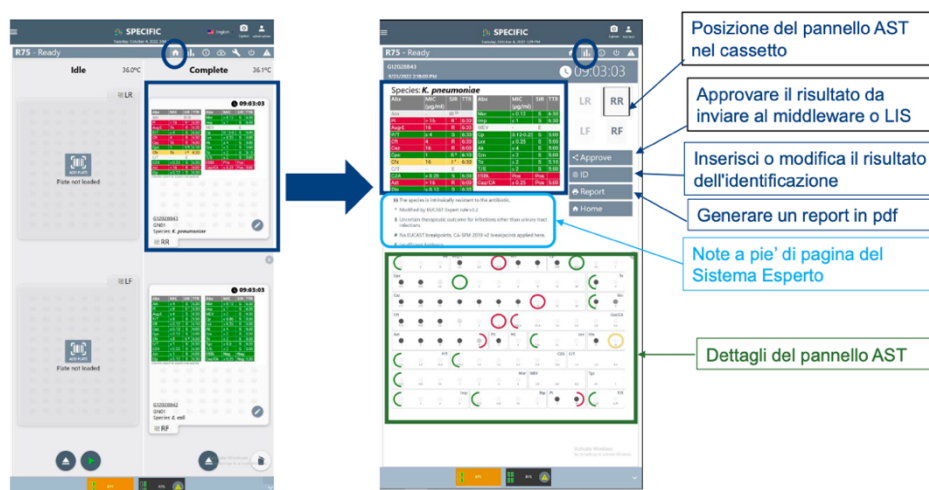


Figura 25: Software di Gestione VITEK® REVEAL™

RISULTATI DEL CAMPIONE

- Stato pannello AST
- Tempo massimo di incubazione del pannello AST
- TTR: *Time to Result* per ogni antibiotico
- MIC e interpretazioni visualizzati con codice colore
- I risultati rimangono nella schermata iniziale fino a quando i pannelli AST non vengono rimossi dallo strumento

L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

In base alla MIC, viene refertata una categoria di interpretazione definite da EUCAST o da CLSI:

- ❖ R: Resistente
- ❖ S: Sensibile
- ❖ I: Sensibile, Sensibile ad aumentata esposizione (Intermedio)
- ❖ E: Insufficiente Evidenza
- ❖ R/I = Resistente o Intermedio (*breakpoint* R non coperti dal pannello)
- ❖ IR: Resistenza Intrinseca
- ❖ Pos: Test ESBL positivo
- ❖ Neg: Test ESBL negativo
- ❖ Ind: Indeterminato

Abx	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	SIR	TTR
Am	-	IR	08
Pi	> 16	R/I	3:10
P/T	> 16	R/I	3:10
Cft	4	R	6:30
Caz	16	R	6:00
Cpe	1	S [†]	6:10
Cfx	16	I*	6:30
C/T	-	E	
CZA	≤ 0.25	S	6:30
ESBL	Indeter	Ind	
Caz/CA	> 8	Ind	3:40

Figura 26: Interpretazione dei risultati delle MIC rilevate, visualizzati con codice colore

(Biomერიux-Customer Training VITEK® REVEAL™)

3.2 WORKFLOW EMOCOLTURE

L'analisi è stata condotta direttamente su 10 emocolture preliminarmente risultate positive all'esame di Gram per bacilli Gram-negativi, che sono state testate simultaneamente con:

- VITEK® REVEAL™
- VITEK-2®

VITEK® REVEAL™

La Panoramica del flusso di lavoro direttamente da emocolture positive prevede:

- Tempo massimo dalla positivizzazione del flacone: 16h
- Tempo dalla preparazione alla sigillatura: 15 minuti
- Tempo sigillatura: 1 minuto
- Tempo dalla sigillatura al caricamento: meno possibile



1. Estrarre

- Vortexare il flacone dell'emocoltura Positiva (EP)
- Disinfettare con Clorexidina il tappo del flacone
- Utilizzare connettore-siringa per trasferire 3-5 ml dell'EP in una provetta conica (tipo falcon)



2. Diluire

- Vortexare la provetta conica con EP.
- Trasferire 125µl di sospensione batterica in 25ml di Pluronic® Water
- Capovolgere delicatamente la diluizione 8-10 volte per omogeneizzare la sospensione.



3. Inoculare

- Versare la sospensione di Pluronic® Water nel vassoio del reidratatore
- Inoculare il Pannello AST utilizzando il RENOK®



4. Sigillare

- Posizionare il pannello AST nel Sealer
- Pulire/Asciugare la parte superiore del pannello con un panno di carta
- Posizionare i Sensori sopra il pannello AST e dopo aver posizionato il QR code, chiudere il Sealer per iniziare



5. Caricare

- Identificare il pannello utilizzando lo specifico codice a barre QC prestampato
- Aprire il cassetto REVEAL™ e posizionare il pannello AST sigillato.
- Chiudere il cassetto per iniziare l'incubazione.

Le fasi successive al caricamento del pannello all'interno dello strumento seguono le stesse fasi descritte nel protocollo microrganismi Gram-negativi.

(Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™)

VITEK-2®

Il protocollo operativo del VITEK-2® non prevede l'esecuzione diretta del Test di sensibilità in vitro (AST) dal flacone di emocoltura positivo.

Il *Workflow* che abbiamo seguito è descritto di seguito:

- Test immunocromatografici: Dal flacone di emocoltura positivo abbiamo seguito il protocollo per eseguire i Test RESIST-BC e RESIST O.K.N.V.I, si tratta di test immunocromatografici a flusso laterale di resistenza antimicrobica, autorizzati come dispositivi diagnostici in vitro (IVD) per rilevare le infezioni del sangue causate da bacilli Gram-negativi produttori di carbapenemasi (C-PGNB) direttamente da flaconi di colture ematiche positive.

I kit di reagenti sono progettati per individuare i meccanismi di resistenza carbapenemasi OXA-48-like, KPC, NDM, VIM, IMP.

I due Test sono stati eseguiti in successione:

Il Protocollo del RESIST-BC è stato eseguito per la preparazione delle colture ematiche e comprende diverse fasi illustrate nella figura sottostante.

Al termine della procedura, si ottiene un pellet.

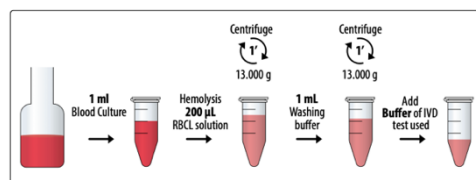


Figura 27: procedura di preparazione test RESIST-BC per la preparazione dei campioni da emocoltura positiva

Il Protocollo del RESIST O.K.N.V.I, è stato eseguito sul pellet ottenuto, dopo l'aggiunta di 11 gocce del tampone LY-D e dopo aver omogeneizzato la preparazione, viene trasferito 100µL di campione diluito nel pozzetto.

Il tempo massimo di attesa è di 15 minuti per consentire la reazione e il risultato.

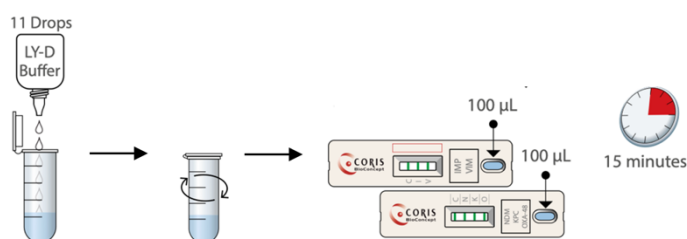


Figura 28: fasi del protocollo seguito per il test RESIST O.K.N.V.I

- Abbiamo seminato il flacone di emocoltura positivo sul terreno Columbia Agar + sangue di montone al 5% (COS) e che è stata posta in incubatore.

(Coris BioConcept- RESIST BC)

(Coris BioConcept- RESIST-5 O.K.N.V.I)

Dopo circa 24 ore, dopo averne appurato la crescita e la purezza della coltura, è stata eseguito il protocollo MS MALDI-TOF come descritto nel punto 1.9.8 per l'identificazione dell'isolato; mentre il test di sensibilità in vitro VITEK-2® è stato eseguito utilizzando la card 397, seguendo la stessa procedura descritta nel protocollo ceppi di batteri Gram-negativi.

4. RISULTATI

WORKFLOW GRAM-NEGATIVI

Una prima analisi è stata eseguita su un campione di 60 ceppi di batteri Gram-negativi, che comprendeva sia batteri con meccanismi di resistenza antimicrobica sia batteri senza tali meccanismi, come riportato nella Tabella (9) sottostante.

Questo approccio è stato adottato per garantire la completezza dell'analisi.

MICROORGANISMO	ID MECCANISMO MOLECOLARE RILEVATO							TOTALE
	NON RILEVATO	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM+KPC	MDR	
Klebsiella pneumoniae	3	8	9	1	1	1		23
Klebsiella oxytoca	2	2		2				6
Klebsiella aerogenes	4							4
Escherichia coli	4	1	3		1			9
Pseudomonas aeruginosa	1		1	6			1	9
Proteus mirabilis	3						1	4
Acinetobacter baumannii	1						4	5
TOTALE	18	11	13	9	2	1	6	60

Tabella 9: Microrganismi Gram-negativi inclusi nello studio e i rispettivi meccanismi di resistenza antimicrobica rilevati

Abbiamo comparato le interpretazioni delle Concentrazioni Minime Inibitorie (MIC) rilevate dai tre strumenti utilizzati nell'analisi: Sunrise®, Vitek-2® e Vitek®Reveal™. Le interpretazioni sono state ottenute per ciascun antimicrobico testato, e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella (10) e nel grafico corrispondente.

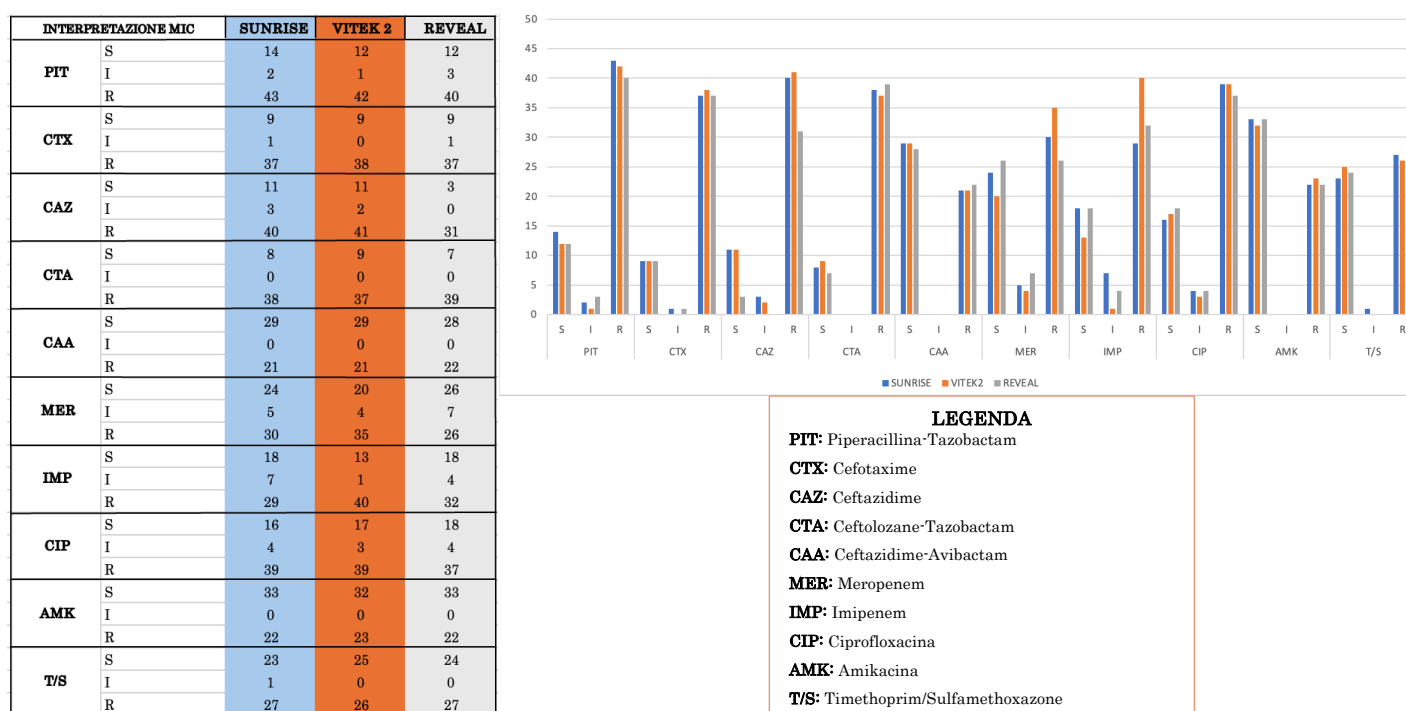


Tabella 10: Interpretazione S/I/R ottenute dai tre test e grafico corrispondente

Per classificare le interpretazioni errate dei risultati dei test di suscettibilità, in linea con le definizioni di consenso globale, abbiamo categorizzato gli errori dei sistemi Vitek-2® e Vitek® Reveal™, adottando come metodo di riferimento standard il test di sensibilità in vitro 'Sunrise®' come:

- **VERY MAJOR ERROR**, si tratta di errori di notevole importanza e si verificano quando il risultato della categoria di riferimento è 'Resistente' e il risultato del nuovo dispositivo è 'Sensibile';
- **MAJOR ERROR**, si verificano quando il risultato della categoria di riferimento è 'Sensibile' e il risultato del nuovo dispositivo è 'Resistente';
- **MINOR ERROR**, quando il risultato della categoria di riferimento è 'Resistente' o 'Sensibile' e il risultato del nuovo dispositivo è 'Intermedio'; oppure il risultato di riferimento è 'Intermedio' e il risultato del nuovo dispositivo è 'Resistente' o 'Sensibile'.

I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella (11).

		Very major error	Major error	Minor error
PIT	Vitek-2			1
	Reveal			3
CTX	Vitek-2			1
	Reveal			
CAZ	Vitek-2			3
	Reveal			5
CTA	Vitek-2	1		
	Reveal		1	
CAA	Vitek-2	1	1	
	Reveal		1	
MER	Vitek-2		1	9
	Reveal	1	1	6
IMP	Vitek-2		3	8
	Reveal		1	7
CIP	Vitek-2			3
	Reveal	1		4
AMK	Vitek-2	2	3	
	Reveal	4	4	
T/S	Vitek-2	3	2	1
	Reveal	2	2	1
TOTALE VITEK-2		7	10	26
TOTALE REVEAL		8	10	26

LEGENDA
PIT: Piperacillina-Tazobactam
CTX: Cefotaxime
CAZ: Ceftazidime
CTA: Ceftolozane-Tazobactam
CAA: Ceftazidime-Avibactam
MER: Meropenem
IMP: Imipenem
CIP: Ciprofloxacina
AMK: Amikacina
T/S: Timethoprim/Sulfamethoxazone

Tabella 11: Sono riportati i valori di Very major error, Major error e Minor error dei sistemi Vitek-2® e Vitek® Reveal™ confrontati con il sistema Sunrise® che funge metodo di riferimento

Abbiamo considerato l'indice Kappa di Cohen, un coefficiente statistico che misura il grado di accuratezza e affidabilità di una classificazione statistica.

Esistono diversi "gradi di concordanza" associati ai valori di Kappa:

- se k assume valori inferiori a 0, allora non c'è concordanza;
- se k assume valori compresi tra 0-0.4, allora la concordanza è scarsa;
- se k assume valori compresi tra 0.4-0.6, allora la concordanza è discreta;
- se k assume valori compresi tra 0.6-0.8, la concordanza è buona;
- se k assume valori compresi tra 0.8-1, la concordanza è ottima.

La valutazione dell'affidabilità della classificazione statistica basata sui risultati ottenuti è riportata nella Tabella (12) e si evince una buona concordanza di entrambi i test di suscettibilità in riferimento al metodo 'gold standard' Sunrise®.

Tra il Vitek-2® e Vitek® Reveal™, il tasso più elevato di Very Major Error riportato dal Vitek® Reveal™ è stato riscontrato dall'Amikacina.

IL *Category Agreement* (CA) valuta la concordanza dei risultati interpretativi (S/I/R) tra un nuovo dispositivo sottovalutazione e un metodo di riferimento standard, utilizzando l'interpretazione della FDA (*Food and Drug Administration*) e l'accordo di categoria si verifica quando la percentuale è maggiore dell'89,9%.

Dai risultati ottenuti, Vitek-2® e Vitek® Reveal™ hanno un accordo di categoria rispettivamente del 91,89% e 91,70%, questo indica una forte concordanza con il metodo di riferimento Sunrise®, confermando l'affidabilità dei test in questione.

I risultati ottenuti sono riportati nella Tabella (12) sottostante:

	VITEK2	REVEAL
K-Choen	0,935	0,931
Very major error	2,16%	2,47%
Major error	5,46%	5,46%
Minor error	4,91%	4,91%
Category agreement	91,89%	91,70%

Tabella 12: Risultati osservati quali l'Indice di K-Choen, le percentuali di Very Major error, Major error e Minor error, e l'Accordo di categoria per i test Vitek-2® e Vitek® Reveal™ rispetto al metodo di riferimento Sunrise®

L'analisi condotta sui 60 ceppi di batteri Gram-negativi ha messo in evidenza un'importante discrepanza nei dati di sensibilità agli antibiotici.

Come evidenziato nella Tabella (13), un caso specifico dei 42 ceppi di *Enterobacterales MDR* (*Multi drug resistance*), è stato oggetto di particolare attenzione poiché ha mostrato una significativa discrepanza rispetto ai dati standard di sensibilità riportati da EUCAST.

Nel contesto dei microrganismi con un meccanismo molecolare noto di resistenza attraverso la produzione di carbapenemasi, ci si aspetta che le Concentrazioni Minime Inibitorie (MIC) del Meropenem assumano un valore maggiore rispetto alla soglia di 0.125mg/L, in riferimento ai dati forniti da EUCAST.

Tuttavia, l'analisi comparativa dei dati ottenuti dai tre test di sensibilità ha rivelato un caso in cui i valori di MIC del Meropenem sono risultati essere inferiori al valore soglia.

In un altro caso isolato dei 42 ceppi di *Enterobacterales*, è stata osservata una discrepanza nelle concentrazioni minime inibitorie (MIC).

Come riportato nella Tabella (13), è importante notare che sia il sistema Sunrise®, che Vitek-2® hanno rilevato un aumento delle MIC del Meropenem, il che è coerente con l'aspettativa in quanto si tratta di un microrganismo che presenta un meccanismo di resistenza di tipo VIM.

D'altra parte, il Vitek® Reveal™ ha registrato invece la MIC del Meropenem inferiore a 0.12mg/L, interpretando di conseguenza il microrganismo come sensibile.

Questa discrepanza spiega i dati di "Very Major Error" rilevati con il sistema Vitek® Reveal™, in quanto i dati di sensibilità ottenuti sono in contrasto con quelli di Sunrise® e Vitek-2®, che indicano il microrganismo come Resistente.

ID MICRORGANISMO	ID MECCANISMO MOLECOLARE RILEVATO	MEROPENEM (MIC) mg/L		
		SUNRISE (S/I/R)	VITEK-2 (S/I/R)	REVEAL (S/I/R)
Proteus Mirabilis	MDR	S ≤ 0.125	S ≤ 0.25	S ≤ 0.12
Klebsiella Oxytoca	VIM	R 1	R 8	S ≤ 0.12

Tabella 13: Discrepanze riscontrate nell'osservazione delle MIC del Meropenem dei batteri CRE, ottenute dai tre test a confronto, non in linea con i dati forniti da Eucast

WORKFLOW EMOCOLTURE

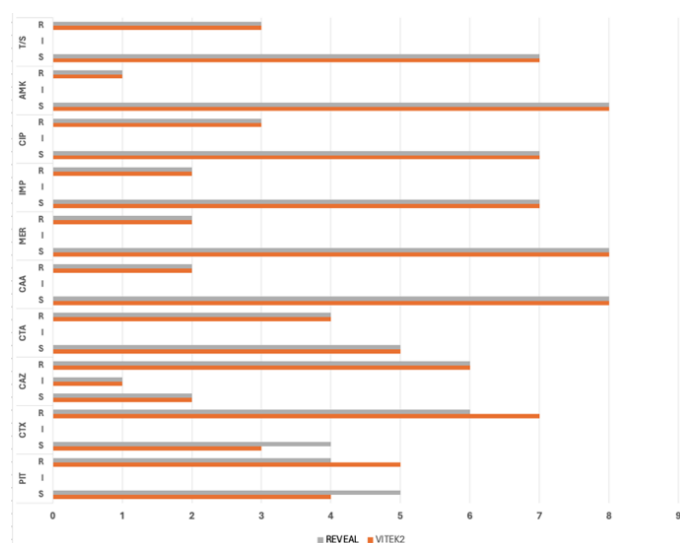
L'analisi è stata eseguita su un totale di 10 emocolture positive analizzate durante lo studio e la Tabella seguente riporta sia l'identificazione del microrganismo che l'eventuale meccanismo molecolare di resistenza rilevato.

MICROORGANISMO	ID MECCANISMO MOLECOLARE RILEVATO						TOTALE
	NON RILEVATO	KPC	NDM	VIM	OXA-48	NDM+KPC	
Klebsiella pneumoniae			2				2
Klebsiella oxytoca	2						2
Klebsiella aerogenes	2						2
Escherichia coli	3						3
Proteus mirabilis	1						1
TOTALE	8		2				10

Tabella 14: Identificazione dei Microrganismi Gram-negativi isolati dai flaconi di emocolture positive e i rispettivi meccanismi di resistenza rilevati

I risultati ottenuti dalle interpretazioni delle Concentrazioni Minime Inibitorie (MIC) ottenute dai due test di sensibilità oggetto dello studio, Vitek-2® e Vitek® Reveal™ per ciascun antimicrobico testato sono riportati nella Tabella (15) e nel grafico corrispondente che fornisce una chiara visualizzazione dei risultati ottenuti.

INTERPRETAZIONE MIC		VITEK2	REVEAL
PIT	S	4	5
	I	0	0
	R	5	4
CTX	S	3	4
	I	0	0
	R	7	6
CAZ	S	2	2
	I	1	1
	R	6	6
CTA	S	5	5
	I	0	0
	R	4	4
CAA	S	8	8
	I	0	0
	R	2	2
MER	S	8	8
	I	0	0
	R	2	2
IMP	S	7	7
	I	0	0
	R	2	2
CIP	S	7	7
	I	0	0
	R	3	3
AMK	S	8	8
	I	0	0
	R	1	1
T/S	S	7	7
	I	0	0
	R	3	3



LEGENDA

- PIT:** Piperacillina-Tazobactam
- CTX:** Cefotaxime
- CAZ:** Ceftazidime
- CTA:** Ceftolozane-Tazobactam
- CAA:** Ceftazidime-Avibactam
- MER:** Meropenem
- IMP:** Imipenem
- CIP:** Ciprofloxacina
- AMK:** Amikacina
- T/S:** Timethoprim/Sulfamethoxazone

Tabella 15: Interpretazione S/I/R ottenute dai due test e grafico corrispondente

Nella Tabella (16) è possibile osservare i valori di Very Major error, Major error e Minor error, riscontrati nel Vitek®Reveal™, ponendo come riferimento il Vitek-2®, utilizzando la stessa classificazione illustrata nei risultati del workflow per i batteri Gram-negativi.

		Very major error	Major error	Minor error
PIT	Reveal	1		
CTX	Reveal	1		
CAZ	Reveal			
CTA	Reveal			
CAA	Reveal			
MER	Reveal			
IMP	Reveal			
CIP	Reveal			
AMK	Reveal			
T/S	Reveal			
	TOTALE REVEAL	2	0	0

LEGENDA
PIT: Piperacillina-Tazobactam
CTX: Cefotaxime
CAZ: Ceftazidime
CTA: Ceftolozane-Tazobactam
CAA: Ceftazidime-Avibactam
MER: Meropenem
IMP: Imipenem
CIP: Ciprofloxacina
AMK: Amikacina
T/S: Timethoprim/Sulfamethoxazone

Tabella 16: Valori di Very major error, Major error e Minor error osservati dal test Vitek® Reveal™ in riferimento al Vitek-2®

Per valutare la concordanza tra i due test di sensibilità in vitro, Vitek-2® e Vitek® Reveal™ nell'analisi delle emocolture, abbiamo utilizzato l'indice di K-Cohen, considerando il Vitek-2® come metodo di riferimento standard per questa valutazione. Il valore Kappa di Cohen ottenuto, è stato interpretato utilizzando la scala dei gradi di concordanza che ho precedentemente illustrato nel workflow per i batteri Gram-negativi.

K-Choen	REVEAL
	0,956
Very major error	5,70%
Major error	0,00%
Minor error	0,00%
Category agreement	97,89%

Tabella 17: Risultati osservati quali l'Indice di K-Choen, le percentuali di Very Major error, Major error e Minor error, e l'Accordo di categoria per il test Vitek®Reveal™ rispetto al metodo di riferimento Vitek-2®

5. DISCUSSIONE

Dall'analisi condotta sui due diversi protocolli sono emersi dati di notevole interesse. Nella fase iniziale dello studio, abbiamo confrontato i test di sensibilità in vitro di Sunrise[®], Vitek-2[®] e Vitek[®]Reveal[™] utilizzando 60 ceppi di batteri Gram-negativi, di cui 42 presentavano un meccanismo di resistenza come produttori di carbapenemasi.

Dai risultati ottenuti è emerso che tutti e tre i sistemi hanno dimostrato buone performance analitiche, senza particolari differenze nell'interpretazione delle Concentrazioni Minime Inibenti (MIC) per ciascun antimicrobico testato.

Questa osservazione è stata particolarmente significativa considerando che sono stati presi in considerazione i dieci antimicrobici in comune con tutti e tre i test di sensibilità in vitro.

Utilizzando il Sunrise[®], come metodo standard di riferimento, abbiamo calcolato l'indice di Very major error, Major error e Minor error per classificare le interpretazioni errate dei risultati dei test di suscettibilità.

Le percentuali tra il Vitek-2[®] e Vitek[®]Reveal[™] sono risultate essere molto simili, con una differenza minima tra di loro.

Tuttavia, è emerso che il Vitek[®]Reveal[™] ha mostrato un tasso di Very Major Error leggermente maggiore rispetto al Vitek-2[®], con l'Amikacina che si è rivelata essere la molecola con il tasso più alto di Very major error.

Considerando l'indice Kappa di Cohen, un coefficiente statistico utilizzato per valutare il grado di concordanza tra due classificazioni statistiche e la loro affidabilità rispetto a uno standard di riferimento, sia il Vitek-2[®] che il Vitek[®]Reveal[™] hanno dimostrato un'ottima concordanza.

I valori ottenuti sono stati 0.935 per il Vitek-2[®] e 0.931 per il Vitek[®]Reveal[™].

Questi valori rientrano nel range dei valori di Kappa che vanno da 0.8 a 1, indicando un grado di concordanza ottimo tra i risultati ottenuti dai due test e lo standard di riferimento.

Questa elevata concordanza suggerisce che sia il Vitek-2® che il Vitek®Reveal™ sono affidabili e precisi nel fornire interpretazioni dei test di suscettibilità agli antimicrobici.

La concordanza dei test valutati, è stata confermata anche tramite il *Category Agreement*, un indice di accordo di categoria dei test valutati, secondo cui i test mostrano una buona concordanza quando la percentuale è maggiore del 89,9%, e i risultati ottenuti nel nostro studio superano questo valore.

Nella comune pratica di laboratorio, è importante sospettare della produzione di carbapenemasi quando si osserva che tutti gli isolati di CRE (*Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi) presentano Concentrazioni Minime Inibenti (MIC) del *Meropenem* superiori ai rispettivi valori di *cut-off* epidemiologici (*E-COFF*) dei ceppi selvaggi o *wild type* della specie corrispondente.

Le carbapenemasi sono considerate di elevata importanza epidemiologica, specialmente quando conferiscono una ridotta sensibilità ai carbapenemi, come evidenziato da MIC superiori ai valori di cut-off epidemiologico (ECOFF) definiti da EUCAST, così come riportato nella Tabella 18 sottorappresentata. (EUCAST.,2017)

Carbapenem	MIC (mg/L)	
	S/I breakpoint	Screening cut-off
Meropenem ¹	≤2	>0.125

Tabella 18: *Breakpoint* clinici e valori cut-off di screening per le Enterobacteriaceae produttrici di carbapenemasi (secondo la metodologia EUCAST)

Nella Tabella (13), nel caso specifico del *Proteus*, un ceppo MDR (*Multidrug-Resistant*), tutti e tre i test hanno fallito nella loro performance.

Poiché si tratta di un ceppo MDR, ci si aspetterebbe che le Concentrazioni Minime Inibenti (MIC) del Meropenem fossero in regime di resistenza.

Tuttavia, tutti e tre i test hanno classificato erroneamente il ceppo come sensibile al Meropenem.

In questo caso, tutti e tre i test hanno compiuto "Very major error", un errore di notevole importanza che consiste nel classificare come sensibile un ceppo che in realtà è resistente. Questo fenomeno è noto come 'falsa suscettibilità' ed è particolarmente preoccupante quando si tratta di ceppi MDR, poiché può portare a errori nella selezione del trattamento antibiotico e alla diffusione di ceppi resistenti.

Mentre, in un altro caso isolato, riportato nella Tabella (13), sia il Sunrise® che il Vitek-2® hanno rilevato la MIC del *Meropenem* con un valore superiore a 0.125mg/L per cui l'interpretazione risulta essere R (Resistente), coerentemente con il fatto che si tratta di ceppi CRE (*Enterobacterlas* produttori di carbapenemasi), in linea con i dati di EUCAST.

Tuttavia, il Vitek®Reveal™ ha indicato erroneamente questo ceppo come S (Sensibile) e ha rilevato una MIC del Meropenem inferiore a 0.12mg/L, mentre secondo i dati forniti da EUCAST e come indicato nella tabella precedente, il valore di *cut-off* dovrebbe essere maggiore di 0.125 mg/L.

In queste situazioni, se non conoscessimo l'identificazione e il meccanismo di resistenza del microrganismo in analisi e se non avessimo i riferimenti del Sunrise®, e Vitek-2®, basandoci solo sul risultato del Vitek®Reveal™, potremmo non sospettare della presenza di un microrganismo produttore di carbapenemasi.

Questa discrepanza è in linea con i "Very major error" riscontrati dal Vitek®Reveal™. Questi risultati sottolineano l'importanza di considerare attentamente i risultati dell'antibiogramma insieme alle informazioni cliniche e microbiologiche disponibili.

Nella seconda fase dello studio, condotta sulle 10 emocolture risultate positive all'esame dei Gram per batteri Gram-negativi, è stata riscontrata la presenza di soli 2 meccanismi di resistenza NDM su 10 emocolture testate.

Nell'analisi dell'interpretazione delle Concentrazioni Minime Inibenti (MIC) per ogni antibiotico testato, è stato utilizzato il Vitek®Reveal™ con il Vitek-2® come riferimento e i dati sono riportati nella Tabella (15).

In questo caso abbiamo riscontrato un tasso di *Very Major Error* (Tabella 16) per due molecole specifiche: il *Piperacillin-Tazobactam* (PIT) e il *Cefotaxime* (CTX).

Per valutare il grado di concordanza tra i due test in confronto, sono stati calcolati l'indice di K-Choen e il *Category Agreement* e i risultati ottenuti sono riportati nella Tabella (17).

L'indice di K-Choen, ottenuto dal Vitek®Reveal™ ponendo come metodo di riferimento il Vitek-2® delle 10 emocolture testate, è di 0,956 che rientra nel range dei valori Kappa che vanno da 0.8 a 1, indicando un ottimo grado di concordanza dei risultati ottenuti dal Vitek®Reveal™ e lo standard di riferimento.

Il grado di concordanza è stato confermato anche dal dato ottenuto dal *Category Agreement*, il quale ha riportato una percentuale del 97,89%.

Questo valore supera ampiamente la soglia dell'89,9%, confermando che i dati ottenuti dal Vitek®Reveal™ sono pienamente concordi con quelli ottenuti dal metodo di riferimento Vitek-2®.

CONFRONTO: WORKFLOW STANDARD DELLE EMOCOLTURE E WORKFLOW CON VITEK®REVEAL™

Nella Figura 29 raffigurata di seguito, viene illustrato il *workflow* standard delle emocolture che attualmente viene utilizzato nel laboratorio di Microbiologia.

Nella Figura 30, viene raffigurato il *workflow* delle emocolture con l'inserimento del Vitek®Reveal™, all'interno del flusso diagnostico,

Questo protocollo operativo mette in evidenza i tempi di refertazione che incidono nella diagnosi delle batteriemie.

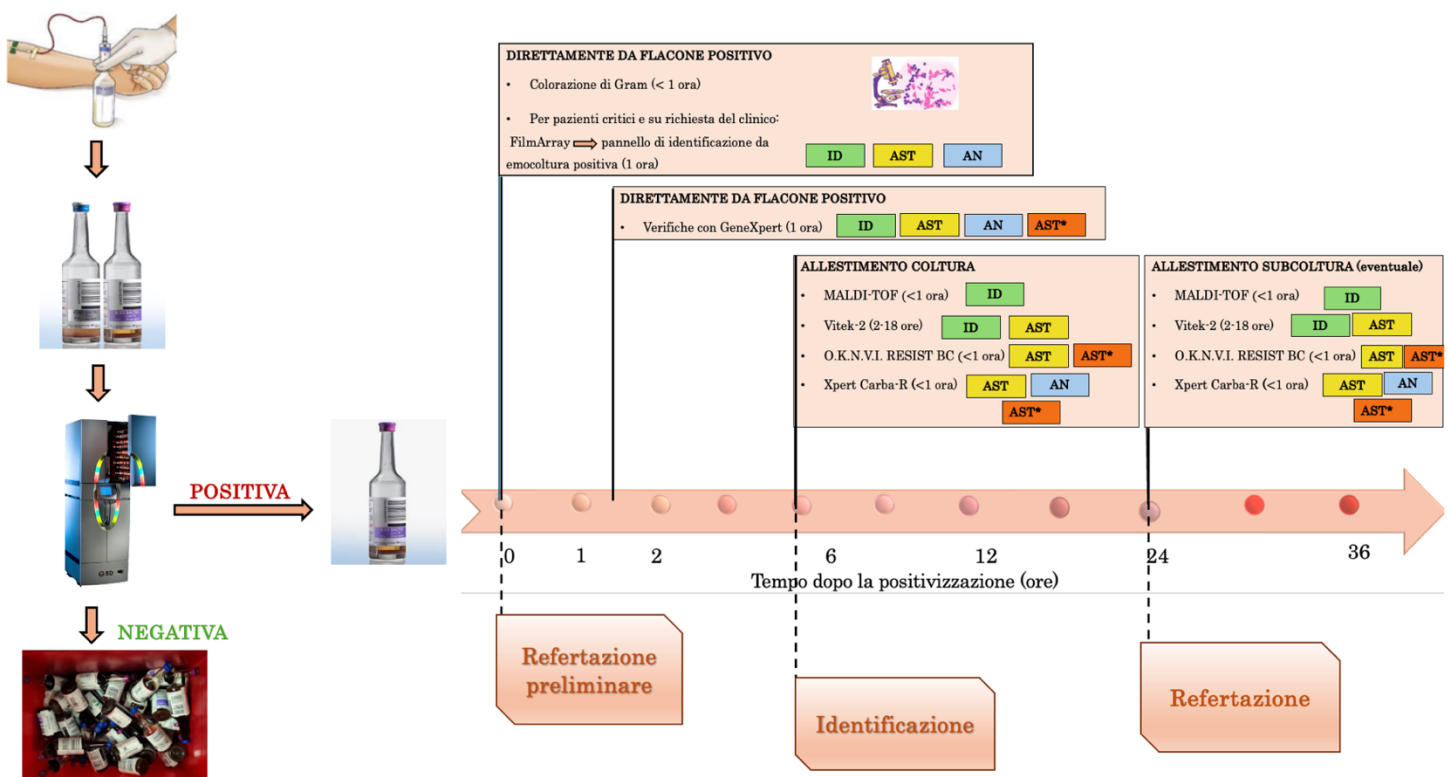


Figura 29: Protocollo standard del workflow delle emocolture

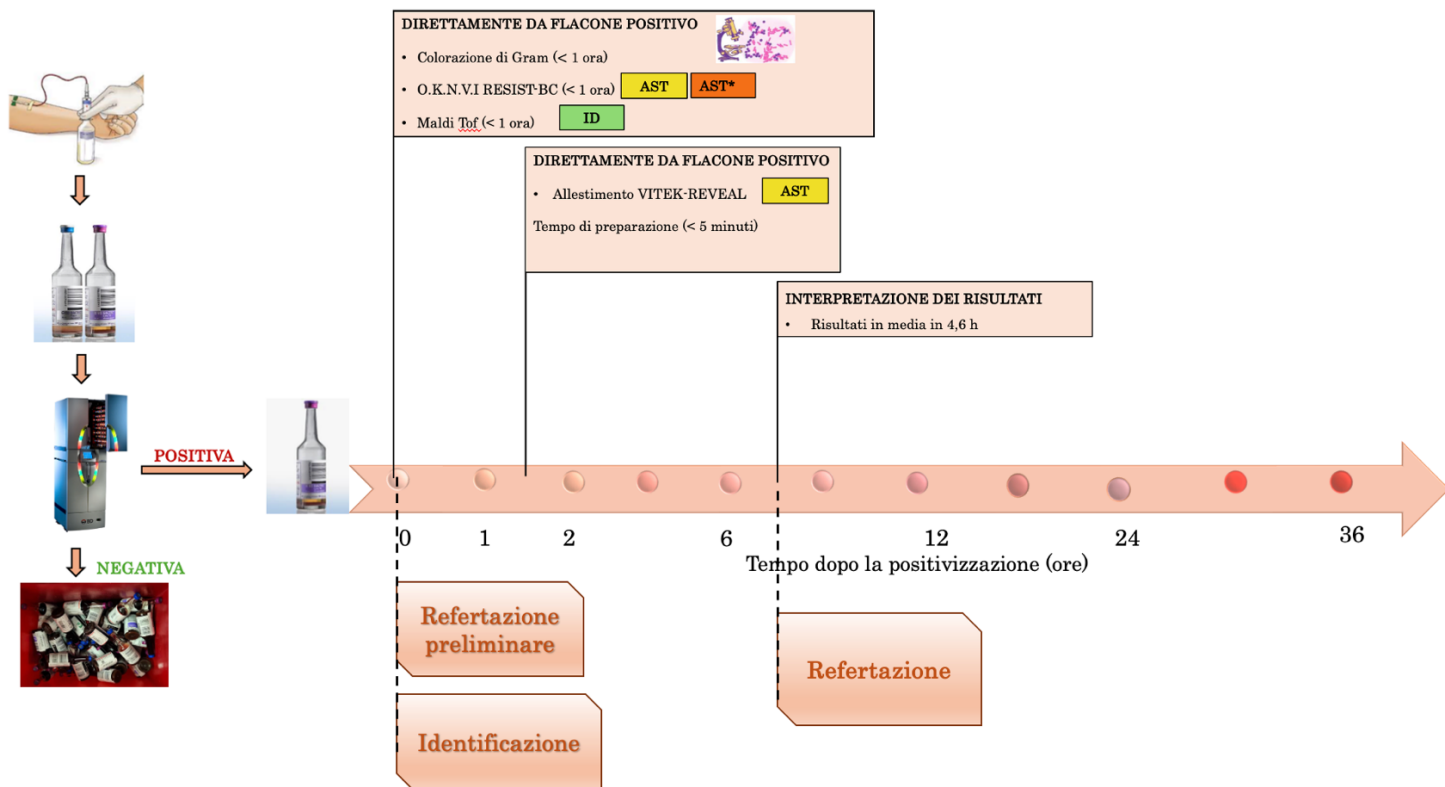


Figura 30: Workflow emocolture con Vitek®Reveal™

LEGENDA

- ID** Identificazione
- AST** Test di suscettibilità antimicrobica
- AST*** Rilevamento dei geni di resistenza agli antibiotici
- AN** Rilevamento acido nucleico

In questi due flussi diagnostici messi a confronto, Il workflow con il Vitek®Reveal™ sembra offrire un vantaggio significativo in termini di rapidità rispetto al protocollo standard che prevede l'utilizzo del Vitek-2® .

Il fatto che il test di sensibilità possa essere eseguito direttamente dal flacone di emocoltura positivo con Vitek®Reveal™ riducendo significativamente il tempo di attesa per i risultati, è un vantaggio notevole.

In situazioni dove ogni minuto conta, come nel trattamento di infezioni gravi o potenzialmente fatali, questa differenza di tempistica può fare la differenza tra un trattamento efficace e uno meno efficace.

È importante considerare anche altri fattori oltre alla velocità, come l'affidabilità dei risultati e la facilità d'uso del metodo diagnostico, caratteristiche che il Vitek®Reveal™ ha mostrato avere, nel presente studio.

Mentre il Vitek-2® richiede circa 2-3 giorni per fornire i risultati dell'AST dopo che l'emocoltura risulta positiva, il test Vitek®Reveal™ offre un'alternativa più rapida, con risultati disponibili in circa 4,6 ore direttamente dal flacone di emocoltura positivo.

Questo è particolarmente importante in patologie "*time-dependent*", dove anche una piccola differenza di tempo può avere un impatto significativo sul risultato del trattamento.

In uno studio condotto in un grande ospedale urbano del Midwest, hanno riportato una prima valutazione clinica del sistema Vitek®Reveal™ rapid AST; i risultati di suscettibilità del sistema Vitek®Reveal™ sono stati confrontati sia con Sensititre® che con Vitek-2® valutando 104 emocolture positive per batteri Gram-negativi.

I valori ottenuti dallo studio condotto da *Tibetts Robert et al.*, sono l'EA, il Category Agreement e i Very major error che sono stati rispettivamente del 98,0%/96,3%/1,3% e 97,0%/96,2%/1,3% rispetto a Sensititre® e Vitek-2®.

(Tibetts Robert et al.,2022)

Nel nostro studio abbiamo riscontrato valori molto simili per quanto riguarda le emocolture in particolare il CA e VME del Vitek®Reveal™ sono rispettivamente 97,89%/5,70% rispetto a Vitek-2®, sebbene fossero solamente 10.

Inoltre, abbiamo valutato 60 ceppi di batteri Gram-negativi selezionati e si tratta di microrganismi che sono responsabili di infezioni, prendendo anche in considerazione il fatto che si tratta di un utilizzo *off-label* del Vitek®Reveal™ dimostrando che comunque si presta bene in entrambe le condizioni, sia sulle emocolture, sia sui ceppi.

LIMITAZIONI DEL SISTEMA VITEK®REVEAL™

Un confronto tra i sistemi di test di sensibilità in vitro Vitek-2® e Vitek®Reveal™, vi sono delle considerazioni e delle differenze significative che riguardano i costi e tempi di avvio della terapia.

Il sistema Vitek®Reveal™ sembra offrire un vantaggio in termini di tempestività nell'inizio della terapia mirata, con un tempo di circa 4,6 ore dalla positivizzazione del flacone, rispetto ai 3 giorni necessari per il Vitek-2® per consentire l'inizio di una terapia empirica.

Questo potrebbe essere vitale per i pazienti che richiedono un trattamento rapido ed efficace.

Tuttavia, il costo del test è una considerazione importante.

Sebbene il Vitek®Reveal™ offra un iniziale vantaggio in termini di tempo, il suo costo notevolmente più elevato, circa 200 euro, potrebbe renderlo meno accessibile rispetto al Vitek-2® che è più conveniente, circa 10 euro.

Per decidere quale sistema utilizzare, è necessario effettuare un'analisi approfondita del costo-beneficio, tenendo conto dei vantaggi in termini di tempestività del Vitek®Reveal™ rispetto al costo aggiuntivo.

È fondamentale coinvolgere i clinici e le famiglie nel processo decisionale, bilanciando le esigenze cliniche con le considerazioni economiche.

Un'altra limitazione del sistema è dovuta al fatto che nel nostro studio sono stati inclusi solo i ceppi di Batteri Gram-negativi e le emocolture risultate positive all'esame di Gram per batteri Gram-negativi.

Questo è dovuto al fatto che l'attuale sistema consente di testare solo un numero limitato di batteri e circoscritto solo ai Gram-negativi.

		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. koseri</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
Amikacin	4 - 16	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Amoxicillin / Clavulanate	4/2 - 16/2	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ampicillin	4 - 8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Aztreonam	1 - 16	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cefepime	0.125 - 64	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cefotaxime	0.125 - 4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Cefoxitin	8 - 16	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ceftazidime	0.125 - 64	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ceftazidime/avibactam	0.25/4, 1/4 - 16/4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ceftazidime/Clavulanate	0.25/4 - 8/4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ceftolozane Tazobactam	1/4 - 4/4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ciprofloxacin	0.06, 0.25 - 1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Ertapenem	0.125 - 1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Gentamicin	2 - 4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Imipenem	1 - 8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Levofloxacin	0.25 - 1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Meropenem	0.125 - 8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Meropenem vaborbactam	2/8 - 8/8	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Piperacillin	8 - 16	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Piperacillin/tazobactam	4/4 - 16/4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Tigecycline	0.5 - 1	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Tobramycin	2 - 4	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	2/38 - 4/76	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Total		8	17	19	18	23	17	21	21	18	14	176	

Figura 31: Batteri Gram-negativi e antimicrobici che possono essere testati con Vitek®Reveal™

6. CONCLUSIONE

Il Vitek®Reveal™ è un test di recente introduzione a livello internazionale e questo è anche giustificato dalla scarsa letteratura presente.

Nel contesto italiano, il nostro studio rappresenta uno dei pochi lavori che valuta le prestazioni del Vitek®Reveal™ rispetto alle metodologie tradizionali di laboratorio.

Sebbene il Vitek®Reveal™ sia stato progettato per l'analisi diretta di emocolture positive, abbiamo scelto di testarlo utilizzando ceppi di Batteri Gram-negativi, una decisione che potrebbe sembrare un'alterazione rispetto all'intento originale dello strumento.

Tuttavia, questa scelta è stata guidata da varie motivazioni che hanno implicazioni significative.

Mentre il Vitek®Reveal™, si distingue dagli altri Test in quanto offre la possibilità di condurre l'antibiogramma direttamente dal flacone di emocoltura positivo, durante il nostro studio abbiamo constatato che ha un'ottima performance analitica anche quando utilizzato su ceppi di batteri Gram-negativi.

Questo dato, legato anche al fatto che consente un'analisi più rapida rispetto alle metodologie convenzionali, non esclude il suo utilizzo in casi di infezioni gravi come peritonite o polmonite, dove il tempismo è critico per il trattamento efficace dei pazienti.

Pertanto, pur essendo la setticemia la priorità, non possiamo trascurare l'importanza di diagnosticare rapidamente altre condizioni infettive.

Le setticemie sono considerate un'emergenza, e questa nuova tecnologia nasce proprio per questo motivo, ma è anche importante riconoscere che vi sono altre infezioni che richiedono un trattamento tempestivo, e come anche dimostrato in questo studio, non esclude il suo utilizzo anche in questi casi.

Nel nostro studio abbiamo coinvolto 60 ceppi di batteri Gram-negativi, si tratta di un numero considerevole ma non è elevatissimo.

Il basso numero di emocolture testate, e l'assenza di meccanismi di resistenza particolari fa sì che sono necessari ulteriori studi per contestualizzare il Vitek®Reveal™ all'interno dei protocolli di lavoro dei laboratori di Microbiologia.

In sintesi, lo studio ha evidenziato nel complesso, le ottime prestazioni del Vitek®Reveal™.

La sua principale forza risiede nella rapidità diagnostica, che potrebbe avere un impatto significativo e positivo sulla gestione clinica dei pazienti.

Le prospettive future per il Vitek®Reveal™ appaiono promettenti, sebbene rappresenti un progresso importante nell'ambito della diagnostica microbiologica, è ancora necessario approfondire la sua integrazione pratica nei processi diagnostici esistenti, considerando attentamente le specifiche esigenze cliniche e le potenziali applicazioni in diversi contesti di infezione e per massimizzarne l'efficacia e l'utilità clinica nella gestione dei pazienti settici.

In definitiva, il continuo sviluppo e l'ottimizzazione del Vitek®Reveal™ richiedono una collaborazione interdisciplinare tra microbiologi, clinici e ricercatori, al fine di garantire che questo strumento sia pienamente integrato nella pratica clinica e abbia un impatto positivo sulla gestione delle infezioni batteriche.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- AMCLI., 2017. Sepsi: mortalità in aumento, la velocità fa la differenza.
<http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/Sepsi-30settembre2017.pdf>
- Baron E. J., Weinstein M. P., Dunne W. M., Yagupsky P., Welch D. F., Wilson D. M. 2005. Cumitech 1C, Blood cultures IV. Coordinating editor, Baron E. J. ASM Press, Washington, DC.
<https://scholar.google.com/scholar?q=+Baron+E.+J.+Weinstein+M.+P.+Dunne+W.+M.+Yagupsky+P.+Welch+D.+F.+Wilson+D.+M.++2005++Cumitech+1C,+Blood+cultures+IV+.+Coordinating+editor,++Baron+E.+J.++ASM+Press+,++Washington,+DC+>
- BD BACTEX FX Instruments: <https://www.bd.com/it-it>
- BIOMÉRIEUX; Listino Biomeriux Italia; Price List Mid year Review., 2017
https://www.biomerieux.it/sites/subsidiary_it/files/listino_biomerieux_2017_mid_year_review_20170908.pdf
- BIOMÉRIEUX; Customer Training VITEK® REVEAL™. Materiale di riferimento: GCS
- Bizzini A, Greub G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. Clin Microbiol Infect. 2010 Nov;16(11):1614-9. doi: 10.1111/j.1469-0691.2010.03311.x. PMID: 20636422.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20636422/>
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992 Jun;101(6):1644-55. doi: 10.1378/chest.101.6.1644. PMID: 1303622.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1303622/>
- Calci Mario et al., La sepsi: Nuova definizione ed evoluzione nei criteri di gestione. ISSN 2532-1285; doi: 10.23832/ITJEM.2017.032
<https://www.itjem.org/2017/11/27/la-sepsi-nuova-definizione-ed-evoluzione-nei-criteri-di-gestione/>

- Chabriere E, Bassène H, Drancourt M, Sokhna C. MALDI-TOF MS and point of care are disruptive diagnostic tools in Africa, *New Microbes and New Infections*, Volume 26, Supplement 1,2018, Pages S83-S88,ISSN 2052-2975,
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2052297518300805>
- CLSI- Principles and Procedures for Blood Cultures: Approved Guidelines. CLSI document M47-A. Wayne, PA; Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007
https://clsi.org/media/1448/m47a_sample.pdf
- Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines.
<https://clsi.org>
- Connell TG, Rele M, Cowley D, Buttery JP, Curtis N. How reliable is a negative blood culture result? Volume of blood submitted for culture in routine practice in a children's hospital. *Pediatrics*. 2007 May;119(5):891-6. doi: 10.1542/peds.2006-0440. PMID: 17473088.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17473088/>
- Copan WASP®. Your first step into microbiology lab automation. Code: MMWB-W00ENR00 2023-03.
https://mediadelivery.copangroup.com/wp-content/uploads/2023/03/WASP_MMWB-W00ENR00-2023-03_DIGITAL-1.pdf
- Coris BioConcept- RESIST-5 O.K.N.V.I. Test diagnostico rapido in vitro per la ricerca delle carbapenemasi OXA-48, KPC, NDM, VIM e IMP su colonia batterica. IFU-58R11/IT/06
- Coris BioConcept- RESIST- BC. Kit di reagenti per la rivelazione di CPE da coltura ematica. IFU-57S01/IT/V03
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012 Mar;36(2):380-407. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x. Epub 2011 Aug 22. PMID: 22092265.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22092265/>
- Debbia Eugenio Agenore, *Microbiologia Clinica*, Società Editrice Esculapio, 1 mag 2018

- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R, Osborn TM, Nunnally ME, Townsend SR, Reinhart K, Kleinpell RM, Angus DC, Deutschman CS, Machado FR, Rubinfeld GD, Webb SA, Beale RJ, Vincent JL, Moreno R; Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med.* 2013 Feb;41(2):580-637. doi: 10.1097/CCM.0b013e31827e83af. PMID: 23353941.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23353941/>
- Dingle TC, Butler-Wu SM. Maldi-tof mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med.* 2013 Sep;33(3):589-609. doi: 10.1016/j.cl.2013.03.001. PMID: 23931840.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23931840/>
- Dyck B, Unterberg M, Adamzik M, Koos B. The Impact of Pathogens on Sepsis Prevalence and Outcome. *Pathogens.* 2024 Jan 20;13(1):89. doi: 10.3390/pathogens13010089. PMID: 38276162; PMCID: PMC10818280.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10818280/>
- Enciclopedia Treccani
[https://www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/batteriemia_\(medicina\)/](https://www.treccani.it/enciclopedia/ricerca/batteriemia_(medicina)/)
- EUCAST. <https://www.eucast.org>
- Ferrara F, Zovi A, Nava E, Trama U, Sorrentino S, Vitiello A. Il contrasto dell'antibiotico-resistenza: serve una nuova linea di azione [Countering antibiotic resistance: a new course of action is needed.]. *Recenti Prog Med.* 2023 May;114(5):277-283. Italian. doi: 10.1701/4032.40076. PMID: 37114609.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37114609/>
- Garcia RA, Spitzer ED, Beaudry J, Beck C, Diblasi R, Gilleeny-Blabac M, Haugaard C, Heuschneider S, Kranz BP, McLean K, Morales KL, Owens S, Paciella ME, Torregrosa E. Multidisciplinary team review of best practices for collection and handling of blood cultures to determine effective interventions for increasing the yield of true-positive bacteremias, reducing contamination, and eliminating false-positive central line-associated bloodstream infections. *Am J Infect Control.* 2015 Nov;43(11):1222-37. doi: 10.1016/j.ajic.2015.06.030. Epub 2015 Aug 19. PMID: 26298636.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26298636/>

- Godmer A, Benzerara Y, Normand AC, Veziris N, Gallah S, Eckert C, Morand P, Piarroux R, Aubry A., 2021. Revisiting Species Identification within the *Enterobacter cloacae* Complex by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Microbiol Spectr* 9:10.1128/spectrum.00661-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00661-21>
- Gonzalez MD, Chao T, Pettengill MA. Modern Blood Culture: Management Decisions and Method Options. *Clin Lab Med*. 2020 Dec;40(4):379-392. doi: 10.1016/j.cll.2020.07.001. Epub 2020 Sep 19. PMID: 33121610; PMCID: PMC7501519. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33121610/>
- Guzzo I, Morabito S, Stucchi I, Poli G, Fumagalli R. La sepsi: terapia farmacologica. *Giornale Italiano di Nefrologia / Anno 23 S-36*, 2006. https://giornaleitalianodinefrologia.it/wp-content/uploads/sites/3/pdf/storico/2006/S-36/S079-S086_Guzzo-Fumagalli.pdf
- Haddadin Y, Annamaraju P, Regunath H. Central Line–Associated Blood Stream Infections. [Updated 2022 Nov 26]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430891/>
- Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Oct;19(4):788-802. doi: 10.1128/CMR.00062-05. PMID: 17041144; PMCID: PMC1592696. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17041144/>
- Huber S, Hetzer B, Crazzolara R, Orth-Höller D. The correct blood volume for paediatric blood cultures: a conundrum? *Clin Microbiol Infect*. 2020 Feb;26(2):168-173. doi: 10.1016/j.cmi.2019.10.006. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31654793. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31654793/>
- Istruzione operativa- Gestione strumento Vitek-2 Rev. 02 del 21/11/2023. Mod. SQ 007-00/01
- Kang CM, Chen XJ, Chih CC, Hsu CC, Chen PH, Lee TF, Teng LJ, Hsueh PR. Rapid identification of bloodstream bacterial and fungal pathogens and their antibiotic resistance determinants from positively flagged blood cultures using the BioFire FilmArray blood culture identification panel. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020 Dec;53(6):882-891. doi: 10.1016/j.jmii.2020.03.018. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32305272. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32305272/>

- Kirn TJ, Weinstein MP. Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Jun;19(6):513-20. doi: 10.1111/1469-0691.12180. Epub 2013 Mar 13. PMID: 23490046.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23490046/>
- Lambregts MMC, Bernards AT, van der Beek MT, Visser LG, de Boer MG. Time to positivity of blood cultures supports early re-evaluation of empiric broad-spectrum antimicrobial therapy. *PLoS One.* 2019 Jan 2;14(1):e0208819. doi: 10.1371/journal.pone.0208819. PMID: 30601829; PMCID: PMC6314566.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30601829/>
- Lamy B, Dargère S, Arendrup MC, Parienti JJ, Tattevin P. How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the-Art. *Front Microbiol.* 2016 May 12;7:697. doi: 10.3389/fmicb.2016.00697. PMID: 27242721; PMCID: PMC4863885.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27242721/>
- 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.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29675566/>
- Lucioni C, I. Currado, M. Langer, S. Mazzi. I costi della sepsi in Italia. DOI: <https://doi.org/10.7175/fe.v2i3.727>
- Maugeri G, Lychko I, Sobral R, Roque ACA. Identification and Antibiotic-Susceptibility Profiling of Infectious Bacterial Agents: A Review of Current and Future Trends. *Biotechnol J.* 2019 Jan;14(1):e1700750. doi: 10.1002/biot.201700750. Epub 2018 Aug 26. PMID: 30024110; PMCID: PMC6330097.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30024110/>
- Martens E, Demain AL. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *J Antibiot (Tokyo).* 2017 May;70(5):520-526. doi: 10.1038/ja.2017.30. Epub 2017 Mar 1. PMID: 28246379.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28246379/>
- ©MERLIN Diagnostika GmbH- Revision May 2019

- 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 Aug 31;67(6):e1-e94. doi: 10.1093/cid/ciy381. PMID: 29955859; PMCID: PMC7108105. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29955859/>
- Mylotte JM, Tayara A. Blood cultures: clinical aspects and controversies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000 Mar;19(3):157-63. doi: 10.1007/s100960050453. PMID: 10795587. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10795587/>
- Oczkowski S, Alshamsi F, Belley-Cote E, Centofanti JE, Hylander Møller M, Nunnally ME, Alhazzani W. Surviving Sepsis Campaign Guidelines 2021: highlights for the practicing clinician. *Pol Arch Intern Med*. 2022 Aug 22;132(7-8):16290. doi: 10.20452/pamw.16290. Epub 2022 Jul 6. PMID: 35791800. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35791800/>
- Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, Pritt BS, Patel R. Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2017 Nov 15;31(1):e00024-17. doi: 10.1128/CMR.00024-17. PMID: 29142077; PMCID: PMC5740973. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29142077/>
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 2020 Jan 18;395(10219):200-211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7. PMID: 31954465; PMCID: PMC6970225. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31954465/>
- Paoli CJ, Reynolds MA, Sinha M, Gitlin M, Crouser E. Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. *Crit Care Med*. 2018 Dec;46(12):1889-1897. doi: 10.1097/CCM.0000000000003342. PMID: 30048332; PMCID: PMC6250243. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30048332/>

- Parodi O, De Chiara B, Campolo J, Sedda V, Roubina E. Disfunzione endoteliale e stress ossidativo nella sepsi. *Giornale Italiano di Nefrologia / Anno 23 S-36*, 2006.
https://giornaleitalianodinefrologia.it/wpcontent/uploads/sites/3/pdf/storico/2006/S-36/S069-S073_Parodi.pdf?x85047
- Patel R, Vetter EA, Harmsen WS, Schleck CD, Fadel HJ, Cockerill FR 3rd. Optimized pathogen detection with 30- compared to 20-milliliter blood culture draws. *J Clin Microbiol.* 2011 Dec;49(12):4047-51. doi: 10.1128/JCM.01314-11. Epub 2011 Oct 5. PMID: 21976759; PMCID: PMC3232938.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21976759/>
- Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev.* 1997 Jul;10(3):444-65. doi: 10.1128/CMR.10.3.444. PMID: 9227861; PMCID: PMC172929.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9227861/>
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, Rochweg B, Rubenfeld GD, Angus DC, Annane D, Beale RJ, Bellinghan GJ, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith C, De Backer DP, French CJ, Fujishima S, Gerlach H, Hidalgo JL, Hollenberg SM, Jones AE, Karnad DR, Kleinpell RM, Koh Y, Lisboa TC, Machado FR, Marini JJ, Marshall JC, Mazuski JE, McIntyre LA, McLean AS, Mehta S, Moreno RP, Myburgh J, Navalesi P, Nishida O, Osborn TM, Perner A, Plunkett CM, Ranieri M, Schorr CA, Seckel MA, Seymour CW, Shieh L, Shukri KA, Simpson SQ, Singer M, Thompson BT, Townsend SR, Van der Poll T, Vincent JL, Wiersinga WJ, Zimmerman JL, Dellinger RP. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* 2017 Mar;43(3):304-377. doi: 10.1007/s00134-017-4683-6. Epub 2017 Jan 18. PMID: 28101605.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28101605/>
- Rocchetti Andrea, Rapallo Fabio, Bottino Paolo, Mastrazzo Alessandra. Implementation of satellite blood-culture system in an emergency department: impact of time-to results in sepsis detection. *Microbiologia Medica* 2016; 31:5859.
<https://www.pagepressjournals.org/index.php/mm/article/view/5859/5775>
- Rocchetti A, Sambri V, Farina C, Carretto E, Meledandri M, Raglio A. Raccomandazioni APSI-SIMPIOS sull'emocoltura nel paziente settico. *Gimprios* 2016;6(4):129-135. doi 10.1716/2633.27072
<https://www.gimprios.it/archivio/2633/articoli/27072/>

- Roth A, Wiklund AE, Pålsson AS, Melander EZ, Wullt M, Cronqvist J, Walder M, Sturegård E. Reducing blood culture contamination by a simple informational intervention. *J Clin Microbiol.* 2010 Dec;48(12):4552-8. doi: 10.1128/JCM.00877-10. Epub 2010 Sep 29. PMID: 20881178; PMCID: PMC3008442.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20881178/>
- Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, DesJarlais SM, Johnson JK, Robinson G, Carroll KC, Greer A, Morgan M, Chan R, Loeffelholz M, Valencia-Shelton F, Jenkins S, Schuetz AN, Daly JA, Barney T, Hemmert A, Kanack KJ. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *J Clin Microbiol.* 2016 Mar;54(3):687-98. doi: 10.1128/JCM.01679-15. Epub 2016 Jan 6. PMID: 26739158; PMCID: PMC4767991. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26739158/>
- Siewers Karina, Osama Bin Abdullah SM, Husås Sørensen RN Rune, Nielsen Finn Erland MD. Time to administration of antibiotics and mortality in sepsis. *Journal of the American College of Emergency Physicians Open.* Volume 2, Issue 3. e12435
<https://doi.org/10.1002/emp2.12435>
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801–810. doi:10.1001/jama.2016.0287
<https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2492881>
- Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015 Aug 5;6:791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791. PMID: 26300860; PMCID: PMC4525378.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4525378/>
- Squitieri Damiano. Spettrometria di massa MALDI-TOF. Agosto 16, 2022
<https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/spettrometria-di-massa-maldi-tof/>
- Tabak YP, Vankeepuram L, Ye G, Jeffers K, Gupta V, Murray PR. Blood Culture Turnaround Time in U.S. Acute Care Hospitals and Implications for Laboratory Process Optimization. *J Clin Microbiol.* 2018 Nov 27;56(12):e00500-18. doi: 10.1128/JCM.00500-18. PMID: 30135230; PMCID: PMC6258864.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6258864/>

- Tamma PD, Avdic E, Li DX, Dzintars K, Cosgrove SE. Association of Adverse Events With Antibiotic Use in Hospitalized Patients. *JAMA Intern Med.* 2017;177(9):1308–1315. doi:10.1001/jamainternmed.2017.1938
<https://jamanetwork.com/journals/jamainternalmedicine/fullarticle/2630756>
- Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, Samuel L. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. *J Clin Microbiol.* 2022 Jun 15;60(6):e0009822. doi: 10.1128/jcm.00098-22. Epub 2022 May 24. PMID: 35607972; PMCID: PMC9199398.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35607972/>
- Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. *Intensive Care Med.* 2020 Feb;46(2):266-284. doi: 10.1007/s00134-020-05950-6. Epub 2020 Feb 11. PMID: 32047941; PMCID: PMC7223992. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32047941/>
- Truong WR, Hidayat L, Bolaris MA, Nguyen L, Yamaki J. The antibiogram: key considerations for its development and utilization. *JAC Antimicrob Resist.* 2021 May 25;3(2):dlab060. doi: 10.1093/jacamr/dlab060. PMID: 34223122; PMCID: PMC8210055.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34223122/>
- Trzeciak, Stephen, Dellinger, R. Phillip, Parrillo, Joseph E. Dellinger. *Critical Care Medicine (Third Edition, Chapter 24 - Septic Shock*
<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/septic-shock#:~:text=PATHOGENESIS,a%20multitude%20of%20proinflammatory%20mediators>
- Umemura Y, Ogura H, Takuma K, Fujishima S, Abe T, Kushimoto S, Hifumi T, Hagiwara A, Shiraishi A, Otomo Y, Saitoh D, Mayumi T, Yamakawa K, Shiino Y, Nakada TA, Tarui T, Okamoto K, Kotani J, Sakamoto Y, Sasaki J, Shiraishi SI, Tsuruta R, Masuno T, Takeyama N, Yamashita N, Ikeda H, Ueyama M, Gando S; Japanese Association for Acute Medicine (JAAM) Focused Outcomes Research in Emergency Care in Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis and Trauma (FORECAST) Study Group. Current spectrum of causative pathogens in sepsis: A prospective nationwide cohort study in Japan. *Int J Infect Dis.* 2021 Feb;103:343-351. doi: 10.1016/j.ijid.2020.11.168.
Epub 2020 Nov 19. PMID: 33221519.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33221519/>

- UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of Blood Cultures (for Organism other than *Mycobacterium species*). Issued by the Standards Unit, Microbiology Services, PHE; Bacteriology, B 37, Issue no:8 (Issue date: 04.11.14) http://www.apsi.it/public/ufiles/smi/b37_8_en_141104.pdf
- UK Standards for Microbiology Investigations. Investigation of Blood Cultures (for Organism other than *Mycobacterium species*). Issued by the Standards Unit, National Infection Service, PHE; Bacteriology, B 37, Issue no: 8.2 (Issue date: 05.09.19) https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/979833/B_37i8.2.pdf
- Vincent J, Rello J, Marshall J, et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. JAMA. 2009;302(21):2323–2329. doi:10.1001/jama.2009.1754 <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/184963#jce90006t2>
- VITEK 2® Biomerieux <https://www.biomerieux.it/prodotto/vitekr-2>
- VITEK® REVEAL™ Biomerieux <https://www.biomerieux.com/nl/en/our-offer/clinical-products/vitek-reveal.html>
- World Health Organization (WHO). L'OMS chiede un'azione globale sulla sepsi - causa di 1 decesso su 5 in tutto il mondo. 8 settembre 2020 <https://www.who.int/news/item/08-09-2020-who-calls-for-global-action-on-sepsis--cause-of-1-in-5-deaths-worldwide>
- Weinstein MP, Doern GV. A Critical Appraisal of the Role of the Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Bloodstream Infections. J Clin Microbiol. 2011 Sep;49(9 Suppl):S26–9. doi: 10.1128/JCM.00765-11. PMID: PMC3185849. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3185849/>

SITOGRAFIA FIGURE

- Figura 1. <https://www.area-c54.it/public/riconoscere%20e%20gestire%20la%20sepsi.pdf>
- Figura 2. <https://it.freepik.com>
- Figura 3. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)32989-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)32989-7/fulltext)

- Figura 4. [https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736\(19\)32989-7/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lancet/article/PIIS0140-6736(19)32989-7/fulltext)
- Figura 7. <https://www.copangroup.com/product-ranges/product-wasp/>
- Figura 8. <https://www.biomerieux.it/prodotto/vitekr-2>
- Figura 9. <https://www.bnext.com.tw/article/39492/BN-2016-05-09-111107-77>
- Figura 10. <https://www.biomerieux.it/solutions/gestione-delle-resistenze-antimicrobiche>
- Figura 12. <https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/clinical-products/vitek-2-ast-cards.html>
- Figura 13. <https://www.biomerieux-usa.com/etest-ct>
- Figura 14. <https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/antibiogramma/https://gest.joyadv.it/public/cartellina-allegati-schede-certificazioni/schede-tecniche-italiano/st-541740.pdf>
- Figura 15. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™
- Figura 16. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™
- Figura 17. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™
- Figura 18. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™
- Figura 19. <https://www.nutri-bact.com/medias/iw/Cry-O-Bact-English.pdf>
- Figura 20. <https://www.nutri-bact.com/medias/iw/Cry-O-Bact-English.pdf>
- Figura 21. https://www.biomerieux-usa.com/sites/subsidiary_us/files/18-vitek2-systembrochure_v2.pdf
- Figura 22. [https://insights.opentrons.com/hubfs/Brochures%20and%20flyers/OT-2%20Brochure%20\(1\).pdf?_gl=1*1r6vvn5*_ga*MTYxNzk3Mzg4MS4xNzA4MjUyODg2*_ga_66HK7MC5D7*MTcwODg3NDgzNi40LjAuMTcwODg3NDgzNi42MC4wLjA.*_ga_GNSMNLW4RY*MTcwODg2MTk3MC4zLjEuMTcwODg2MjI1My41Mi4wLjA](https://insights.opentrons.com/hubfs/Brochures%20and%20flyers/OT-2%20Brochure%20(1).pdf?_gl=1*1r6vvn5*_ga*MTYxNzk3Mzg4MS4xNzA4MjUyODg2*_ga_66HK7MC5D7*MTcwODg3NDgzNi40LjAuMTcwODg3NDgzNi42MC4wLjA.*_ga_GNSMNLW4RY*MTcwODg2MTk3MC4zLjEuMTcwODg2MjI1My41Mi4wLjA)
- Figura 23. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™

- **Figura 24.**
https://lifesciences.tecan.com/products/microplate_readers/sunrise?utm_term=tecan%20sunrise&utm_campaign=SOFluentControl&utm_source=adwords&utm_medium=ppc&hsa_net=adwords&hsa_tgt=kwd761482069898&hsa_ad=634909376871&hsa_acc=9279258943&hsa_grp=161644038151&hsa_mt=e&hsa_cam=21002961084&hsa_kw=tecan%20sunrise&hsa_ver=3&hsa_src=g&gad_source=1&gclid=CjwKCAiAi6uvBhADEiwAWiyRdhTFIKg7g2-heIn8VQYAYYRxid9QRyj_PLSYZysXUGErAdQxCI8fIRoCx9oQAvD_BwE
- **Figura 25. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™**
- **Figura 26. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™**
- **Figura 27.** <https://www.corisbio.com/products/resist-bc>
- **Figura 28.** <https://www.corisbio.com/products/resist-3-okn>
- **Figura 31. Biomeriux-Customer Training VITEK® REVEAL™**
- **Tabella 18.**
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf