



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

Sede amministrativa

**Università degli Studi di Padova**

Dipartimento di Medicina Molecolare DMM

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA

CICLO XXVII

**Validazione di un percorso diagnostico rapido  
per l'analisi del fenotipo di sensibilità  
dei batteri Gram negativi**

**Direttore:** Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Saverio Parisi

**Dottorando:** Dott.ssa Marta Fiscon



# INDICE

<b>SOMMARIO</b>	pag 1
<b>ABSTRACT</b>	pag 3
<b>ACRONIMI E ABBREVIAZIONI</b>	pag 5
<b>INTRODUZIONE</b>	
Le resistenze agli antibiotici: un problema globale .....	pag 7
Le resistenze agli antibiotici espresse dai batteri Gram-negativi	pag 10
Metodiche di rilevazione delle resistenze batteriche .....	pag 17
Approccio clinico per la diagnosi e cura delle infezioni da batteri gram-negativi multiresistenti e cenni di antimicrobial stewardship .....	pag 28
<b>PROGETTO DI RICERCA 1: Validazione di un percorso diagnostico rapido delle emocolture per la valutazione della MIC nei batteri Gram-negativi</b>	
<b>RAZIONALE DELLO STUDIO</b>	pag 34
<b>MATERIALI E METODI</b>	
2.1 Disegno dello studio e criteri di inclusione .....	pag 36
2.2 Inoculazione dei ceppi nei campioni di emocoltura .....	pag 38
2.3 Metodica standard di coltura e identificazione .....	pag 38
2.4 Metodica rapida di coltura e identificazione .....	pag 39
2.5 Allestimento e lettura dell'antibiogramma .....	pag 41
2.6 Analisi dei dati .....	pag 44
<b>RISULTATI</b>	
3.1 Caratteristiche dei ceppi analizzati .....	pag 50

3.2 Analisi della ripetibilità del metodo rapido .....	pag 51
3.3 Analisi della performance dell'antibiogramma rapido vs metodo tradizionale .....	pag 53
3.4 Valutazione e confronto degli errori tra differenti fenotipi di sensibilità agli antibiotici.....,	pag 63
3.5 Analisi statistica dei risultati .....	pag 64
3.6 Analisi dopo valutazione critica degli errori .....	pag 68
<b>DISCUSSIONE</b> .....	pag 73
<b>CONCLUSIONI</b> .....	pag 83

## **PROGETTO DI RICERCA 2:**

### **Uso della spettrometria di massa (MALDI-TOF) per la rilevazione precoce della resistenza ai fluorchinoloni**

<b>RAZIONALE DELLO STUDIO</b>	pag 90
<b>MATERIALI E METODI</b>	
2.1 Disegno dello studio e criteri di inclusione .....	pag 92
2.2 Metodica di preparazione dei campioni .....	pag 92
2.3 Metodica di utilizzo di VitekMS con software Saramis® .....	pag 94
2.4 Analisi dei picchi e confronto con il metodo tradizionale.....	pag 97
<b>RISULTATI</b>	
3.1 Caratteristiche dei ceppi analizzati .....	pag 98
3.2 Analisi del metodo "indiretto" .....	pag 100
3.3 Analisi del metodo "diretto" .....	pag 102
<b>DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b> .....	pag 103
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	pag 105

# SOMMARIO

Il problema delle infezioni da germi multiresistenti è complesso e di gravità sempre crescente, a causa dell'incremento della loro diffusione e del mancato sviluppo di nuove opzioni terapeutiche. Un'efficace soluzione è rappresentata dai programmi di antimicrobial stewardship, che prevedono una stretta collaborazione interdisciplinare allo scopo di ottimizzare la terapia antimicrobica, contenere le epidemie da germi multiresistenti e creare iter diagnostici mirati, specie nel caso delle infezioni invasive.

L'attività di ricerca svolta ha avuto lo scopo di validare un percorso diagnostico innovativo per l'analisi rapida del fenotipo di sensibilità dei batteri Gram negativi. Ad oggi, infatti, nella diagnosi microbiologica di sepsi, l'antibiogramma secondo brodo-diluizione rappresenta ancora il gold-standard; tuttavia sussiste la necessità di fornire il risultato in tempi sempre più brevi, per consentire al clinico di perfezionare la terapia iniziata empiricamente. Per questo motivo, il limite dato dalle lunghe tempistiche attuali è sempre più gravoso, seppur le tecnologie attuali consentano di integrare nella routine di laboratorio metodi veloci ed efficaci, come le analisi in biologia molecolare. Vari autori hanno indagato nuovi percorsi di identificazione rapida del fenotipo di sensibilità, ma ad oggi non è ancora presente nessuno studio conclusivo e nessuna indicazione ufficialmente validata e riconosciuta per l'uso delle metodiche rapide di rilevazione delle resistenze nella real-life, lasciando alla responsabilità e all'esperienza del medico microbiologo l'adozione di protocolli operativi e la loro integrazione nel work-flow del laboratorio.

Nel primo studio, pertanto, è stata validata una procedura innovativa di esecuzione dell'antibiogramma, in grado di anticiparne il risultato di circa 24 ore, grazie all'analisi dopo semina a spot, che permette di ottenere la rapida crescita di una patina batterica. Sono stati inclusi in questa analisi 145 ceppi di *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, con differenti profili di sensibilità, che sono stati analizzati sia secondo il metodo di riferimento che secondo il metodo rapido per la determinazione della MIC. Nel complesso, i dati ottenuti hanno evidenziato una performance soddisfacente, per quanto riguarda la ripetibilità, la concordanza tra le due metodiche, la sensibilità e la

specificità. Anche gli errori rilevati, analizzando i singoli antibiotici e il totale delle MIC complessivamente determinate, sono risultati entro il limite di accettabilità del metodo; tuttavia, sono state osservate alcune criticità, soprattutto riguardo all'attendibilità dei risultati per Ampicillina/Sulbactam, Piperacillina/Tazobactam e Fosfomicina, che potrebbero essere escluse dalla refertazione dell'antibiogramma "rapido" senza precluderne l'utilità per l'aggiustamento della prima linea terapeutica.

Il secondo studio, invece, ha valutato l'applicazione della spettrometria di massa alla rilevazione rapida della resistenza ai fluorochinoloni, con particolare attenzione all'espressione della variante della aminoaciltrasferasi *AAC(6')-Ib-cr*. A tale scopo, sono stati inclusi nella ricerca 72 ceppi di *Escherichia coli*, seminati a spot su piastre di agar sangue, incubati per 5 ore con disco di norfloxacina ed infine raccolti per l'analisi dello spettro proteico tramite MALDI-TOF. Per lo studio è stato utilizzato il software Saramis™ dello strumento Vitek-MS® (BioMerieux), che ha consentito l'analisi scorciata dei singoli spettri rilevati. In particolare, sono stati ricercati gli spettri corrispondenti alle forme di norfloxacina native e acetilate (metodo "indiretto") e il picco corrispondente all'enzima *aac(6')-Ib-cr* (metodo "diretto"). In entrambi i casi, la valutazione non ha dato risultati soddisfacenti, sia in termini di concordanza con il metodo tradizionale, che di specificità e sensibilità.

In conclusione, il percorso diagnostico rapido per la determinazione della MIC è risultato valido in termini di riproducibilità e affidabilità e può essere applicato, seppur con alcune riserve, nella diagnosi microbiologica di sepsi. Al contrario, la rilevazione della resistenza ai chinoloni tramite spettrometria di massa con il metodo indagato non ha dimostrato alcuna applicabilità nella pratica clinica. Ulteriori approfondimenti potranno essere presi in considerazione, tenendo sempre conto della necessità di garantire un risultato rapido e preciso, che non tralasci la centralità di una diagnosi e cura sempre guidate da expertise, prudenza e monitoraggio clinico.

# ABSTRACT

The multidrug-resistant bacterial infections represent a global and complex problem because of the increase in their prevalence and the lack of new antibiotics. In this context, the antimicrobial stewardship programs are based on the collaboration between the infectious disease specialist and the microbiologist, which must merge their competencies to optimize antimicrobial therapy, implement surveillance and control the spread of MDR epidemic in health-care facilities. Moreover, they should create specific diagnostic procedures to obtain a prompt diagnosis of sepsis, with the species-identification of the pathogen and its sensitivity profile to antibiotics.

Our research evaluated a new diagnostic approach for the early determination of the phenotypic antimicrobial susceptibility in Gram-negative bacteria.

The first study aimed to validate an innovative rapid procedure for bacterial antibiogram in sepsis, which is 24 hours quicker than the traditional one. Nowadays indeed, the laboratory can use new technologies molecular biology techniques as a support in sepsis diagnostics; however, culture and microbroth dilution are still the gold standards in sepsis' microbiological diagnosis. Unfortunately, they require a long time to be finalized, and this is more and more a severe limit since patients' survival depends on a rapid and correct therapy start. Many authors studied new pathways of identification of resistances, but until now, nobody was able to establish a shared procedure based on evidence. For this reason, in the real-life laboratory, operational protocols are based on the responsibility and the expertise of the single professional.

In our study, we included 145 strains of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, with different phenotypic profiles. They were analyzed with both the gold standard method and the rapid one, comparing the values of Minimal Inhibitory Concentration. The procedure included haemoculture's bottles inoculum, spot streaking on an agar plate, 5 hours incubation at 37°C, and finally microbroth dilution test preparation (Sensititre® method). MIC data and their interpretation (susceptible, intermediate or resistant) were collected and compared to ones obtained with the gold standard test,

and agreement index was calculated together with sensitivity, specificity and prediction parameters.

The aggregate data analysis showed a good performance, regarding precision, the Categorical Agreement (97.9%), the Essential Agreement (99.1%), the sensitivity (96%) and specificity (99%). Furthermore, the errors related to the evaluation of both the single antibiotic and the total of the MIC resulted in being acceptable. However, we observed the presence of some significant Very Major and Major Errors concerning Ampicillin/Sulbactam, Piperacillin/Tazobactam e Fosfomycin: these results suggested us to exclude the three drugs from the new rapid susceptibility test, without precluding the utility in guiding the so called “first line therapy”.

In the second study, we evaluated the application of mass spectrometry to the rapid detection of quinolones' resistance, with particular attention to the expression of the aminoglycoside acetyltransferase variant *AAC(6')-Ib-cr*. We included in the study 72 strains of *E. coli*, which were spot streaked on an agar plate, incubated for 5 hours at 37°C with norfloxacin disk and finally collected for the MALDI-TOF analysis. For the study, we used the Saramis® software, Vitek® MS (Biomerieux), which allows examining separately every single detected spectrum. In particular, we investigated the presence of spectra related to the native and the acetylated norfloxacin spectra (“indirect” method) and the *AAC(6')-Ib-cr* spectra (“direct” method). In both the cases, the analysis did not show satisfactory results, regarding both agreements with the reference test and sensitivity/specificity.

In conclusion, our study demonstrated that the new rapid procedure for the bacterial antimicrobial susceptibility test has an acceptable agreement with the traditional one regarding the major part of the antibiotics that are used in practice as a first line therapy in sepsis. On the contrary, our method for the evaluation of quinolone with mass spectrometry did not show any clinical and microbiological viability. Further studies might be designed in this topic, but they should always consider the need to guarantee a precise and rapid result, together with a targeted diagnosis and care that never neglect expertise, caution, and clinical monitoring.



# ACRONIMI E ABBREVIAZIONI

AMPc	Beta-lattamasi AmpC
Amp/sul	Ampicillina/sulbactam
AcetilNorf	Norfloxacin Acetilata
ATCC	America Type Culture Collection
CIPRO	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DOR	Odds Ratio Diagnostico
ESBL	Beta-lattamasi a spettro esteso
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GENTA	Gentamicina
I	Profilo di sensibilità Intermedio
KPC	<i>K. pneumoniae</i> Carbapenemase
LR	Likelihood Ratio
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption/ionization – Time of Flight
MDR	Multi Drug Resistant
ME	Major Error
mE	minor Error
MBC	Minima Concentrazione Battericida
MBL	Metallo Beta Lattamasi
MIC	Minima Concentrazione Inibente
NEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment Service
Norf	Norfloxacin nativa
Pip/tazo	Piperacillina/tazobactam
R	Resistente
S	Sensibile
SXT	Trimetoprim Sulfametossazolo
VME	Very Major Error
XDR	Extensively Drug Resistant

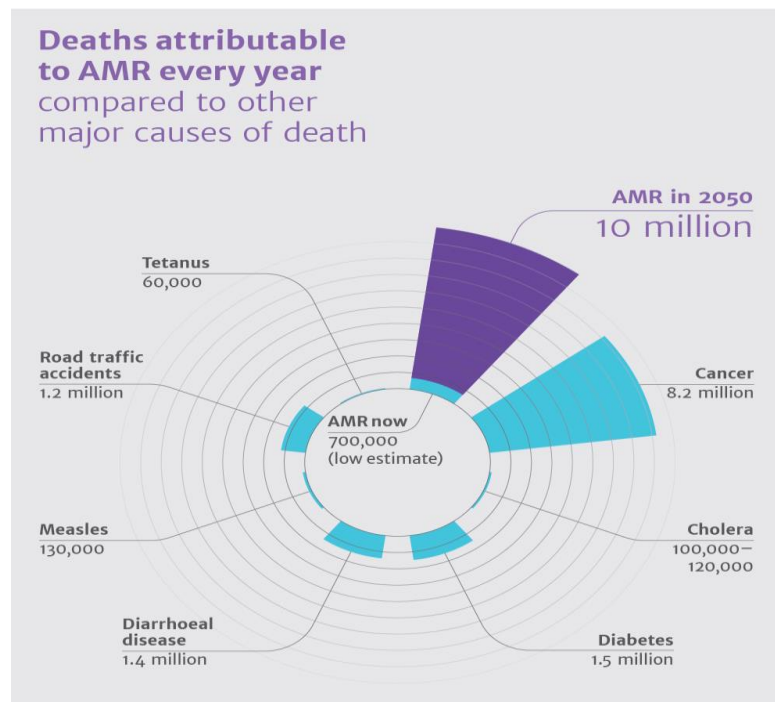


# INTRODUZIONE

## LE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI: UN PROBLEMA GLOBALE

“Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050”? Con questo titolo, nel 2016 Kraker e collaboratori hanno pubblicato un articolo, richiamando ricercatori, microbiologi, clinici, epidemiologi e politici alla responsabilità di agire ora, e agire correttamente, per il controllo delle infezioni da germi multi resistenti, partendo da dati di sorveglianza alla portata di tutti e includendo tutti i contesti socio-sanitari presenti al mondo. Gli autori hanno impostato il loro lavoro sulla discussione delle previsioni di Jim O’Neill (2014), che aveva sollevato il dibattito sulla sempre più elevata mortalità da tali patogeni, stimando livelli sempre crescenti anche nei paesi in via di sviluppo (*figura 1*) e prefigurando il ritorno all’ “era oscura” della medicina, o era “post-antibiotica”.

*Figura 1 - Stima della mortalità da infezioni da germi multi resistenti nel 2015 in confronto alle altre patologie diffuse (O’Neil, 2014)*



Al di là dell'accuratezza di tali previsioni, la sempre più limitata disponibilità di antibiotici per alcuni germi rilevanti come *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e la non congruente risposta da parte degli enti di ricerca con nuove molecole efficaci su questi patogeni, rendono l'epidemia da germi multi-resistenti un problema sempre più allarmante. I dati europei e mondiali rilevano picchi di prevalenza di antibiotico-resistenza fino al 50% in caso in contesti selezionati (WHO, 2014), riducendo quindi la scelta di terapie antibiotiche orali di prima linea per alcune infezioni acquisite in comunità e sempre meno opzioni anche tra terapie più avanzate in caso di infezioni nosocomiali. Particolare attenzione viene posta ai ceppi di *K. pneumoniae* resistenti ai carbapenemici, rilevati in tutte le regioni valutate nel report WHO (2014) e registrata con tassi maggiori del 5% nel contesto Europeo (figura 2).

Figura 2 - Prevalenza al 2013 e trend dal 2009 al 2013 della resistenza agli antimicrobici in Europa (ECDC, 2016)



Il problema è di portata mondiale, ma soprattutto multidisciplinare, perché l'epidemia implica impiego di risorse economiche, risorse umane e strumentazioni all'avanguardia sempre crescenti, allo scopo di diagnosticare, trattare e soprattutto contenere la diffusione di tali infezioni (Stewardson, 2016).

Già da tempo, sono stati individuati i maggiori determinanti di resistenza (Segal-Maurer et al, 1996), tra cui si annoverano:

- L'aumento della popolazione ad alto rischio di infezione (immunocompromessi)
- L'aumentata sopravvivenza dei soggetti con malattie croniche che richiedono terapie e ospedalizzazioni prolungate
- La presenza di luoghi di congregazione che fungono da reservoir di batteri multi resistenti
- L'eventuale mancanza di una rapida diagnosi batteriologica
- L'eccessivo uso di antibiotici.

Qualsiasi uso di antibiotici, seppur appropriato e conservativo, può contribuire allo sviluppo di resistenza, ma in generale l'uso diffuso ed eccessivo, sia in ambito umano che veterinario, sta aggravando sicuramente il fenomeno. L'abuso e il misuso degli antibiotici è facilitato dalla loro pronta disponibilità anche senza prescrizione, e dalla scarsa cultura, anche della classe medica, nel campo dell'antibioticoterapia. Nessuna disciplina e nessun contesto geografico si può ritenere libero da tale rischio: la rapidità e la quantità di viaggi, anche intercontinentali, crea oggi nuove opportunità di diffondere i meccanismi di resistenza e di scambiarsi (da parte dei ceppi batterici) materiale genetico creando nuove specie (WHO, 2014).

## LE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI ESPRESSE DAI BATTERI GRAM-NEGATIVI

Come già sottolineato, lo sviluppo delle resistenze agli antibiotici è un fenomeno complesso e variegato, diversificato per specie batterica e per tipo di molecola antimicrobica considerata. La presente descrizione si concentra sui batteri Gram-negativi, che sono stati oggetto dello studio ivi presentato.

Uno ceppo batterico è definibile come resistente ad una molecola antimicrobica quando riesce a replicare in presenza di concentrazioni di farmaco normalmente funzionanti e ad un dosaggio entro i limiti dell'impiego terapeutico. L'antibiotico-resistenza può essere naturale o acquisita. La resistenza naturale è una caratteristica intrinseca della specie considerata, per cui alcune molecole antibiotiche risultano inattive. Le resistenze naturali di alcuni germi Gram-negativi sono rappresentate nella *tabella 1*. La resistenza acquisita, invece, è tale perché selezionata in seguito ad una precedente esposizione del patogeno all'antibiotico. E' una proprietà che può in alcuni casi essere anche geneticamente trasmissibile, per via verticale alla progenie batterica o orizzontale da un microrganismo all'altro, a patto che la mutazione non alteri in maniera apprezzabile la virulenza del ceppo di origine.

*Tabella 1 - Resistenze naturali ad alcuni antibatterici da parte di alcuni enterobatteri e Pseudomonas (intrinsecamente resistenti a penicillina G, glicopeptidi, linezolid, daptomicina, rifampicina, lincosamidi, macrolidi) - adattata da Leclercq, 2013*

Batterio	Ampicillina	Amoxicillina/clavulan	Piperacillina	Cefotaxime	Ceftriaxone	Ceftazidime	Ertapenem	Aminoglicosidi	Tetracicline/tigeciclina	Polimixime	Nitrofurantoina
<i>Enterobacter spp.</i>	R	R									
<i>Klebsiella spp.</i>	R		R								
<i>Morganella morganii</i>	R	R							R	R	R
<i>Proteus mirabilis</i>									R	R	R
<i>Providencia spp.</i>	R	R						R		R	R
<i>Serratia marcescens</i>	R	R								R	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R		R	R		R		R		R

I meccanismi principali di resistenza acquisita agli antibiotici sono rappresentati da: la modifica del target batterico, la produzione da parte del batterio di enzimi inattivanti

l'antibiotico, la ridotta permeabilità all'antibiotico e l'efflusso dell'antibiotico dalla cellula grazie ad un sistema di pompe attive. Ogni singolo microrganismo può esprimere contemporaneamente più di un meccanismo di resistenza, ottenendo dal punto di vista clinico il possibile fallimento della terapia impostata. Gli esempi sono molteplici, come nel caso dell'inattivazione del farmaco da parte di enzimi, ove si annoverano molte resistenze espresse dai batteri Gram-negativi (beta-lattamasi, carbapenemasi, etc.). Ai fini di questa introduzione, essi saranno analizzati separatamente per semplicità di sintesi.

### **1. Beta-lattamasi e carbapenemasi**

La beta-lattamasi rappresenta il meccanismo di resistenza principale nelle *Enterobacteriacee*, ed è mediato da enzimi che tagliano l'anello beta-lattamico e inattivano le penicilline. Negli ultimi decenni, in *K. pneumoniae* ed *E. coli* sono comparsi enzimi capaci di distruggere anche le cefalosporine di terza generazione, chiamati beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL). Esistono poi altri tipi di beta-lattamasi ad ampio spettro, espresse sia in *Enterobacteriacee* che nelle specie di Gram-negativi non fermentanti, che esprimono quadri di resistenza variegato, con profili di sensibilità variabili. Un esempio è dato dall'enzima chiamato AmpC-beta-lattamasi, espresso anche nei ceppi di *P. aeruginosa* e in tal caso presenti stabilmente o de-reprimibili in presenza di antibiotici beta-lattamici. In presenza di questo fenomeno, i germi produttori risultano resistenti alle molecole inibite dalle ESBL più le combinazioni contenenti gli inibitori suicidi delle beta-lattamasi come acido clavulanico, tazobactam e sulbactam. Infine, è sempre più frequente la produzione da parte delle *Enterobacteriacee* di enzimi che hanno la capacità di idrolizzare tutti i beta-lattamici, inclusi i carbapenemici, tra cui sono annoverate le Metallo-Beta-Lattamasi (MBL) e le *Klebsiella pneumoniae*-carbapenemasi (KPC).

Le beta-lattamasi sono state classificate in modi diversi a seconda delle somiglianze dal punto di vista genotipico e la tipologia di idrolisi espressa (Ambler, 1980; Hall and Barlow, 2005), o a seconda del substrato d'azione e la presenza o meno di inibizione da

parte dell'acido clavulanico (Bush and Jacoby, 2010) (tabella 2). Le tipologie sono molteplici anche all'interno dello stesso profilo fenotipico di sensibilità, richiedendo l'eventuale esecuzione di test di conferma in caso di resistenza alle beta-lattamine.

Tabella 2 - Classificazione delle principali beta-lattamasi espresse da ceppi di Enterobacteriacee (adattata da Saini and Bansal, 2012)

Tipologia	Classe di Amber	Gruppo di Bush	Substrato
ESBL	A	2be	Penicilline, cef di 3 <sup>a</sup> gen
KPC	A	2f	Tutti i beta-lattamici
Carbapenemasi (MBL)	B	3	Tutti i beta-lattamici
AmpC	C	1	Penicilline, cefamicine, cef di 3 <sup>a</sup> gen
OXA ESBL OXA carbapenemasi	D	2d	Penicilline, cef di 3 <sup>a</sup> gen Tutti i beta-lattamici

Al di là delle classificazioni e della nomenclatura, dal punto di vista sia microbiologico che clinico la conoscenza delle caratteristiche di tali enzimi di resistenza è molto importante, data la complessità della rilevazione in alcuni fenotipi intermedi in vitro e la particolare virulenza di alcuni ceppi. Inoltre, assumono importanza dal punto di vista dell'interpretazione dei test di sensibilità alcuni fenomeni correlati all'espressione di ESBL, come l'effetto inoculo. Infatti, l'espressione enzimatica appare essere *in vitro* correlata alla quantità di batteri presenti, essendo evidente nel momento in cui agisce. Pertanto, solo se ci sono grandi quantità di batteri che rilasciano, una volta morti, i loro enzimi, si potrà vedere un effetto inibente l'antibiotico, dando risultati diversi a seconda della quantità di batteri che viene considerata (Pfaller and Segreti, 2006). Un esempio di tale fenomeno è dato da piperacillina/tazobactam e cefepime, entrambi battericidi su *K. pneumoniae* produttore di ESBL ad inoculo standard, ma non con alte concentrazioni batteriche. Tali condizioni possono influenzare il risultato del test di sensibilità *in vitro* e pertanto la scelta clinica, pur non essendo certi che l'effetto inoculo poi risulti in un corrispettivo altrettanto efficiente *in vivo* (Tascini, 2008).



Infine, alcune beta-lattamasi come AmpC possono generare da diversi tipi di mutazione, cromosomica o plasmidica, con differenze che possono provocare poi l'eventuale derepressione in caso di uso di cefalosporine, e dunque un aumento drammatico delle MIC durante il trattamento (Tamma et al, 2013). Anche per tale motivo, le indicazioni dell'AMCLI sulla refertazione dell'antibiogramma prevedono la segnalazione nel referto del tipo di resistenza rilevata ed eventualmente confermata dai test di resistenza, allo scopo di prevedere eventuali fallimenti terapeutici altrimenti non prevedibili da MIC favorevoli.

Non va dimenticato comunque che nell'interpretazione dei fenotipi possono coesistere differenti meccanismi nello stesso batterio, e che esiste l'associazione tra produzione di beta-lattamasi e altri meccanismi di resistenza come la perdita delle porine di membrana, con perdita di efficacia dei carbapenemici. La produzione di ESBL e AmpC ha reso inefficaci molte molecole che sono state utilizzate nella terapia empirica o come prima linea nelle infezioni anche gravi causate dagli enterobatteri: cefalosporine, monobattami, e le associazioni tra beta-lattamico e inibitore suicida delle penicillinasi. Inoltre, questi ceppi spesso presentano resistenze anche ad altre molecole come gli aminoglicosidi, i chinoloni e il cotrimossazolo. Nei ceppi di batteri che esprimono beta-lattamasi a spettro esteso che escludano l'uso delle cefalosporine come quelle sopra riportate, pertanto, spesso i carbapenemi rappresentano una terapia di scelta cruciale. Purtroppo però, proprio a causa dell'alto uso empirico di queste molecole dovuto all'incremento delle resistenze suddette, si è osservato un incremento costante della selezione di ceppi produttori di carbapenemasi, giungendo al punto di dover fronteggiare germi Gram-negativi estremamente resistenti (XDR) ove risultano sensibili solo una o due classi terapeutiche. (Paterson, 2007).

La resistenza ai Carbapenemici è un fenomeno molto complesso, per la tipologia variegata dal punto di vista genotipico, l'associazione con altri tipi di resistenza, la possibilità di presenza dei geni su elementi mobili e pertanto trasmissibili e la variabile espressione fenotipica. Sia nelle *Enterobacteriacee* che in *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, infatti, la MIC rilevata nell'antibiogramma può variare moltissimo in presenza di questi enzimi, a seconda dell'espressione del gene e/o della presenza di

altri meccanismi di resistenza. Inoltre, la giusta rilevazione delle carbapenemasi ha sicuramente un valore clinico, ma anche un valore epidemiologico/igienico per l'identificazione di cluster di trasmissione e l'implementazione dei sistemi di contenimento di tali infezioni (Sanmarco et al, 2014). Infine, tali enzimi hanno purtroppo la capacità naturale di presentarsi in forma plasmidica e dunque di passare in specie batteriche differenti anche nello stesso paziente: questo ha portato alla diffusione di cluster epidemici che devono essere assolutamente contenuti in ambito nosocomiale.

Le opzioni terapeutiche nei casi di ceppi resistenti ai carbapenemici sono tutt'ora in fase di discussione, a causa del limitato numero di antibiotici sensibili e l'attuale mancanza di evidenza per quanto riguarda le strategie ottimali. Sicuramente, dal momento che la presenza di KPC o MBL conferisce resistenza a tutte le penicilline, cefalosporine e carbapenemici, l'antibiogramma dovrà considerare il profilo di sensibilità di altre molecole come aminoglicosidi, colistina, tigeciclina e fosfomicina per guidare il clinico verso altre opportunità terapeutiche. Purtroppo a riguardo mancano studi randomizzati che supportino la correttezza di questo approccio, ma nella pratica si tende ad utilizzare combinazioni di due o tre farmaci, anche a causa dell'elevata mortalità in caso di sepsi da germi multiresistenti (Livermore et al, 2011; Tumbarello et al, 2012; Meletis, G., 2016). L'associazione si basa abitualmente su un antibiotico principale che appare sensibile all'antibiogramma ("cornerstone antibiotic") associato ad un secondo antibiotico ("adjuvant drug") sensibile o no in vitro ma possibilmente sinergico con il precedente (Zavascki et al, 2013). L'obiettivo finale è di massimizzare la rapidità dell'eradicazione dell'infezione e trattare il paziente, riuscendo al contempo a ridurre la durata della terapia antibiotica e dunque gli effetti a lungo termine di tossicità (es. colistina o aminoglicosidi). Tali terapie, possono essere considerate di "terza linea", in quanto basate tutt'ora sull'expertise del clinico e dati da studi in vitro e non su solidi dati scientifici provenienti da studi randomizzati e meta-analisi.

## **2. Resistenza ai chinoloni**

Nonostante le premesse ottime di questa classe di antibiotici dal punto di vista di efficacia e tollerabilità, già da due decenni ormai la diffusione della resistenza ai

chinoloni è drammatica, soprattutto in alcune specie batteriche come *E. coli* e *K. pneumoniae* (ECDC, 2016).

I meccanismi di resistenza ai chinoloni sono fondamentalmente tre: l'insorgenza di cambiamenti conformazionali della DNA girasi che riducono la capacità di legame con il farmaco, la modificazione della permeabilità delle membrane esterne (riduzione delle porine), e il trasporto attivo al di fuori del batterio mediante sistemi di efflusso. Purtroppo, per l'insorgenza di resistenza basta anche solo una mutazione puntiforme, ed è inoltre presente un meccanismo mediato da plasmidi, che risulta pertanto trasmissibile da ceppo a ceppo ed infatti appare in trend di continua crescita. In particolare, questo accade tramite tre tipi di meccanismi di base: la produzione del pentapeptide della proteina *Qnr* (con conferimento di diretta protezione della topoisomerasi), la produzione della pompa di efflusso *QepA* e *Oqx* e la produzione della variante della aminoacetyltrasferasi *AAC(6')-Ib-cr*, che inattiva i chinoloni tramite acetilazione (Strahilevitz et al, 2009).

Usualmente, questo tipo di mutazioni porta all'aumento delle MIC di 4-8 volte, influenzandone severamente l'efficacia, ma accade che talvolta le MIC rimangano ancora nel range di sensibilità. In tal caso, apparirebbe un margine nell'uso delle molecole nella pratica clinica, ma gli studi presenti al momento dimostrano che la presenza delle mutazioni suddette predice in ogni caso un fallimento terapeutico. (Leclercq, 2013; Jacoby, 2005). Per tale motivo, è stata ridiscussa da EUCAST la definizione dei breakpoints per i chinoloni, per ridurli drasticamente a valori che permettano di identificare tutti i ceppi resistenti, compresi quelli con indici di predizione di fallimento terapeutico anche in presenza di MIC apparentemente favorevoli.

### **3. Resistenza agli aminoglicosidi**

Gli aminoglicosidi mantengono un ruolo chiave nella terapia antibiotica dei Gram-negativi, soprattutto nei regimi di associazione, nonostante il profilo di tossicità sia meno scervo da rischi rispetto alle precedenti classi terapeutiche. Tuttavia, anche per

queste molecole esistono molteplici meccanismi di resistenza, tra cui la mancata penetrazione dell'antibiotico attraverso la membrana esterna, la bassa affinità del farmaco per il ribosoma batterico, l'inattivazione del farmaco da parte di enzimi microbici e la mancata penetrazione dell'antibiotico attraverso la membrana interna batterica.

In generale, comunque, l'inattivazione del farmaco tramite fosforilazione e acetilazione costituisce il meccanismo più importante, e spesso legato anche ad una resistenza ad altre classi terapeutiche, come i chinoloni.

#### **4. Note sui meccanismi di resistenza legati a *Pseudomonas aeruginosa* e implicazioni cliniche**

*Pseudomonas aeruginosa* è un germe non fermentante che assume spesso un ruolo chiave nelle infezioni nosocomiali, a causa dell'elevata trasmissibilità e capacità di sviluppare meccanismi di difesa nei confronti delle molecole antimicrobiche. Infatti, oltre alla naturale resistenza intrinseca a diverse classi terapeutiche, il batterio è in grado di sviluppare, anche in corso antibiotico-terapia, resistenze legate all'induzione di enzimi (come AmpC) o di pompe di efflusso, che ne inficiano la sensibilità soprattutto nei riguardi di beta-lattamici e fluorochinoloni (Tascini, 2008).

La ridotta permeabilità della membrana esterna dei Gram-negativi è un meccanismo comune di resistenza agli antibiotici: normalmente queste molecole passano la membrana attraverso canali proteici detti porine, che in *P. aeruginosa* possono essere mutate, come nel caso della resistenza ai carbapenemici.

La facilità di induzione di resistenze e l'ampio spettro dell'espressione delle stesse sta portando ad un incremento dei ceppi multiresistenti (MDR), ove spesso esiste resistenza alla maggior parte delle classi salvo le polimixine (Vasoo et al, 2015). Per tali motivi, in caso di infezione invasiva da *Pseudomonas* si suggerisce spesso una terapia di associazione, allo scopo di abbattere rapidamente la carica batterica e ridurre il rischio di selezione di mutazioni di impatto clinico.

## **METODICHE DI RILEVAZIONE DELLE RESISTENZE BATTERICHE**

La valutazione del profilo di suscettibilità degli isolati batterici è tra le responsabilità principali del laboratorio di microbiologia clinica. Se l'isolamento del microorganismo responsabile dell'infezione è cruciale per la diagnosi microbiologica, a questo seguono poi l'identificazione del livello di specie, la selezione dell'appropriata batteria di antibiotici e l'evidenziazione della sensibilità batterica secondo i criteri orientati alla terapia. Tale percorso risulta elaborato ma fondamentale, anche dato il contesto sopra descritto, con profili di resistenza complessi e sempre più diffusi. Infatti, è sempre più impellente la necessità di intensificare la terapia antibiotica, con l'uso di farmaci di seconda e terza linea, che devono essere necessariamente valutati con test di suscettibilità affidabili (Jenkins et al, 2012).

La diagnostica di laboratorio, per quanto riguarda l'identificazione di specie e delle resistenze batteriche, ha subito importanti cambiamenti legati alle nuove scoperte scientifiche e alla necessità di fornire un referto sempre più preciso ed in tempi sempre più brevi. Nonostante ciò, la coltura e le sotto-colture batteriche, con i metodi tradizionali di rilevazione delle resistenze, rappresentano ancora il gold standard diagnostico. Tuttavia, tali metodi, specialmente nel caso di batteri esigenti (lunghi tempi di replicazione, esigenze nutrizionali complesse, mancanza di terreni idonei alla crescita in vitro) e nel caso in cui sia già in corso una terapia antibiotica, possono dimostrarsi fallimentari e prolungare la diagnosi definitiva e il trattamento del paziente. Contemporaneamente dunque al miglioramento delle tecniche tradizionali come l'introduzione dell'automazione delle emocolture e metodiche rapide di rilevazione fenotipica, i laboratori di microbiologia clinica stanno implementando i test basati sugli acidi nucleici sia per l'identificazione di specie che per la rilevazione dei meccanismi di resistenza batterici. Nei prossimi paragrafi, saranno analizzati i vantaggi e gli svantaggi dei metodi di rilevazione delle resistenze batteriche attualmente in uso, in routine o per applicazioni innovative. La saggezza del microbiologo clinico sta nell'integrazione tra le varie opportunità, a seconda delle risorse, delle esigenze del laboratorio, ma soprattutto del rischio clinico del paziente.

## 1. Metodi fenotipici tradizionali

I test di sensibilità fenotipici, cosiddetti “convenzionali” evidenziano l’azione degli antibiotici sulla crescita dei batteri, e rilevano il fenotipo di resistenza, riflettendo l’espressione della resistenza codificata da materiale genetico. Tramite tali test è possibile determinare pertanto l’antibiogramma, ad indice dell’efficacia antimicrobica di un farmaco nei confronti dello specifico patogeno. I vantaggi del metodo tradizionale sono tutt’ora molteplici: sono eseguiti in condizioni standardizzate per garantirne la riproducibilità dei risultati, sono economiche e permettono di predire il successo o il fallimento in vivo della terapia antibiotica.

I metodi attualmente in uso per la rilevazione di tali parametri sono la brodo diluizione (micro e macro-metodo) e la diffusione in agar (Kirby-Bauer).

I test di antibiotico-sensibilità mediante diluizione valutano la sensibilità o la resistenza ad ogni singola molecola antibiotica, sulla base della presenza o meno di crescita in un terreno di coltura (solido o liquido) contenente diverse concentrazioni del farmaco. Tramite tali test è possibile evidenziare:

- la Minima Concentrazione Inibente (MIC): misura quantitativa dell’attività di un antibiotico verso un determinato batterio, definita come la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica visibile
- la Minima Concentrazione Battericida (MBC): definita come la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica di almeno il 99.9% della popolazione iniziale.

La diluizione in brodo è ampiamente diffusa nella pratica clinica e attualmente risulta il gold standard per la refertazione dell’antibiogramma, in quanto è un metodo quantitativo (cioè consente di determinare accuratamente oltre alla MIC anche la MBC), valido e preciso (riproducibile). Per la valutazione dell’antibiotico-sensibilità tramite tale metodo è attualmente largamente in uso la tecnica di micro-diluizione mediante la sospensione di brodo in micro pozzetti con fondo a U, che valuta l’intorbidimento del brodo o la formazione di sedimento sul fondo dei pozzetti per la determinazione della MIC (*figura 3*). Presso il Servizio di Microbiologia dell’Azienda

Ospedaliera di Padova, è in utilizzo routinario il sistema Sensititre ARIS® (Automated Reading and Incubation System), modulo automatico per la manipolazione, l'incubazione e la lettura di piastre di micro titolazione a 96 pozzetti (Thermo-scientific, 2016). Tale sistema, testato su ceppi di *Enterobacteriacee*, *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter spp* per la suscettibilità alle principali beta-lattamine (Amoxicillina, Amoxicillina/acido clavulanico, Piperacillina/tazobactam, Cefotaxime e Meropenem) ha dimostrato valori di concordanza rispetto al gold standard compresi tra il 93 e 99% (Olesiuk et al, 2015; Maysent et al, 2017) e valori di riproducibilità  $\geq$  al 95% (Thermo-scientific, 2017).

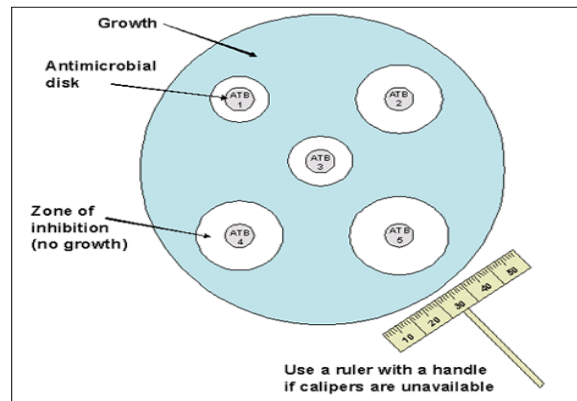
Figura 3 - Piastra per l'esecuzione del test di suscettibilità tramite MIC - Thermo Scientific Sensititre (da Maysent, 2017)



Per quanto riguarda la diffusione su disco in agar, invece, la metodica consiste nella semina di una brodo-coltura batterica su cui vengono poi applicati dei dischetti di carta da filtro sterili perfettamente aderenti contenenti una concentrazione nota e standard di antibiotico. L'antibiotico presente sul disco diffonde nel terreno di coltura in rapporto alla diffusibilità dopo incubazione a 37°C per 18-24h. Tramite dunque la misurazione del diametro dell'alone di inibizione, si ottiene un risultato qualitativo con la categoria di sensibilità (*figura 4*). Tale metodica è semplice, rapida ed economica, valida per microrganismi aerobi a crescita rapida. Attualmente il test di diffusione su dischetto più utilizzato è il metodo di Kirby-Bauer, sviluppato agli inizi degli anni '60. Tra i vantaggi sono inclusi il fatto che sia una tecnica standardizzata (CLSI, 2014), che permette una certa flessibilità nella scelta degli antibiotici ed una certa facilità di esecuzione, permettendo di correlare i risultati ottenuti in vitro (antibiogramma) con la risoluzione clinica (risultati in vivo). Purtroppo, al contrario del test con micro- brodo-

diluizione, sussiste un'impossibilità di automatizzare la procedura e di fornire risultati quantitativi.

*Figura 4 - schema esplicativo del test di diffusione in agar (dopo incubazione): posizionamento approssimativo dei dischetti e misurazione del diametro della zona di inibizione (CDC, 2016)*



Infine, tra i test fenotipici attualmente in uso si ricorda l'E-test, o Epsilon-test (dalla forma dell'alone di inibizione), metodo quantitativo per la determinazione della MIC tramite l'uso di strisce di plastica di 5 x 50 mm contenenti un gradiente corrispondente a 15 concentrazioni di antibiotico al raddoppio (in mg/ml). La tecnica di semina a tutta piastra è analoga a quella dell'antibiogramma per diffusione secondo Kirby-Bauer, con deposizione poi delle strisce antibiotizzate sulla superficie della piastra inoculata ed incubazione a 37°C per 18-24 ore. La lettura della MIC si effettua dove la crescita batterica interseca la striscia.

Per l'interpretazione di questi test, esistono degli organismi internazionali (CLSI ed EUCAST), che forniscono linee guida per effettuare i test di sensibilità e per interpretarli (CLSI, 2017; EUCAST, 2017), con differenze variabili a seconda del tipo di patogeno considerato. Essi sono determinati sulla base della farmacocinetica e farmacodinamica degli antibiotici e la correlazione tra risultati in vitro (MIC) e risultati in vivo (risoluzione del caso clinico). In particolare, le categorie interpretative (Sensibilità, Sensibilità Intermedia e Resistenza) sono individuate da valori di MIC detti "breakpoints" (traduzione di soglia, limite), che provengono da una sorta di mediazione tra aspetti clinici, epidemiologici e metodologici. I valori standard di



sensibilità variano per ciascun microrganismo e sono basati sulla concentrazione plasmatica di farmaco che può essere raggiunta senza la comparsa di effetti tossici. Un patogeno si definisce pertanto:

- Sensibile: quando l'infezione causata da quel ceppo può essere adeguatamente trattata con il dosaggio di un agente antimicrobico comunemente raccomandato per quel tipo di infezione
- Intermedio: quando la crescita batterica è inibita solo al dosaggio massimo raccomandato; gli isolati batterici mostrano MIC corrispondenti a livelli sierici e tissutali di antibiotico per i quali l'efficacia potrebbe essere più bassa di quella registrata per gli isolati sensibili
- Resistente: quando l'antibiotico testato potrebbe fallire in vivo ai dosaggi di non tossicità in quanto i ceppi non sono inibiti alle concentrazioni sistemiche di antimicrobico raggiungibili di solito con i normali dosaggi.

In Italia sono utilizzati i breakpoints individuati da EUCAST, innovati e differenziati rispetto a CLSI nel 2011 e aggiornati annualmente anche sulla base del cosiddetto cut-off epidemiologico, che è definibile come la concentrazione che separa la popolazione wild-type (toti-sensibile) da quella che invece esprime i meccanismi di resistenza. Il cut-off epidemiologico può coincidere con il breakpoint clinico oppure differire, in base a fattori farmacocinetici e/o farmacodinamici. Per la lettura dell'antibiogramma, nel contesto dei breakpoints EUCAST, la lettura acritica secondo i valori di MIC e categorizzazione non è stata più ritenuta sufficiente nel lavoro del microbiologo clinico. Infatti, in alcuni casi, la refertazione di sensibilità alla singola molecola antibiotica poteva essere confondente se il ceppo poi esprimeva nel contesto dell'antibiogramma completo la presenza di meccanismi di resistenza che potevano predirne il fallimento *in vivo* (es. ESBL). A tale scopo, sono state rese disponibili le cosiddette "expert-rules", ovvero una raccolta di regole che hanno permesso di guidare una terapia antibiotica razionale sulla base di conoscenze legate alle resistenze intrinseche del ceppo considerato, i fenotipi eccezionali di resistenza e le regole interpretative utilizzate. La revisione dei breakpoints in questi casi hanno dimostrato una correlazione più precisa

tra valori di MIC ed effetto clinico considerato. Scopo finale di tale indicazioni è la riduzione degli errori di prescrizione grazie al riconoscimento del tipo di resistenza espressa dal ceppo (EUCAST, 2017).

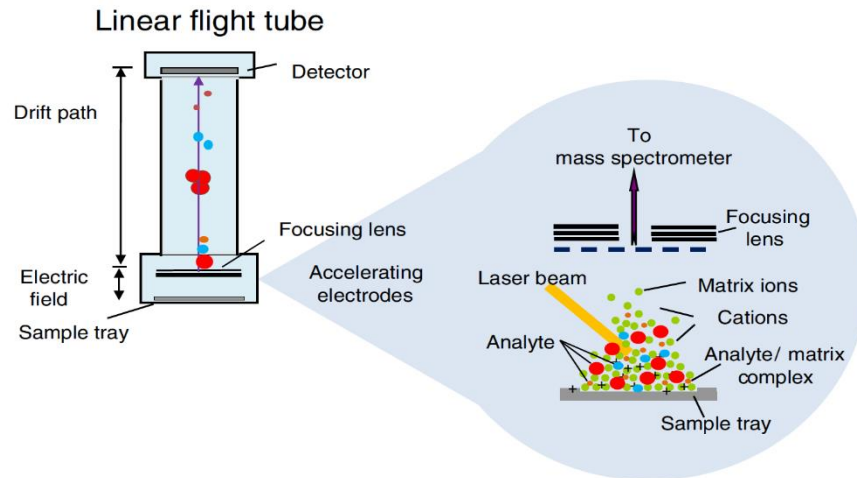
Si segnala infine che, recentemente, è stata aperta una consultazione per la revisione della definizione di categoria intermedia che è stata ampiamente discussa perché in alcuni casi confondente (EUCAST, 2017): tale modifica eventuale potrebbe portare ad una sostanziale modifica dell'interpretazione degli antibiogrammi, riducendo quel "I don't know" che spesso è di difficile interpretazione da parte dei clinici (pag. 1). Per il presente studio, è stata ovviamente utilizzata la definizione tradizionale, sia per quanto riguarda la refertazione che l'analisi dei dati.

## **2. Spettrometria di massa (MALDI-TOF)**

Il sistema di spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time Of Flight) è una metodica adottata nei laboratori di microbiologia clinica nella routinaria identificazione dei microorganismi.

Esso si basa su una tecnica di ionizzazione che consente di analizzare composti poco volatili e termolabili, come le macromolecole biologiche ad elevato peso molecolare, senza provocarne la frammentazione (Brunelli T. et al., 2010). Lo spettrometro di massa è costituito da tre unità principali, ovvero 1) la sorgente di ioni (MALDI- Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) deputata alla ionizzazione del campione e al passaggio degli ioni campione in fase gassosa, 2) l'analizzatore di massa (TOF- Time Of Flight) che permette la separazione degli ioni in base al loro rapporto massa/carica ed, infine, 3) il detector per la rilevazione del segnale (Weiser et al, 2012, *figura 5*).

Figura 5 - Principio di funzionamento del MALDI-TOF (tratto da Wieser A. et al, 2012)



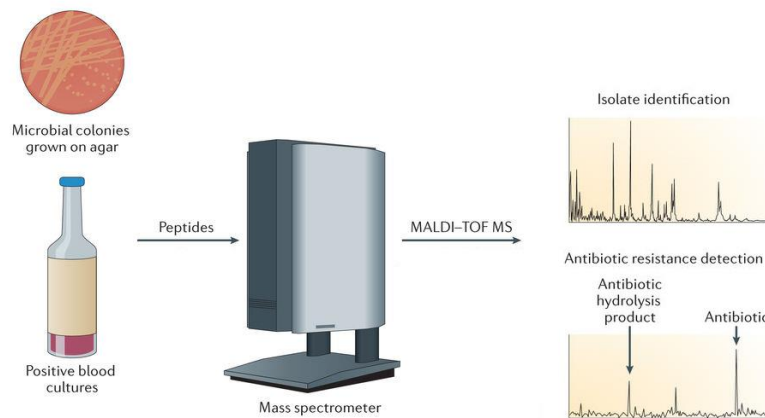
Grazie a tale metodica, è possibile identificare i microrganismi in pochi minuti, selezionando una singola colonia da campioni clinici e miscelandola ad un acido organico debole non volatile (matrice), con cromofori in grado di assorbire radiazioni UV e di formare cristalli. Le matrici più comunemente usate sono l'acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA) e l'acido 2,4-idrossifenil-benzoico (DHB): grazie alle loro proprietà intrinseche esse fungono da solvente per il campione e co-cristallizzano con esso al fine di formare una soluzione solida. Tale complesso viene sottoposto all'azione di un laser pulsato che lo disgrega e ionizza permettendogli di passare alla fase gassosa (desorbimento). I frammenti così ottenuti (spesso derivati dalle proteine ribosomiali o strutturali del batterio, vengono accelerati attraverso l'applicazione di un elevato campo elettrostatico e separati in base al rapporto massa/carica. L'analizzatore al termine del cilindro metallico sottoposto al vuoto ne calcola il tempo di volo (TOF) ed elabora i dati giunti al rivelatore, generando per ogni campione uno spettro con masse dai 2.000 ai 20.000 Da (Hillenkamp, 2007). Ottenuto lo spettro per il singolo ceppo analizzato, l'identificazione di specie (batterica o fungina) avviene attraverso un software che ne effettua il confronto con una banca dati contenente gli spettri di più di 500 specie di interesse clinico.

Il sistema MALDI-TOF ha in un certo senso rivoluzionato le procedure di identificazione di specie nei laboratori di microbiologia clinica, avendo un ottimo profilo di costo e

richiedendo una minima preparazione del campione (Brunelli T. *et al.*, 2010). Studi recenti hanno inoltre mostrato la possibilità di usare tale strategia anche nel riconoscimento di alcuni meccanismi di resistenza specifici. Le metodologie utilizzate, fin dal 2000, si basano sull'espressione proteica dei diversi ceppi microbici a seconda del loro profilo di suscettibilità (*figura 6*). Le scoperte scientifiche stanno evolvendo rapidamente, approfondendo l'uso della spettrometria di massa per l'identificazione di diversi microrganismi, soprattutto Gram-positivi, da *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (Edward-Jones et al., 2000), a *Enterococcus faecium* portatore di VanB (Griffin et al, 2012).

Le tecniche di identificazione valutate negli ultimi anni con la spettrometria di massa si basano soprattutto su due approcci diagnostici: il primo, definibile come "indiretto", si basa sulla ricerca della presenza o meno dell'idrolisi o la degradazione (es. carbossilazione) enzimatica degli antimicrobici di cui si vuole valutare la suscettibilità; il secondo, definibile come "diretto", si basa invece sulla presenza di eventuali enzimi o picchi proteici relativi a mutazioni enzimatiche specifiche.

*Figura 6 – Esempio di applicazione del MALDI-TOF MS per la rilevazione di specie e delle resistenze (modificato da Fournier et al, 2013)*



Per quanto riguarda il primo approccio, i risultati ottenuti sono stati discordanti, a causa di diversi fattori come la difficoltà a rilevare i picchi specifici di degradazione, la presenza di idrolisi spontanee, la possibilità di idrolisi parziali e l'estrema instabilità e

varietà dei prodotti di degradazione (Zbroromyrska et al, 2014). In merito all'approccio diretto, invece, sono presenti in letteratura solo studi preliminari, con risultati dall'interpretazione prematura, data l'alta variabilità dell'espressione enzimatica tra i vari microorganismi e all'interno del ciclo vitale del singolo microorganismo considerato (Weiser et al, 2012).

### **3. Metodi molecolari**

Anche se l'emocoltura e i test fenotipici per la rilevazione delle resistenze sono tutt'ora il gold-standard diagnostico, risulta cruciale la conoscenza dei limiti di tali tecniche, che richiedono lunghi tempi di incubazione e possono infine rivelarsi falsamente positivi in caso di terapia antibiotica in atto, volume di sangue insufficiente al momento del prelievo, intermittenza dell'agente patogeno in circolo e crescita di microorganismi con scarsa crescita nei terreni utilizzati in routine. Per questo, le tecniche di biologia molecolare risultano particolarmente attraenti, dati i brevi tempi di ottenimento dei risultati, in presenza di ottimi dati di sensibilità e specificità. Le metodiche attualmente disponibili in commercio possono essere distinte in due categorie: quelle basate sul principio di amplificazione del genoma batterico e quelle che sfruttano il principio dell'ibridazione.

Attualmente, la Polymerase Chain Reaction (PCR), è la tecnica di amplificazione degli acidi nucleici più largamente usata nel laboratorio microbiologico e che porta le maggiori applicazioni per la determinazione dei genotipi di resistenza. Il processo si fonda su tre momenti fondamentali che prevedono la separazione dei doppi filamenti di DNA ad una temperatura di oltre 90°C (denaturazione), l'appaiamento dei primers intorno ai 50-60°C (annealing) e l'allungamento della sequenza alla temperatura di 70-78°C (estensione). Per quanto riguarda l'applicazione in microbiologia clinica, sono stati messi a punto diversi test, che possono rilevare universalmente le sequenze genomiche del singolo patogeno, identificare specifici geni o ricercare simultaneamente bersagli di diversi patogeni per una diagnosi multipla (Mancini et al, 2008).

Questi test sono generalmente applicati alle emocolture positive ma potrebbero teoricamente essere usati per tutte le emocolture direttamente al momento della raccolta, fornendo dati di positività o negatività in poche ore (Opota et al, 2015). In realtà, oltre ai costi attualmente non sostenibili per la routine, già per l'identificazione essi presentano alcune limitazioni peculiari, specialmente legate alla possibilità di introdurre errori diagnostici severi.

In primo luogo, l'alta sensibilità di questi test può aumentare la percentuale dei falsi positivi: la presenza di DNA microbico nel sangue, infatti, non è necessariamente legata ad infezione, potendo essere la traccia di una batteriemia transiente o di un ceppo batterico non più vitale (Bullman, 2012). Il buon senso potrebbe indicare che la maggiore sensibilità della PCR nel rilevare concentrazioni anche molto piccole di DNA batterico dovrebbe essere valutata nel contesto clinico del paziente, così da considerare il risultato positivo della PCR alla luce della presenza o meno di focolai infettivi accertati (Bloos et al, 2009). Tale considerazione implica però una riorganizzazione del work-flow interdisciplinare che attualmente non è del tutto attuabile.

In secondo luogo, un altro svantaggio dei metodi basati sulla PCR è costituito dal limitato numero di specie che possono essere identificate, responsabili della maggior parte dei falsi risultati negativi osservati. Ad esempio, Lamoth e colleghi hanno ottenuto circa un 40% di risultati falsi negativi dovuti a microrganismi non inclusi nel set di identificazione del test SeptiFast® (Lamoth et al, 2010). I falsi negativi possono essere dovuti anche alla presenza di fattori inibenti, alla variabilità e i limiti intrinseci della PCR o a mutazioni del sito bersaglio (Lucignano et al, 2011).

Date queste premesse, appare chiaro il motivo per cui le metodiche colturali, seppur lente, restano tutt'ora il gold standard microbiologico. Per quanto riguarda poi la determinazione del profilo di sensibilità, i dati risultano ancora più controversi. Le metodiche molecolari permettono di individuare rapidamente alcuni determinanti fondamentali di resistenza agli antibiotici, permettendo una sorveglianza delle infezioni da germi multiresistenti e un'ottimizzazione della terapia antimicrobica senza

pari. Tuttavia, il cuore dei test molecolari resta il patrimonio genetico, e nonostante l'ottima sensibilità e specificità, impongono al microbiologo di rimanere nel contesto di "trovare ciò che viene cercato" (Bullman, 2012). Ciò significa che i test molecolari escludono per proprio principio la rilevazione di variabilità intrinseche, nuove mutazioni, e differenti espressioni fenotipiche. Tale fenomeno resta presente anche per soluzioni innovative sofisticate, come il sistema Film-Array® (BioMerieux) e il sistema Verigene® (Nanosphere) che permettono l'identificazione del patogeno e di alcuni suoi determinanti di resistenza nell'arco di 1-2 ore dalla positivizzazione dell'emocoltura. Il sistema Film-Array® è in grado di rilevare, anche da emocolture polimicrobiche, i principali patogeni Gram positivi e Gram negativi ma copre solo un numero limitato di determinanti di resistenza. Queste caratteristiche lo rendono interessante per la capacità di rilevare contemporaneamente più patogeni ma di utilità limitata perché non ricerca i geni per le ESBL. Il sistema Verigene®, rispetto al precedente, copre un repertorio di determinati di resistenza più ampi ma non è predisposto per la ricerca di infezioni polimicrobiche (Viaggi, 2016).

Infine, l'assenza di un determinato genotipo non implica necessariamente la presenza di sensibilità, che va dimostrata con i metodi colturali per poter essere validata. Questo aspetto rende profondamente diverso il concetto di "antibiogramma molecolare" da quello di "antibiogramma fenotipico": ancora una volta, biologia molecolare e metodi colturali possono essere integrati secondo il rischio clinico del paziente e la necessità di escludere alcune condizioni cruciali come può essere eventualmente la presenza o meno di carbapenemasi.

#### **1.3.4 Altre tecnologie diagnostiche**

In tempi recenti stanno emergendo nuove tecnologie alternative al metodo colturale, allo scopo soprattutto di accelerare la refertazione del risultato dell'emocoltura positiva. La tecnologia del light-scattering, per esempio, si basa sul monitoraggio della crescita batterica in un terreno molto ricco di nutrienti, mediante registrazione continua della torbidità del campione. Dal valore della torbidità è possibile creare una

curva di crescita (rispetto ad un controllo) che consente di dedurre la sensibilità o la resistenza del patogeno a vari antibiotici posti nel terreno, riducendo così a sole 4-6 ore l'esito dell'antibiogramma, rispetto alle 24 necessarie per la determinazione della MIC con metodo della brodo-diluizione. Questa tecnologia, di costi decisamente contenuti, ha tuttavia dei limiti che non la rendono applicabile in esclusiva nella pratica del laboratorio. Innanzitutto può essere utilizzata solo con batteri isolati in coltura o con campioni clinici monomicrobici, ma soprattutto fornisce solo informazioni qualitative e non i valori di MIC (Kroumova et al, 2010).

## **APPROCCIO CLINICO PER LA DIAGNOSI E CURA DELLE INFEZIONI DA BATTERI GRAM-NEGATIVI MULTIRESISTENTI E CENNI DI ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP**

Le nuove scoperte in campo medico e tecnologico stanno rapidamente stravolgendo il ruolo dell'infettivologo e del microbiologo clinico per quanto riguarda le infezioni invasive, specie quelle del torrente circolatorio. Gli aspetti da valutare sono molteplici e sono legati al tipo di pazienti trattati, i contesti di criticità e promiscuità, la crescente complessità dei patogeni conosciuti e le possibilità diagnostiche via via più avanzate. Per quanto riguarda i pazienti, negli ospedali e nei luoghi di cura si affrontano casi sempre più complessi, in età avanzata, con plurime comorbidità e nuove terapie che pongono la persona a rischio di acquisire infezioni. Dal punto di vista microbiologico, inoltre, il repertorio di patogeni e variabilità inter-specie è sempre più variegato, con crescente complessità di pattern di resistenza e loro rapida espansione. Il vasto utilizzo delle molecole antibiotiche, infatti, si sta accompagnando ad uno spostamento dei meccanismi di resistenza naturali di tipo cromosomico ad elementi genetici mobili sempre più evoluti, complessi ed efficaci. Come già descritto, fonte di grande preoccupazione rappresenta l'incremento dei ceppi di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemici e di Gram-negativi non fermentanti multiresistenti o addirittura panresistenti.



Per tale motivo, è richiesta una crescente sorveglianza pro-attiva delle colonizzazioni/infezioni da patogeni MDR, allo scopo di controllarne la diffusione e di gestire correttamente i pazienti secondo le regole dettate dalla conoscenza profonda del problema. In primo luogo, per esempio, risulta di fondamentale importanza la differenziazione tra colonizzazione e infezione. La colonizzazione è definita come la presenza di microrganismi a livello delle superfici cutanee, mucose o dei devices senza evidenza di invasione tissutale o reazione infiammatoria locale e/o sistemica, mentre l'infezione è data dalla presenza di microrganismi, con evidenza di invasione tissutale, moltiplicazione dei microrganismi, reazione infiammatoria locale e/o sistemica. La colonizzazione generalmente non va trattata, essendo più dannosa l'eventuale ulteriore pressione selettiva della terapia antibiotica, ma deve essere ugualmente indagata per il monitoraggio clinico, a scopo epidemiologico e soprattutto allo scopo di applicare le opportune precauzioni di contenimento di diffusione come le precauzioni standard e da contatto. Le infezioni vere e proprie, invece, vanno trattate secondo le pratiche guidate dall'evidenza, con particolare attenzione ai seguenti parametri: la scelta del farmaco o della associazione terapeutica a seconda dell'epidemiologia locale, il rischio clinico del paziente, la localizzazione dell'infezione, le concentrazioni plasmatiche e tissutali desiderate per quella determinata condizione e le relative considerazioni farmacocinetiche e farmacodinamiche del farmaco scelto. I cofattori di efficacia di una terapia antibatterica, infatti, sono intricati in un complesso "puzzle" dato da aspetti legati al patogeno (resistente o sensibile all'antibiotico), aspetti legati al paziente (con immunità normale o compromessa) e aspetti farmacologici (farmacodinamici e farmacocineticici). Tali aspetti non possono essere scissi l'uno dall'altro se si vuole ottenere la cura del singolo paziente con la strategia più adeguata a lui e il suo contesto (Pea e Viale, 2009).

Data la complessità della scelta antimicrobica, dunque, la controparte fondamentale dell'infettivologo risulta essere quella del microbiologo clinico, che, secondo le expert-  
rules e le competenze specifiche, può guidare non senza altrettante difficoltà l'orientamento terapeutico e il suo eventuale aggiustamento in corso d'opera. L'antibiogramma stesso infatti nell'ultima decade ha subito sostanziali modificazioni a

causa dell'avvento di nuovi farmaci, nuovi criteri di interpretazione delle MIC e l'eventuale necessità di inserire nelle strategie diagnostiche test di conferma e/o di sinergia. Tutte queste considerazioni si fondono con la pressante urgenza di ridurre i tempi di risposta per il miglioramento dell'outcome clinico (Bouza et al, 2004) e di ottimizzare le risorse disponibili utilizzandole ai livelli di totale efficienza data la necessità di contenere i costi.

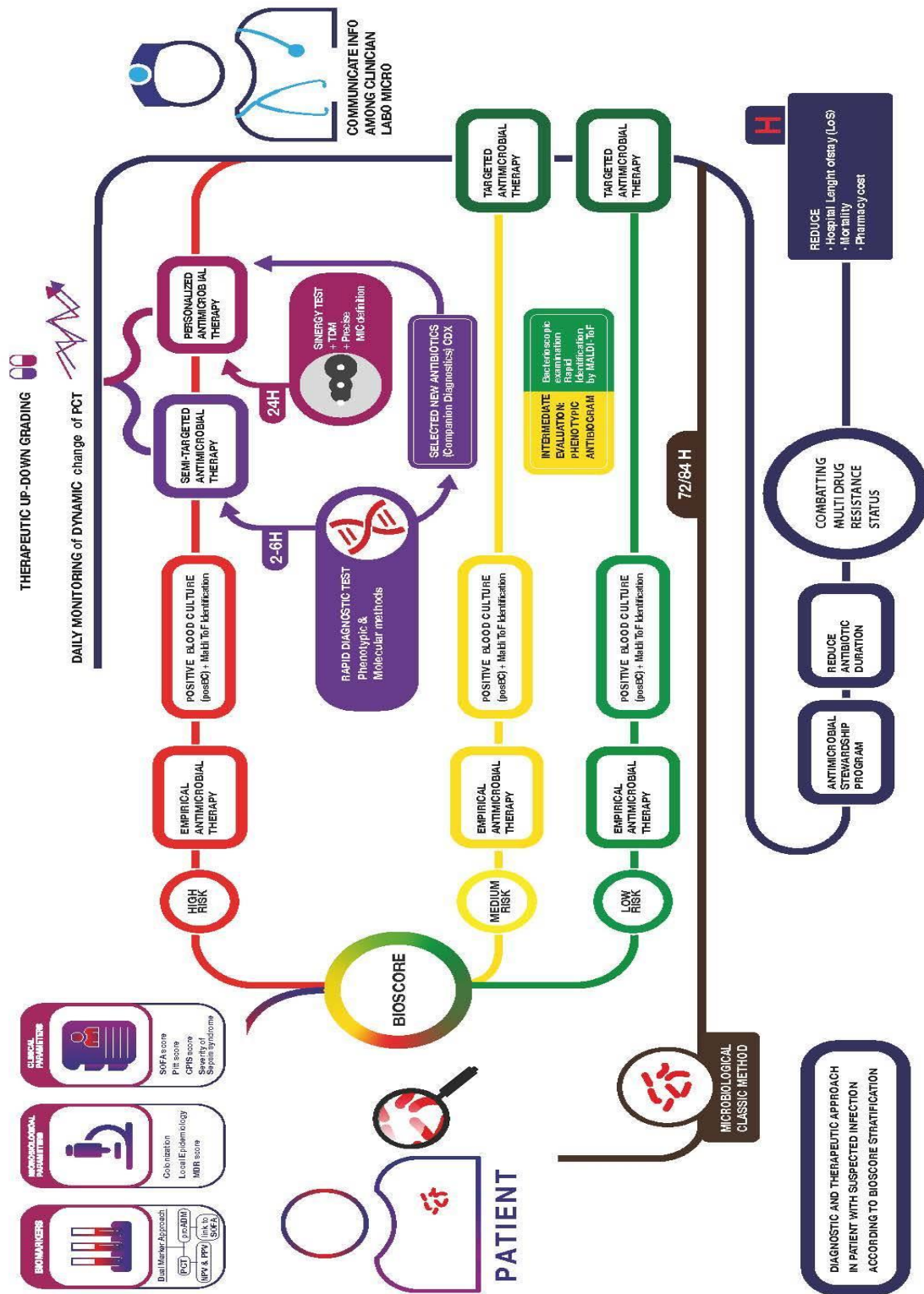
Essendo il problema particolarmente complesso, sono auspicabili pertanto, diverse possibili soluzioni (Delit et al, 2007). In estrema sintesi, la sorveglianza e l'educazione sono parte della risposta, insieme alla regolamentazione dell'uso degli antibiotici e la ricerca per svilupparne di nuovi. Per quanto riguarda i contesti nosocomiali, in particolare, sono di estrema rilevanza i programmi diretti al monitoraggio e l'orientamento dell'utilizzo dei farmaci antimicrobici, attraverso un approccio standardizzato che sia supportato dall'evidenza, più comunemente chiamati programmi di "antimicrobial stewardship". Tra le varie strategie incluse in tali programmi si annoverano (Finch and Hunte, 2006; WHO, 2014; ECDC, 2016):

- La creazione di team multidisciplinari aziendali per la sorveglianza e la creazione di linee guida condivise allo scopo di valutare l'epidemiologia locale e guidare la scelta terapeutica, con particolare attenzione alle profilassi chirurgiche
- L'implementazione delle strategie di controllo delle infezioni da germi multiresistenti, compresa l'igiene delle mani
- Il monitoraggio del consumo locale di antibiotici con stime accurate di costo-efficacia e la sorveglianza epidemiologica degli isolati microbiologici, con feedback periodici ai reparti
- Il controllo della prescrizione di farmaci a maggior impatto sulle resistenze e considerati di "salvataggio" come carbapenemici, colistina o di maggior costo
- L'implementazione di nuove strategie diagnostiche allo scopo di ridurre la tempistica di risposta analitica ("Turn Around Time")

- L'organizzazione del work-flow di laboratorio atto a fornire nel più breve tempo possibile una diagnosi eziologica e il relativo eventuale profilo di sensibilità del microorganismo responsabile
- La formazione del personale sanitario sui temi di antibioticoterapia e controllo delle infezioni da germi multi resistenti.

Naturalmente queste strategie comportano uno sforzo di natura non solo organizzativa, ma anche culturale: è necessario infatti cambiare la concezione del ruolo dello specialista in Malattie Infettive e in Microbiologia Clinica, riconoscerne la necessità e implementarne le competenze atte a collaborare a livello multidisciplinare. Se da una parte dunque l'automazione e l'implementazione del workflow diagnostico con le nuove metodiche sono attualmente la parte principale della trasformazione del laboratorio di microbiologia, al contempo sia per i clinici che per i microbiologi è richiesta un'expertise e una collaborazione senza precedenti. "Si può dire che ci troviamo di fronte ad una svolta, come negli anni dell'avvento dell'AIDS, nei quali cambiavano le pratiche sanitarie allo scopo di ridurre i rischi di contagio. In questi anni le misure di contenimento delle infezioni causate da germi contro i quali non abbiamo più strumenti antibiotici saranno viste alla stregua di interventi terapeutici veri e propri" (Tascini, 2008, p. 73). A tale proposito, sarà sempre più importante, nei casi di infezione invasiva, il passaggio da una "diagnostica per campione" ad una "diagnostica per paziente" (figura 7). Questo processo implicherà l'integrazione del risultato microbiologico (o meglio, dell'intero processo diagnostico) con altri parametri clinici, epidemiologici, e biochimici, allo scopo di offrire una diagnosi personalizzata, eventualmente anche tramite strumenti di "tele-microbiologia" (Schultsz et al, 2014). Questo processo implica obbligatoriamente una ridefinizione delle competenze ed una riorganizzazione dei flussi organizzativi diagnostici, verso una personalizzazione e una differenziazione dei percorsi suddivisi per criticità, intensità di cura, e presenza di note epidemiologiche significative. Meta di questa trasformazione sarà il miglioramento continuo della "qualità totale dell'assistenza" e l'ottimizzazione della terapia antimicrobica per quel determinato paziente in quel determinato contesto.

Figura 7 - Proposta di un workflow diagnostico nella diagnosi per il paziente con presunta infezione secondo stratificazione del rischio (tratto da Viaggi et al, 2017)



## **PROGETTO DI RICERCA 1**

**Validazione di un percorso diagnostico rapido  
delle emocolture per la valutazione della MIC  
nei batteri Gram-negativi**

## RAZIONALE DELLO STUDIO

La diagnostica delle infezioni batteriche si basa tradizionalmente sulla coltura dei materiali prelevati dalla sede di infezione, con tempi di risposta relativamente lunghi, che possono superare in alcuni casi anche le 72 ore, dipendendo dalla rapidità di crescita dei patogeni e dalle tecniche di identificazione utilizzati (Viaggi et al, 2016). A seconda del rischio clinico del paziente con infezione in corso, dunque, spesso la terapia va iniziata prima che il referto sia disponibile, imponendo al clinico una scelta empirica basata sulla presentazione clinica del paziente e l'epidemiologia del contesto in cui opera. Tale problema è ancora più evidente nel caso delle infezioni associate al torrente circolatorio, ove le tempistiche condizionano in modo cruciale l'outcome clinico: in uno studio pubblicato nel 2009, Kumar e collaboratori, infatti, riportavano un incremento di mortalità pari al 7.6% per ogni ora di ritardo nel somministrare una terapia efficace in corso di shock settico. Se da un lato dunque l'abuso/misuso degli antibiotici va combattuto con interventi educativi sul personale sanitario, dall'altro il microbiologo ha il dovere di fornire il più preciso risultato nel minor tempo possibile.

L'emocoltura rappresenta l'esame gold-standard nella diagnosi microbiologica delle infezioni del torrente circolatorio ma, ad oggi, presenta alcuni limiti. In presenza di emocolture positive, infatti, il maggior problema è rappresentato dal fatto che il referto definitivo contenente l'antibiogramma e l'identificazione della specie batterica non viene completato prima di 48 ore dal momento della positivizzazione della emocoltura. Vari autori hanno indagato nuovi percorsi di identificazione rapida del fenotipo di sensibilità, ma ad oggi la loro applicazione nella routine diagnostica non è attuabile per la scarsa versatilità, per il costo e/o per la difficoltà tecnica. Inoltre, non è presente al momento nessuna indicazione ufficialmente validata e riconosciuta per l'uso delle metodiche rapide di rilevazione delle resistenze nella real-life, lasciando alla responsabilità e all'esperienza del medico microbiologo l'adozione di protocolli operativi e la loro integrazione nel work-flow del laboratorio.

Per tali ragioni, presso il Servizio di Microbiologia dell’Azienda Ospedaliera di Padova, Dipartimento di Medicina Molecolare, si è formato un gruppo di ricerca, allo scopo di valutare e validare un percorso diagnostico innovativo rapido per l’esecuzione dell’antibiogramma, in grado di anticipare di circa 24 ore il percorso diagnostico tradizionale delle emocolture positive. Questa metodica è stata finora testata nei confronti dei batteri Gram-negativi aerobi, caratterizzati da una rapida crescita nei terreni di coltura standard e che rappresentano i principali patogeni più frequentemente implicati nelle infezioni life-threatening del torrente circolatorio. Sono stati scelti in particolare ceppi di *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, che sono attualmente il serbatoio principale dei meccanismi di resistenza epidemiologicamente e clinicamente rilevanti all’interno delle strutture sanitarie. Ai fini della validazione, tali ceppi selezionati sono stati analizzati in parallelo con il metodo rapido e con il metodo tradizionale di riferimento, adottato di routine nel laboratorio di Microbiologia dell’Azienda Ospedaliera di Padova e proposto dall’European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

# MATERIALI E METODI

## 2.1 Disegno dello studio e criteri di inclusione

Da giugno 2016 a luglio 2017, sono stati inclusi nello studio isolati batterici di bastoncini Gram-negativi selezionati nel corso della diagnostica microbiologica di routine effettuata presso il Servizio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova.

Criteri di inclusione nello studio sono stati i seguenti:

- Ceppi provenienti da campioni di urocoltura, tampone rettale, coltura da materiale respiratorio ed emocoltura
- Identificazione di specie positiva per *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*
- Presenza di fenotipi di resistenza variabili (toti-sensibili, multi resistenti, con profili di resistenza estesi-XDR)
- Antibiogramma eseguito secondo il metodo MIC in brodo diluizione

Per ogni ceppo incluso nello studio sono stati valutati e registrati i seguenti parametri: il profilo di identificazione eseguito secondo routine, lo spettro di sensibilità agli antimicrobici eseguito secondo brodo-diluizione, i dati anagrafici dei pazienti.

I ceppi provenienti da campioni diversi da emocoltura, sono stati inoculati in flaconi da emocoltura per germi aerobi secondo la procedura di qualità proposta dalla ditta (Biomérieux), con l'inoculazione di circa 400 UFC/flacone (vedi paragrafo 3.2). Tali flaconi sono stati incubati come da routine nello strumento *Bact/Alert*<sup>®</sup> 3D fino a positivizzazione e poi utilizzati per prelievo di materiale per l'analisi del fenotipo di resistenza. In particolare, in caso di ceppi provenienti da urocoltura e materiale respiratorio è stata eseguita determinazione delle MIC mediante metodo standard (paragrafo 3.3) e metodo rapido (paragrafo 3.4); in caso di ceppi provenienti da campioni di emocoltura è stata eseguita determinazione delle MIC solo mediante



metodo rapido (paragrafo 3.4), considerando come valida la determinazione con metodo standard eseguita per la diagnostica di routine.

Tutti i ceppi utilizzati nel presente studio sono stati isolati nel corso della tradizionale diagnostica di routine: per tale motivo non è stato necessario procedere alla raccolta di un consenso informato da parte dei pazienti né l'approvazione del comitato etico. I dati sono stati trattati secondo la normativa vigente sulla privacy.

Il laboratorio di microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova ha aderito ai programmi di valutazione esterna di qualità. A tale scopo utilizza controlli esterni di qualità (VEQ) provenienti dalla Microbiologia Clinica della Società HPA – NEQAS (Health Protection Agency – UK National External Quality Assessment Service) di Londra, e distribuiti dalla ditta Oxoid. Gli esami per la valutazione esterna di qualità sono controlli di qualità esterni internazionali che vengono eseguiti da molti anni e sono indispensabili per il processo di qualità e per l'accreditamento/certificazione.

La lettura dei risultati dell'antibiogramma rapido e standard sono stati eseguiti da diversi operatori non a conoscenza del risultato corrispondente, per non inficiare i risultati con un bias dovuto alla consapevolezza dell'operatore. In alcuni casi con risultati intermedi, gli antibiogrammi rapidi venivano letti da due operatori diversi in asincrono per conferma.

Per la lettura e la classificazione dei profili di sensibilità sono state utilizzate le seguenti definizioni (Magiorakos, 2012):

- MDR (Multidrug Resistant): resistente a tutti gli antibiotici in almeno 3 classi potenzialmente attive
- ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase): *Enterobacteriaceae* produttrici di beta lattamasi a spettro esteso
- XDR (Extensively Drug Resistant): ceppo resistente a tutti gli antibiotici tranne due o meno classi potenzialmente attive
- PDR (Pan Drug Resistant): ceppo non sensibile a tutti gli agenti antimicrobici di tutte le classi testate

## **2.2 Inoculazione dei ceppi nei campioni di emocoltura**

I ceppi inclusi nello studio sono stati inoculati in flaconi da emocoltura per germi aerobi secondo la procedura di qualità proposta dalla ditta produttrice (Biomerieux) per il controllo di fertilità dei flaconi, in parte modificata utilizzando sangue proveniente da sacche di donatori casuali. Tale procedura prevede una serie prestabilita di diluizioni, allo scopo di inoculare circa 400 UFC/flacone. In particolare, i passaggi sono i seguenti:

- Preparazione di una sospensione con densità pari a 0,5 Mc Farland
- Diluizione 1:100 in Tryptic Soy Broth
- Diluizione 1:100 in Tryptic Soy Broth
- Diluizione 1:10 in Tryptic Soy Broth
- Inoculo nel flacone 0,4 ml della diluizione finale.

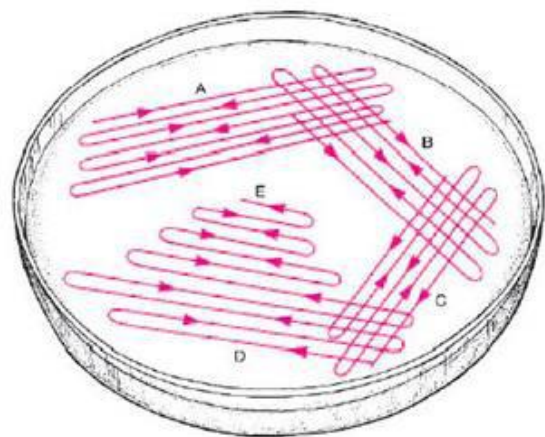
I ceppi sono stati incubati, come da routine diagnostica, a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  (*Bact/Alert*® 3D) fino a positivizzazione.

## **2.3 Metodica standard di coltura e identificazione**

La diagnostica di routine tradizionale prevede di eseguire, dopo la positivizzazione del flacone di emocoltura, il prelievo del brodo di coltura per l'allestimento del vetrino da colorare al Gram per l'esame batterioscopico, la semina del campione in opportuni terreni di coltura per l'isolamento del microrganismo e l'esecuzione dell'antibiogramma preliminare secondo il metodo di Kirby-Bauer. Dato che la validazione dell'identificazione di specie batterica con il metodo rapido è stata già effettuata dal nostro gruppo di ricerca (Masia, 2017), il presente studio si è concentrato sulla validazione dell'antibiogramma, puntando in tal modo al completamento di un innovativo percorso diagnostico rapido delle emocolture positive.

La procedura seguita è stata dunque la seguente: sotto una cappa a flusso laminare sono state prelevate una o due gocce di campione e inoculate sul primo quadrante su piastra di agar cioccolato. La semina è stata eseguita mediante l'utilizzo di un'ansa di plastica sterile secondo la tradizionale tecnica manuale di semina semi-quantitativa (*figura 8*) e incubata in ambiente ricco di anidride carbonica al 10%, a 37°C per 18-24 ore. Essendo noto il morfotipo batterico, grazie all'esame batterioscopico iniziale, al termine del periodo di incubazione le colonie isolate vengono utilizzate per l'allestimento del relativo antibiogramma secondo brodo-diluizione al Sensititre Aris®. (Paragrafo 2.4)

*Figura 8 - Esempio di piastra con semina semi-quantitativa chiamata anche semina a "quattro quadranti". Questa semina permette di diluire il campione progressivamente nei diversi quadranti fino ad ottenere colonie ben separate nel quarto quadrante (D-E).*

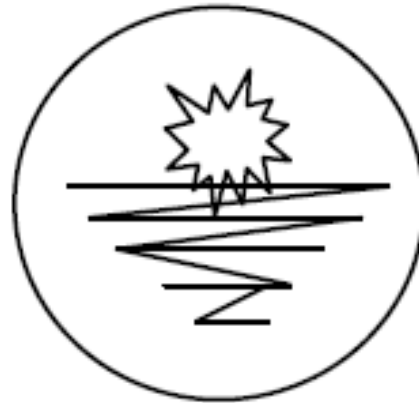


#### **2.4 Metodica rapida di coltura e identificazione**

La metodica testata per la determinazione delle MIC ha previsto una tecnica di semina differente, con isolamento non di colonie ma di una patina batterica a rapida crescita. Contrariamente alla metodica standard, dunque, sotto una cappa a flusso laminare sono state prelevate 5-8 gocce di campione e depositate su piastra di agar sangue in un medesimo punto. Da tale inoculo, dunque, si è proceduto a strisciare, a partenza da

una porzione periferica dello spot, distribuendo il materiale a tutta piastra, utilizzando un'ansa monouso di plastica sterile come nella *figura 9*.

*Figura 9 - Schematizzazione della semina "a spot"*



Dopo la semina, le piastre sono state incubate in ambiente ricco di anidride carbonica al 10% a 37°C per 5 ore. Secondo lo studio condotto da Sarti M. e collaboratori (2014) tale tempistica rappresenta il tempo minimo necessario per la moltiplicazione delle cellule batteriche e il raggiungimento di una concentrazione tale da essere rilevate dal sistema VitekMS®. Dopo l'incubazione, infatti, risulta evidente una patina di crescita batterica, più o meno florida a seconda delle specie batteriche. La patina è stata direttamente utilizzata per l'identificazione del microrganismo al VITEK-MS® per lo studio complementare all'interno del nostro gruppo di ricerca (Masia, 2017), che ha evidenziato come i risultati di identificazione più concordanti con la metodica standard si siano osservati con semina in piastre di agar sangue. Tale osservazione ha condotto alla conclusione di utilizzare anche per l'antibiogramma "rapido" solo piastre di agar sangue, in modo da rendere lineare il percorso diagnostico ed omogeneizzare i risultati con l'analisi globale effettuata.

Per il nostro studio, la patina di crescita batterica è stata dunque prelevata dalla piastra di agar sangue per l'esecuzione del test di sensibilità in brodo-diluizione e la determinazione della MIC al Sensititre Aris® (paragrafo 3.4).

## 2.5 Allestimento e lettura dell'antibiogramma

Le procedure per l'esecuzione dell'identificazione e dell'antibiogramma rapido sono state identiche alle procedure tradizionali, salvo che nella scelta della torbidità della sospensione iniziale, che è stata incrementata da 0.5 a 0.6 McFarland nel caso del metodo rapido. Questa variazione è frutto di un'analisi preliminare eseguita con campioni per il controllo del bianco analitico, per la valutazione dei dati di torbidità basali. In particolare, è stata testata l'ipotesi che la maggior presenza di emazie nella semina a spot, rispetto alla semina semi-quantitativa tradizionale, comporti la necessità di aumentare la torbidità della sospensione batterica da utilizzare per l'antibiogramma rapido.

A tale proposito, è stata eseguita la valutazione della torbidità in 3 differenti sedute di semina a spot a partire da flaconi inoculati con sangue sterile. In ogni seduta sono stati inoculati tre differenti volumi di sangue sterile (5, 10 e 20 ml), da donatore volontario, in altrettanti flaconi da emocoltura. Dopo un'incubazione di 24 ore, da ognuno dei tre flaconi è stata eseguita una semina a spot su piastra di agar sangue. Dopo un'incubazione delle piastre di 5 ore, alla stregua dei campioni da emocoltura positiva, da due differenti zone dell'iniziale inoculo ematico è stato prelevato il materiale ematico strisciando per 1 centimetro con un tampone sterile. Dopo aver risospeso il materiale ematico recuperato con il tampone in un mezzo liquido adeguato, lo stesso utilizzato per la patina batterica, sono stati calcolati i valori di torbidità. Il range dei valori ottenuti con il densitometro utilizzato in routine sono rappresentati in *tabella 3*.

*Tabella 3 - Calcolo dei valori di torbidità con semina a spot da flaconi inoculati di sangue sterile*

Emocoltura sterile	McFarland (range)
Prelievo da zona centrale dello spot	0.5 ± 0.04
Prelievo da coda dello spot	0.09 ± 0.05

Alla luce di questi dati, la patina batterica per l'allestimento dell'antibiogramma rapido è stata prelevata dalla coda dello spot (patina distribuita) e utilizzata per la sospensione a 0.6 McFarland.

Tale sospensione è stata poi utilizzata per la determinazione della Minima Concentrazione Inibente. Lo strumento utilizzato è l'incubatore Sensititre® (*Thermo Fisher Scientifica*) associato ad un modulo per l'inoculazione automatica dei campioni e ad un nefelometro. Lo strumento utilizza piastre con 96 pozzetti contenenti diversi antibiotici a concentrazione scalare al fine di definire la MIC.

Per tale determinazione, la sospensione batterica è stata trasferita in un terreno liquido di coltura che successivamente è stato inoculato in 96 pozzetti con antibiotici in forma disidratata a concentrazione scalare. Ogni pannello (*figura 10*) comprende 19 antibiotici appartenenti a famiglie differenti e 10 di questi antibiotici appartengono al gruppo delle Beta-lattamine, di cui tre penicilline con inibitore delle beta lattamasi (Ampicillina/Sulbactam - Piperacillina/Tazobactam - Amoxicillina/Clavulanato), tre cefalosporine (Cefotaxime - Ceftazidime - Cefepime) e quattro carbapenemi (Doripenem - Ertapenem - Imipenem - Meropenem). Gli altri 9 antibiotici presenti nel pannello sono: Colistina, due aminoglicosidi (Gentamicina - Amikacina), due chinoloni (Ciprofloxacina - Levofloxacina), Fosfomicina, Tigeciclina, Nitrofurantonina e Trimetoprim/Sulfametoxazolo.

*Figura 10 - Pannello Sensititre® per la determinazione dell'antibiogramma in MIC per i germi Gram-negativi*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	P/T4 128/4	P/T4 64/4	P/T4 32/4	P/T4 16/4	P/T4 8/4	P/T4 4/4	P/T4 2/4	<b>COL</b> 8	COL 4	COL 2	COL 1	COL 0.5
<b>B</b>	<b>FOT</b> 4	<b>FOT</b> 2	<b>FOT</b> 1	<b>FOT</b> 0.5	<b>FOT</b> 0.25	<b>FOT</b> 0.12	<b>FOT</b> 0.06	<b>DOR</b> 8	DOR 4	DOR 2	DOR 1	DOR 0.5
<b>C</b>	<b>CIP</b> 2	<b>CIP</b> 1	<b>CIP</b> 0.5	<b>CIP</b> 0.25	<b>CIP</b> 0.12	<b>CIP</b> 0.06	<b>FEP</b> 32	FEP 16	FEP 8	FEP 4	FEP 2	FEP 1
<b>D</b>	<b>TGC</b> 4	<b>TGC</b> 2	<b>TGC</b> 1	<b>TGC</b> 0.5	<b>TGC</b> 0.25	<b>TGC</b> 0.12	<b>SXT</b> 4/76	SXT 2/38	SXT 1/19	<b>SXT</b> 0.5/9.5	<b>NIT</b> 64	NIT 32
<b>E</b>	<b>AMI</b> 16	<b>AMI</b> 8	<b>AMI</b> 4	<b>LEVO</b> 4	<b>LEVO</b> 2	<b>LEVO</b> 1	<b>AUG2</b> 8/2	AUG2 4/2	AUG2 2/2	<b>A/S2</b> 32/16	A/S2 16/8	A/S2 8/4
<b>F</b>	<b>IMI</b> 16	<b>IMI</b> 8	<b>IMI</b> 4	<b>IMI</b> 2	<b>IMI</b> 1	<b>GEN</b> 4	GEN 2	GEN 1	<b>FOS+</b> 64	FOS+ 32	FOS+ 16	<b>ETP</b> 1
<b>G</b>	<b>TAZ</b> 128	<b>TAZ</b> 64	<b>TAZ</b> 32	<b>TAZ</b> 16	<b>TAZ</b> 8	<b>TAZ</b> 4	<b>TAZ</b> 2	TAZ 1	TAZ 0.5	TAZ 0.25	TAZ 0.12	<b>POS CON</b>
<b>H</b>	<b>MERO</b> 64	<b>MERO</b> 32	<b>MERO</b> 16	<b>MERO</b> 8	<b>MERO</b> 4	<b>MERO</b> 2	<b>MERO</b> 1	MERO 0.5	MERO 0.25	MERO 0.12	<b>POS CON</b>	<b>POS CON</b>

La piastra così allestita è stata incubata 18-24 ore e poi letta per la determinazione della MIC, espressa come valore assoluto e relativa interpretazione di categoria (Sensibile, Intermedio, Resistente).

Il valore ottenuto sperimentalmente è stato confrontato con le tabelle di riferimento riportanti valori soglia (“*break point*”) (BP), stabiliti da EUCAST, per le diverse combinazioni microorganismo-antibiotico (figura 11).

Figura 11 - Pannello di interpretazione dell’antibiogramma per germi Gram-negativi secondo criteri EUCAST (da pannello di lettura Sensititre®)

		EUCAST Enterobacteriaceae			EUCAST Pse. spp (P) Aci. spp (A)			EUCAST Other Non Entero. / PKPD BP		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R
P/T4	Piper./Tazob.	≤ 8	16	>16	≤ 16P	-	>16P	≤ 4	16	>16
TGC	Tigeciclina	≤ 1	2	>2	-	-	-	≤ 0.25	0.5	>0.5
LEVO	Levofloxacina	≤ 1	2	>2	≤ 1 P/ A	2 P/ A	>2 P/ A	≤ 1	2	>2
CIP	Ciprofloxacina	≤ 0.5 ≤ 0.06 Sal	1 - Sal	>1 >1 Sal	≤ 0.5P/≤ 1A	1 P	>1 P/ A	≤ 0.5	1	>1
AMI	Amikacin	≤ 8	16	>16	≤ 8 P/ A	16 P/ A	>16 P/ A	≤ 8	16	>16
SXT	Trimeth./Sulfam.	≤ 2	4	>4	≤ 4S/≤ 2A	4 A	>4 S/ A	-	-	-
COL	Colistina	≤ 2	-	>2	≤ 4P/≤ 2A	-	>4P/ >2A	-	-	-
GEN	Gentamicina	≤ 2	4	>4	≤ 4P/ A	-	>4P/ A	≤ 2	4	>4
NIT	Nitrofurantoina	≤ 64 U – E	-	>64 U – E	-	-	-	-	-	-
FOS+	Fosfo.G6fos	≤ 32 U	-	>32 U	≤ 32 P	-	>32 P	-	-	-
DOR	Doripenem	≤ 1	2	>2	≤ 1 P/ A	2 P/ A	>2 P/ A	≤ 1	4	>4
IMI	Imipenem	≤ 2	8	>8	≤ 4 P/ ≤ 2A	8 P/ A	>8 P/ A	≤ 2	8	>8
MERO	Meropenem	≤ 2	8	>8	≤ 2 P/ A	8 P/ A	>8 P/ A	≤ 2	8	>8
ETP	Ertapenem	≤ 0.5	1	>1	-	-	-	≤ 0.5	1	>1
AUG2	Amoxil/Clav	≤ 8	-	>8	-	-	-	≤ 2	8	>8
A/S2	Amp.Sulbac.	≤ 8	-	>8	-	-	-	≤ 2	8	>8
FOT	Cefotaxime	≤ 1	2	>2	-	-	-	≤ 1	2	>2
TAZ	Ceftazidime	≤ 1	4	>4	≤ 8 P	-	>8 P	≤ 4	8	>8
FEP	Cefepime	≤ 1	4	>4	≤ 8 P	-	>8 P	-	-	-

U = Urine E= Escherichia coli S = Stenotrophomonas maltophilia P = Pseudomonas spp A = Acinetobacter spp Sal = Salmonella spp.

Tramite tali regole, in base alla risposta al farmaco si può classificare il fenotipo del patogeno (EUCAST, 2016).

- I ceppi di categoria S (Sensibile) vengono inibiti *in vitro* da una concentrazione di antibiotico che suggerisce una forte probabilità di successo clinico.
- I ceppi di categoria I (Intermedio) sono quelli per cui il successo terapeutico non è prevedibile.
- I ceppi di categoria R (Resistente) vengono inibiti *in vitro* da una concentrazione di antibiotico tale da suggerire una forte probabilità di fallimento terapeutico.

Per ogni combinazione microorganismo-antibiotico vengono fissati 2 *breakpoints* (se è prevista la categoria di interpretazione I) o un solo *breakpoint* (se sono previste solo le categorie S/R). I valori di MIC preceduti dal segno ≤ indicano che la crescita del microorganismo è stata inibita dalla più bassa concentrazione dell’antibiotico utilizzata

per il saggio ed indicano una notevole sensibilità indipendentemente dal valore numerico; al contrario, valori preceduti dal segno > indicano che la crescita microbica non è stata inibita dalla massima concentrazione utilizzata e suggeriscono una resistenza elevata.

## **2.6 Analisi dei dati**

### Analisi della ripetibilità del metodo rapido

Per la validazione del metodo rapido, è stata innanzitutto calcolata la precisione del metodo secondo i criteri di riproducibilità/ripetibilità. La riproducibilità è stata definita come la “vicinanza dei valori trovati sullo stesso campione in una quantità rilevante di misure successive. I parametri del metodo non devono subire modifiche durante le ripetizioni.” (Poltronieri, 2001).

Per tale valutazione sono stati utilizzati ceppi da isolamento clinico e ATCC:

- Un ceppo di E. coli ATCC 25922 multisensibile,
- Un ceppo di E. coli ESBL, confermato con test di sinergia del doppio disco (*figura 12*)
- Un ceppo di P. aeruginosa MDR
- Un ceppo di K. pneumoniae produttore di carbapenemasi tipo KPC, verificato in biologia molecolare.

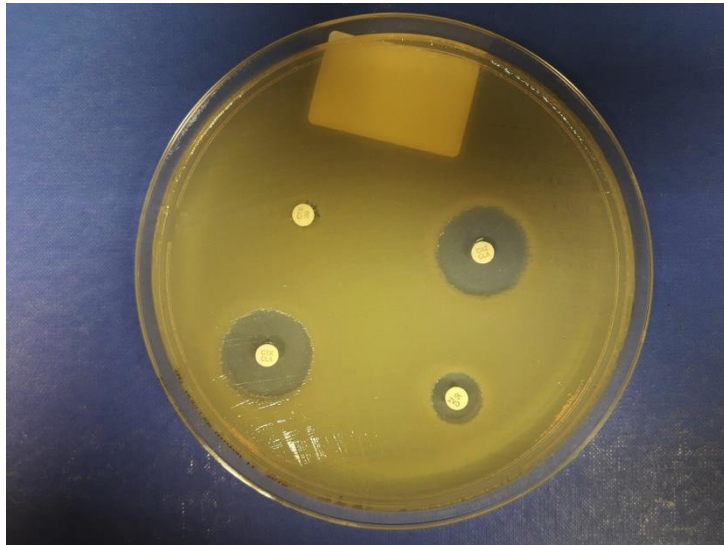
Tali ceppi sono stati analizzati con il metodo suddetto per 2 volte in 5 sedute diverse (totale 10 analisi per ceppo) secondo le indicazioni del Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). I dati raccolti per l'analisi di ripetibilità sono stati espressi secondo l'indice di precisione essenziale, Precision Essential Agreement (PEA), a valutazione della percentuale di analisi precise entro valori di MIC di  $\pm 1$  diluizione, accettabile > 95, con la valutazione dei seguenti indici:

PEA = n. risultati precisi entro  $\pm 1$  diluizione della MIC nota/ totale dei risultati x 100

PCA = n. risultati concordanti per categoria/ totale dei risultati x 100



*Figura 12- Test di sinergia del doppio disco, ceppo di E. coli EBSL selezionato per l'analisi di ripetibilità*



#### Analisi degli errori rilevati e verifica dell'accuratezza della tecnica diagnostica

La validazione del metodo rapido è avvenuta secondo il metodo proposto da Patel e collaboratori (2013), valutando la percentuale di errori e la loro gravità rispetto ai risultati di MIC ottenuti per la stessa combinazione microrganismo/antibiotico nell'ambito del percorso di riferimento. I criteri adottati, sono stati pertanto i seguenti:

- VERY MAJOR ERROR (VME): microrganismo risultato sensibile con il metodo rapido ma resistente con quello tradizionale (falso sensibile)
- MAJOR ERROR (ME): microrganismo risultato resistente con il metodo rapido ma sensibile con quello tradizionale (falso resistente)
- MINOR ERROR (mE): microrganismo risultato intermedio con una delle due metodiche e sensibile o resistente con l'altra (errore differente dai precedenti)

Tutte le percentuali degli errori riportate sono state calcolate nel seguente modo:

- La percentuale di Very Major Error è stata calcolata come rapporto degli errori totali, appartenenti a questa categoria, sul totale dei ceppi resistenti.
- La percentuale di Major Error è stata calcolata come rapporto degli errori totali, per questa categoria, sul totale dei ceppi sensibili.

- La percentuale di Minor Error è stata calcolata come rapporto degli errori totali, per questa categoria, sul totale della somma dei ceppi resistenti e sensibili.

Inoltre, per quanto riguarda la valutazione dell'accuratezza diagnostica, sono stati calcolati:

- Il CATEGORICAL AGREEMENT (CA), a riferimento della percentuale di risultati classificati nella stessa categoria (S, I, o R), accettabile > 90, con il calcolo secondo la seguente formula

$$CA = n. \text{ risultati concordanti} / \text{totale dei risultati} \times 100$$

- L'ESSENTIAL AGREEMENT (EA), a valutazione della percentuale di ceppi con un valore di MIC la cui differenza è compresa all'interno di  $\pm 1$  diluizione a raddoppio rispetto al metodo di riferimento, accettabile > 90, con il calcolo secondo la seguente formula

$$EA = n. \text{ risultati precisi entro } \pm 1 \text{ diluizione della MIC nota} / \text{totale dei risultati} \times 100$$

#### Confronto degli errori tra fenotipi di resistenza differenti osservati

A completamento dell'analisi sopra descritta, è stata ulteriormente valutata la differenza di osservazioni, corrette o errate, tra i gruppi di isolati con o senza profili di multi resistenza. Tale analisi è stata eseguita con il calcolo del Chi-quadrato, tramite software online (*Graphpad Scientific Software, QuickCalcs, disponibile su <https://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>*). La significatività statistica è stata calcolata mediante p a due code < 0.05.

#### Analisi statistica dei risultati: concordanza, sensibilità, specificità e parametri di predittività

L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita confrontando i risultati ottenuti dall'antibiogramma con metodo rapido con quelli ottenuti dall'antibiogramma con

metodo tradizionale, analizzando i singoli antibiotici per tutti i ceppi e poi per i ceppi delle diverse specie batteriche divisi secondo fenotipo di resistenza.

E' stato innanzitutto calcolato l'indice di concordanza tra il test rapido e quello tradizionale, mediante indice "Kappa" di Cohen, interpretato secondo i parametri espressi in *tabella 4* e calcolato tramite software online (*Graphpad Scientific Software, QuickCalcs, disponibile su <https://graphpad.com/quickcalcs/kappa1>*)

*Tabella 4 - Valori interpretativi indice Kappa di Cohen (adattata da Bottarelli, 2017)*

Kappa	Concordanza
<0.01	nulla
0.01-0.20	scarsa
0.21-0.40	modesta
0.41-0.60	moderata
0.61-0.80	buona
0.81-1.00	eccellente

L'analisi statistica è stata dunque condotta tramite il calcolo dei seguenti parametri:

- *La sensibilità* del metodo rapido, intesa come la proporzione di ceppi risultati veramente resistenti ai singoli antibiotici testati, rispetto al metodo tradizionale
- *La specificità* del metodo testato, intesa come la proporzione di ceppi risultati veramente sensibili ai singoli antibiotici testati, rispetto al metodo tradizionale
- *Il rapporto di verosimiglianza positivo (Likelihood Ratio, LR+)*, inteso come il rapporto tra la probabilità che il ceppo risulti resistente al singolo antibiotico con il test rapido congruentemente con il test tradizionale e la probabilità che un sensibile risulti resistente; in altre parole, tale rapporto indica la probabilità che si osservi un vero resistente rispetto ad un falso resistente (Il test sarà tanto più accurato quanto più il rapporto differirà dall'1, con RV > 10 considerabile di evidenza diagnostica conclusiva) (*Tabella 5*)

- *Il rapporto di verosimiglianza negativo (Likelihood Ratio, LR-),* inteso come il rapporto tra la probabilità che il ceppo risulti sensibile al singolo antibiotico con il test rapido congruentemente con il test tradizionale e la probabilità che un resistente risulti sensibile; in altre parole, tale rapporto indica la probabilità che si osservi un vero sensibile rispetto ad un falso sensibile (Il test sarà tanto più accurato quanto più il rapporto differirà dall'1, con  $RV < 0.1$  considerabile di evidenza diagnostica conclusiva, come indicato in *Tabella 5*) (Pagano e Gauvreau, 2003).
- *L'odds ratio diagnostico (DOR),* definito come il rapporto tra la probabilità di ottenere veri resistenti e la probabilità di avere falsi resistenti, non calcolato sulla prevalenza, e relativo *intervallo di confidenza al 95%*

*Tabella 5 - parametri interpretativi Likelihood Ratio adattata da Pagano e Gauvreau, 2003)*

LR+	LR-	Interpretazione del test
> 10	<0,1	conclusivo
5-10	0,1-0,2	moderatamente utile
2-5	0,2-0,5	a volte utile
1-2	0,5-1	raramente utile
1	1	non utile

- *Il valore predittivo positivo (PPV),* rappresentato dalla proporzione dei veri resistenti sul totale delle osservazioni
- *Il valore predittivo negativo (NPV),* rappresentato dalla proporzione dei veri sensibili sul totale delle osservazioni
- *La valutazione delle probabilità post-test (post-test odds),* tramite l'analisi delle probabilità pre-test associate al rapporto di verosimiglianza, secondo un teorema Bayesiano calcolato sul range di prevalenza di resistenza tramite un software calcolatore automatico online (disponibile su <https://www.sipmel.it/it/risorse/strumenti/calcolatore>, tramite il portale della Società Italiana di Medicina di Laboratorio, ultimo accesso 12 Agosto 2017) (Giavarina et al.,2007)

Per tale analisi, è stata necessaria la classificazione dei risultati per la definizione della corrispondenza di categoria tra il test rapido e quello tradizionale. In particolare, sono stati utilizzati i seguenti criteri (*tabella 6*):

*Tabella 6 - Criteri di interpretazione dei risultati*

	Test rapido	Test tradizionale
Vero positivo	R I	R I
Falso positivo	R I	S S
Falso negativo	S S	R I
Vero negativo	S	S

Infine, in caso di presenza di minor errors con valori discordanti in termini di fenotipo tra intermedio o resistente (test tradizionale I e test rapido R o viceversa), l'errore è stato classificato valutando caso per caso i risultati complessivi dell'antibiogramma. In particolare, l'errore è stato classificato tra i falsi positivi o i falsi negativi alla luce del meccanismo di resistenza sottostante, alla differenza dei valori assoluti delle MIC (+/- una diluizione) e alle potenziali ricadute nella pratica clinica.

# RISULTATI

## 3.1 Caratteristiche dei ceppi analizzati

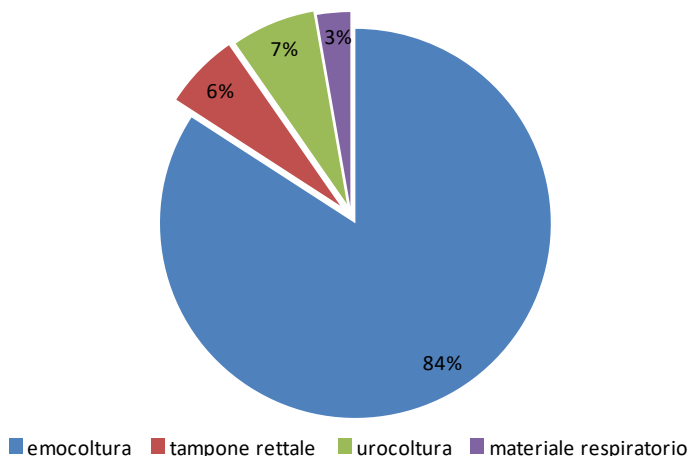
Per lo studio descritto sono stati raccolti e analizzati 145 ceppi di batteri Gram negativi ESBL o XDR, secondo la suddivisione indicata nella sottostante *tabella 7*:

*Tabella 7 - Ceppi analizzati per lo studio*

SPECIE	TIPO DI RESISTENZA	n.
<i>Escherichia coli</i>	Non ESBL	35
	ESBL	37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Non ESBL	10
	MDR o XDR	36
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Non MDR	15
	MDR o XDR	12
<b>TOTALE CAMPIONI</b>		<b>145</b>

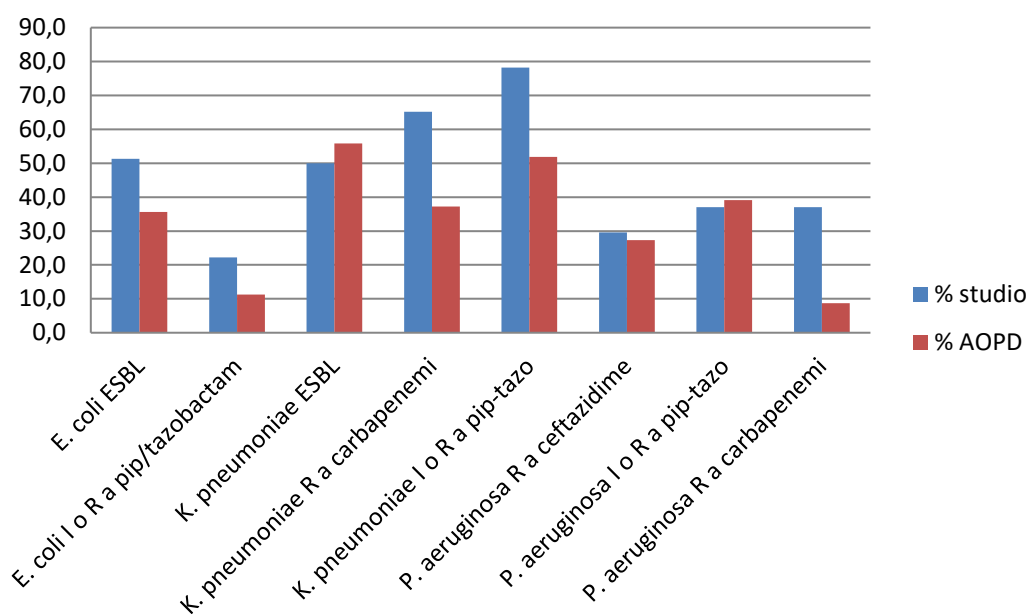
La maggior parte degli isolati batterici inclusi nello studio proveniva da campioni di sangue inviati per emocoltura. Sono stati inclusi inoltre, anche allo scopo di simulare l'epidemiologia locale, ceppi isolati da urocoltura, materiale respiratorio e tamponi rettali eseguiti per sorveglianza epidemiologica all'interno dell'Azienda Ospedaliera di Padova. La provenienza dei ceppi è riassunta nella *figura 13*:

*Figura 13 - Provenienza dei ceppi inclusi nello studio*



Ne è emersa una condizione peggiorativa rispetto all'epidemiologia locale, che è stata valutata sulla base dei dati raccolti dagli isolamenti del primo semestre 2017 giunti presso il Servizio di Microbiologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Il confronto tra le proporzioni di resistenza dei ceppi indagati nello studio e dei ceppi analizzati di routine è riassunto nella *figura 14*.

*Figura 14 - Percentuale di resistenze nei ceppi inclusi nello studio e nei ceppi isolati presso l'Azienda Ospedaliera di Padova nel primo semestre 2017*



### 3.2 Analisi della ripetibilità del metodo rapido per l'esecuzione dell'antibiogramma

I dati della riproducibilità ottenuti dalla ripetizione intra- e inter-day del metodo rapido su ceppi selezionati di *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (vedi capitolo 3.5.1) sono rappresentati nella *tabella 8*.

In particolare, i due indici di precisione sono risultati essere:

$$\text{Precision Categorical Agreement (PCA)} = 661/670 \times 100 = 98,6$$

$$\text{Precision Essential Agreement (PEA)} = 670/670 \times 100 = 100$$

e considerabili quindi ottimi secondo i criteri di accettabilità prestabiliti (> 95). Tutti i risultati con gli errori osservati sono riportati nella *tabella 8*.

Patogeno	Tipo di ceppo		Amikacina	Amoxi/clav	Amp/sulb	Cefepime	Cefotaxime	Ceftazidime	Ciproflo	Colistina	Doripenem	Ertapenem	Fosfomicina	Gentamicina	Imipenem	Levoflox	Meropenem	Nitrofurant	Pip/tazob	Tigeciclina	Trimet/sulf	Totale Essential Errors		
E.coli	ATCC 25922	day 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		
		day 1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
		day 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
		day 2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
		day 3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
		day 3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
		day 4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
		day 4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
		day 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
		day 5	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
E.coli	ESBL	day 1	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S		
		day 1	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	
		day 2	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	
		day 2	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	
		day 3	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	0 Essential errors	
		day 3	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	0 Essential errors	
		day 4	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	
		day 4	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	I	S	S	S	S	
		day 5	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	0 Essential errors	
		day 5	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	0 Essential errors	
Kl. Pneumoniae	KPC	day 1	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R		R	I	S	0 Essential errors		
		day 1	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R		R	I	S	0 Essential errors		
		day 2	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
		day 2	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
		day 3	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
		day 3	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
		day 4	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
		day 4	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
		day 5	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
		day 5	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R		R	I	S			
P. aeruginosa	MDR	day 1	S			S		R	S	S	I			S	I	S	I		R					
		day 1	S			S		R	S	S	I			S	R	S	I		R				0 Essential errors	
		day 2	S			S		R	S	S	I			S	I	S	I		R					
		day 2	S			S		R	S	S	I			S	R	S	I		R				0 Essential errors	
		day 3	S			S		R	S	S	I			S	I	S	I		R					
		day 3	S			S		R	S	S	I			S	I	S	I		R					
		day 4	S			S		R	S	S	I			S	I	S	I		R					
		day 4	S			S		R	S	S	I			S	I	S	I		R					
		day 5	S			S		R	S	S	I			S	I	S	I		R					
		day 5	S			S		R	S	S	S			S	I	S	I		R				0 Essential errors	
<b>Totale Categorical Errors</b>										<b>1</b>		<b>2</b>		<b>2</b>				<b>4</b>						



### 3.3 Analisi della performance dell'antibiogramma rapido versus metodo tradizionale

Come già descritto (par. 3.5.2), la validazione del metodo rapido è avvenuta valutando gli errori osservati con la nuova metodica, sia in termini di numero di diluizioni di differenza tra i due test, sia nell'interpretazione di categoria risultante dall'analisi delle MIC. Gli errori di categoria sono stati pertanto standardizzati come "Very Major Error", "Major Error" e "minor Error" secondo i criteri già descritti.

L'analisi è stata condotta per specie di microorganismo, fenotipo di resistenza e singolo antibiotico analizzato; su tali parametri, sono stati calcolati il numero di errori e i relativi tassi, indicati come Essential Agreement e Categorical Agreement. La determinazione nel totale dei ceppi e poi suddivisa per tipologia è descritta nelle *tabelle (9-17)* sottostanti.

Tutte le percentuali degli errori riportate in questa parte dei risultati sono state calcolate nel seguente modo:

- La percentuale di Very Major Error è stata calcolata come rapporto degli errori totali, appartenenti a questa categoria, sul totale dei ceppi resistenti
- La percentuale di Major Error è stata calcolata come rapporto degli errori totali, per questa categoria, sul totale dei ceppi sensibili
- La percentuale di minor Error è stata calcolata come rapporto degli errori totali, per questa categoria, sul totale della somma dei ceppi resistenti, intermedi e sensibili.

Tabella 9 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per tutti i ceppi testati

Concordanza tra le MIC per tutti i ceppi testati									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	145	17	3	125			4	97,2	99,3 (1)
Amoxi/clav	118	83		35		1		99,1	100
Amp/sulbactam	118	96		22	4			97,2	99,1 (1)
Cefepime	145	72	5	68		2	6	94,4	97,2 (4)
Cefotaxime	118	72		46				100	99,1 (1)
Ceftazidime	145	73	4	68		1	4	96,6	98,6 (2)
Ciprofloxacina	145	95		50				100	99,3 (1)
Colistina	145	6		139				100	100
Doripenem	145	32	5	108		1	2	97,3	100
Ertapenem	118	29		89				100	100
Fosfomicina	118	12		106	2	1		97,5	100
Gentamicina	145	44	1	100	1		2	97,3	99,2 (1)
Imipenem	145	27	8	110		1	4	96,6	98,6 (2)
Levofloxacina	145	94	1	50			0	100	100
Meropenem	145	24	11	110			5	96,6	97,9 (3)
Nitrofurantoina*	72			72				100	100
Pip/tazobactam	145	56	6	83	2	1	8	92,4	95,8 (6)
Tigeciclina	118			118			3	97,5	100
Trimetoprim/sulfam	118	51	1	66				100	99,1 (1)
<b>Tot.</b>	<b>2493</b>	<b>883</b>	<b>45</b>	<b>1565</b>	<b>9 (1)</b>	<b>8 (0,5)</b>	<b>38 (1,5)</b>	<b>97,9</b>	<b>99,1</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobico non utilizzato in terapia in caso di sepsi

Tabella 10 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per tutti i ceppi MDR o XDR

Concordanza tra le MIC per tutti i ceppi MDR o XDR									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	85	17	3	65			4	95,3	98,8 (1)
Amoxi/clav	73	66		7				100	100
Amp/sulbactam	73	72		1	1			98,6	100
Cefepime	85	72	5	8		2	6	90,5	96,5 (3)
Cefotaxime	73	72		1				100	100
Ceftazidime	85	73	4	8		1	4	94,1	98,8 (1)
Ciprofloxacina	85	80		5				100	100
Colistina	85	6		79				100	100
Doripenem	85	32	5	48		1	2	96,4	100
Ertapenem	73	29		44				100	100
Fosfomicina	73	12		61	2	1		95,8	100
Gentamicina	85	40	1	44	1		2	96,4	98,8 (1)
Imipenem	85	27	8	50		1	4	94,1	97,6 (2)
Levofloxacina	85	78	1	6				100	100
Meropenem	85	24	11	50			5	94,1	96,5 (3)
Nitrofurantoina*	37			37				100	100
Pip/tazobactam	85	53	6	26	1	1	4	92,9	95,3 (4)
Tigeciclina	73			73			3	95,8	100
Trimetroprim/sulfam	73	38	1	34				100	98,6 (1)
<b>Tot.</b>	<b>1483</b>	<b>791</b>	<b>45</b>	<b>647</b>	<b>5 (0,6)</b>	<b>7 (1,1)</b>	<b>34 (2,3)</b>	<b>97,0</b>	<b>98,9</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobico non utilizzato in terapia in caso di sepsi

Tabella 11 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per tutti i ceppi non MDR o XDR

<b>Concordanza tra le MIC per tutti i ceppi non MDR o XDR</b>									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	60			60				100	100
Amoxi/clav	45	17		28		1		97,8	100
Amp/sulbactam	45	24		21	3			93,3	97,8 (1)
Cefepime	60			60				100	98,3 (1)
Cefotaxime	45			45				100	97,8 (1)
Ceftazidime	60			60				100	98,3 (1)
Ciprofloxacina	60	15		45				100	97,8 (1)
Colistina	60			60				100	100
Doripenem	60			60				100	100
Ertapenem	45			45				100	100
Fosfomicina	45			45				100	100
Gentamicina	60	4		56				100	100
Imipenem	60			60				100	100
Levofloxacina	60	16		44				100	100
Meropenem	60			60				100	100
Nitrofurantoina*	35			35				100	100
Pip/tazobactam	60	3		57	1		4	91,7	96,6 (2)
Tigeciclina	45			45				100	100
Trimetoprim/sulfam	45	13		32				100	100
<b>Tot.</b>	<b>1010</b>	<b>92</b>		<b>918</b>	<b>4 (4,4)</b>	<b>1 (0,1)</b>	<b>4 (0,4)</b>	<b>99,0</b>	<b>99,3</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobico non utilizzato in terapia in caso di sepsi

Tabella 12 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per i ceppi di E. coli MDR

Concordanza tra le MIC per E. coli MDR (ESBL+)									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	37	1	1	35			2	94,6	97,3 (1)
Amoxi/clav	37	32		5				100	100
Amp/sulbactam	37	36		1	1			97,3	100
Cefepime	37	29	5	3		1	5	83,8	97,3 (1)
Cefotaxime	37	36		1				100	100
Ceftazidime	37	29	4	4			3	91,9	100
Ciprofloxacina	37	37						100	100
Colistina	37			37				100	100
Doripenem	37			37				100	100
Ertapenem	37			37				100	100
Fosfomicina	37			37				100	100
Gentamicina	37	26		11				100	100
Imipenem	37			37				100	100
Levofloxacina	37	37						100	100
Meropenem	37			37				100	100
Nitrofurantoina*	37			37				100	100
Pip/tazobactam	37	8	6	23	1		3	89,1	91,9 (3)
Tigeciclina	37			37				100	100
Trimetoprim/sulfam	37	15		22				100	100
<b>Tot.</b>	<b>703</b>	<b>286</b>	<b>16</b>	<b>401</b>	<b>2 (0,7)</b>	<b>1 (0,2)</b>	<b>13 (1,8)</b>	<b>97,7</b>	<b>99,3</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobico non utilizzato in terapia in caso di sepsi

Tabella 13 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per i ceppi di E. coli non MDR

<b>Concordanza tra le MIC per E. coli non MDR (ESBL-)</b>									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	35			35				100	100
Amoxi/clav	35	8		27		1		97,1	100
Amp/sulbactam	35	16		19	3			91,4	97,1 (1)
Cefepime	35			35				100	100
Cefotaxime	35			35				100	97,1 (1)
Ceftazidime	35			35				100	100
Ciprofloxacina	35	12		23				100	97,1 (1)
Colistina	35			35				100	100
Doripenem	35			35				100	100
Ertapenem	35			35				100	100
Fosfomicina	35			35				100	100
Gentamicina	35	4		31				100	100
Imipenem	35			35				100	100
Levofloxacina	35	12		23				100	100
Meropenem	35			35				100	100
Nitrofurantoina*	35			35				100	100
Pip/tazobactam	35	2		33	1		3	88,6	97,1 (1)
Tigeciclina	35			35				100	100
Trimetroprim/sulfam	35	10		25				100	100
<b>Tot.</b>	<b>665</b>	<b>64</b>	<b>0</b>	<b>601</b>	<b>4 (6,2)</b>	<b>1 (0,2)</b>	<b>3 (0,5)</b>	<b>98,8</b>	<b>99,4</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobico non utilizzato in terapia in caso di sepsi

Tabella 14 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per i ceppi di *K. pneumoniae* MDR o XDR

<b>Concordanza tra le MIC per <i>Klebsiella pneumoniae</i> MDR o XDR</b>									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	36	13	2	21			2	94,4	100
Amoxi/clav	36	34		2				100	100
Amp/sulbactam	36	36						100	100
Cefepime	36	36						100	97,2 (1)
Cefotaxime	36	36						100	100
Ceftazidime	36	36					1	97,2	100
Ciprofloxacina	36	35		1				100	100
Colistina	36	6		30				100	100
Doripenem	36	25	3	8		1	2	91,6	100
Ertapenem	36	29		7				100	100
Fosfomicina	36	12		24	2	1		91,6	100
Gentamicina	36	12	1	23	1		2	91,6	100
Imipenem	36	18	7	11		1	3	88,9	94,4 (2)
Levofloxacina	36	35		1				100	100
Meropenem	36	19	6	11			4	88,9	91,6 (3)
Nitrofurantoina*									
Pip/tazobactam	36	36					1	97,2	100
Tigeciclina	36			36			3	91,6	100
Trimetoprim/sulfam	36	23	1	12				100	97,2 (1)
<b>Tot.</b>	<b>648</b>	<b>441</b>	<b>20</b>	<b>187</b>	<b>3 (0,7)</b>	<b>3 (1,6)</b>	<b>18 (2,7)</b>	<b>96,3</b>	<b>98,9</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobici non utilizzati in terapia

Tabella 15 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per i ceppi di *K. pneumoniae* non MDR o XDR

<b>Concordanza tra le MIC per <i>K. pneumoniae</i> non MDR o XDR</b>									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	10			10				100	100
Amoxi/clav	10	9		1				100	100
Amp/sulbactam	10	8		2				100	100
Cefepime	10			10				100	100
Cefotaxime	10			10				100	100
Ceftazidime	10			10				100	100
Ciprofloxacina	10	1		9				100	100
Colistina	10			10				100	100
Doripenem	10			10				100	100
Ertapenem	10			10				100	100
Fosfomicina	10			10				100	100
Gentamicina	10			10				100	100
Imipenem	10			10				100	100
Levofloxacina	10	1		9				100	100
Meropenem	10			10				100	100
Nitrofurantoina*									
Pip/tazobactam	10			10				100	100
Tigeciclina	10			10				100	100
Trimetoprim/sulfam	10	3		7				100	100
<b>Tot.</b>	<b>180</b>	<b>22</b>		<b>158</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobici non utilizzati in terapia



Tabella 16 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per i ceppi di *P. aeruginosa* MDR o XDR

<b>Concordanza tra le MIC per <i>P. aeruginosa</i> MDR o XDR</b>									
Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo- antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	12	3		9				100	100
Amoxi/clav*									
Amp/sulbactam*									
Cefepime	12	7		5		1	1	83,3	91,6 (1)
Cefotaxime*									
Ceftazidime	12	8		4		1		91,6	91,6 (1)
Ciprofloxacina	12	8		4				100	100
Colistina	12			12				100	100
Doripenem	12	7	2	3				100	100
Ertapenem*									
Fosfomicina*									
Gentamicina	12	2		10				100	91,6 (1)
Imipenem	12	9	1	2			1	91,6	100
Levofloxacina	12	6	1	5				100	100
Meropenem	12	5	5	2			1	91,6	100
Nitrofurantoina*									
Pip/tazobactam	12	9		3		1		91,6	91,6 (1)
Tigeciclina*									
Trimetroprim/sulfam *									
<b>Tot.</b>	<b>132</b>	<b>64</b>	<b>9</b>	<b>59</b>		<b>3 (5)</b>	<b>3 (2,3)</b>	<b>95,4</b>	<b>96,9</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobici non utilizzati in terapia

Tabella 17 - Confronto tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per i ceppi di *P. aeruginosa* non MDR o XDR

<b>Concordanza tra le MIC per <i>P. aeruginosa</i> non MDR o XDR</b>									
<i>Tipo di antimicrobico</i>	<i>Numero di combinazioni microrganismo-antibiotico</i>	<i>Esito della MIC di riferimento<sup>a</sup></i>			<i>Numero (%) di errori<sup>b</sup></i>			<b><i>Categorical Agreement (%)</i></b>	<b><i>Essential Agreement (%)</i></b>
		<b><i>R</i></b>	<b><i>I</i></b>	<b><i>S</i></b>	<b><i>VME</i></b>	<b><i>ME</i></b>	<b><i>mE</i></b>		
Amikacina	15			15				100	100
Amoxi/clav*									
Amp/sulbactam*									
Cefepime	15			15				100	93,3 (1)
Cefotaxime*									
Ceftazidime	15			15				100	93,3 (1)
Ciprofloxacina	15	2		13				100	100
Colistina	15			15				100	100
Doripenem	15			15				100	100
Ertapenem*									
Fosfomicina*									
Gentamicina	15			15				100	100
Imipenem	15			15				100	100
Levofloxacina	15	3		12				100	100
Meropenem	15			15				100	100
Nitrofurantoina*									
Pip/tazobactam	15	1		14			1	93,3	93,3 (1)
Tigeciclina*									
Trimetroprim/sulfam*									
<b>Tot.</b>	<b>165</b>	<b>6</b>		<b>159</b>			<b>1 (0,6)</b>	<b>99,3</b>	<b>98,1</b>

a. *Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati*

b. *Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)*

\* *Antimicrobici non utilizzati in terapia*

### 3.4 Valutazione e confronto degli errori tra differenti fenotipi di resistenza agli antibiotici

Gli errori valutati sono stati accorpati per l'analisi secondo l'espressione o meno di multiresistenza da parte del ceppo e a seconda che fossero errati o corretti rispetto al metodo di riferimento. Le proporzioni di errori di categorizzazione (di categoria di interpretazione - S, I o R) o di errori > di 1 diluizione al raddoppio (essenziali) sono rappresentati nelle *tabelle 18 e 19*.

*Tabella 18 – N. errori di categoria osservati*

	Dati corretti	VME, ME e mE	Tot.
Ceppi MDR o XDR	1437	46	1483
Ceppi sensibili	1001	9	1010
		Proporzione.	%
Proporzione di dati di categoria corretti nei ceppi MDR/XDR:	1437/(1437+1001)	0,59	58,94
Proporzione di errori di categoria nei ceppi MDR/XDR:	46/(46+9)	0,84	83,64

*Tabella 19 – N. errori essenziali osservati*

	Dati corretti	Errori > 1 diluizione	Tot.
Ceppi MDR o XDR	1467	16	1483
Ceppi sensibili	1002	8	1010
		Proporzione.	%
Proporzione di differenze $\leq$ 1 diluizioni nei ceppi MDR/XDR:	1467/(1467+1002)	0,59	59,42
Proporzione di differenze > 1 diluizioni nei ceppi MDR/XDR:	16/(16+8)	0,67	66,67

Il calcolo del chi-quadrato per quanto riguarda gli errori di categoria è risultato pari a 13.61, dimostrando una differenza tra i due gruppi statisticamente significativa con  $p < 0,5$  ( $p = 0,000225$ ), Odds-ratio 0,28. Come ulteriore analisi, è stata confrontata la presenza di errori nei due gruppi, suddivisi per gravità (mE e ME/VME). Si è osservata una differenza significativa tra gruppo di ceppi resistenti e gruppo di ceppi non MDR solo nell'osservazione di minor errors (numero statisticamente maggiore di errori nel gruppo MDR/XDR,  $\chi^2 = 14.4$ , con  $p = 0.0001$ ), mentre tale differenza non è stata osservata per errori di categoria maggiori.

Infine, tra i due gruppi non sono state osservate differenze significative nel numero di errori essenziali ( $\chi^2 = 0.52$ ,  $p: 0.4715$ ).

### 3.5 Analisi statistica dei risultati

Come già descritto, l'analisi statistica dei risultati è stata eseguita confrontando i risultati ottenuti dall'antibiogramma con metodo rapido con quelli ottenuti dall'antibiogramma con metodo tradizionale, analizzando i singoli antibiotici e poi per fenotipo di resistenza espresso.

E' stato innanzitutto calcolato l'indice di concordanza mediante K di Cohen, valutato sul totale delle 2493 osservazioni di categoria analizzate nel totale dei ceppi. Il numero totale di osservazioni concordanti è stato di 2460 (98,6% delle osservazioni), con un indice K calcolato di 0,971, intervallo di confidenza 0.962-0.981 (n. di osservazioni attese per casualità 1340 – 53,76%), indicando una forza di concordanza attesa molto buona. Risultati analoghi sono stati rilevati suddividendo l'analisi per il gruppo dei ceppi MDR/XDR e il gruppo dei ceppi non MDR, con un indice Kappa rispettivamente di 0.966 (0.953 - 0.979) e 0.944 (0.906 - 0.983).

Dall'analisi dei dati complessivi, inoltre, il metodo rapido ha dimostrato di essere accurato, se confrontato con il metodo di coltura standard, in termini di sensibilità, specificità, LR+, LR- e Odds-ratio, come indicato in *tabella 20*.

*Tabella 20 - Parametri statistici del metodo rapido*

	Sensibilità	Specificità	LR+	LR-	DOR
	0.98	0.99	86.8	0.017	1755.83
95% IC	0.97-0.99	0.98-0.99	54.8-137.5	0.01-0.028	893.69-3449.7

La valutazione dei parametri suddividendo le osservazioni per tipo di antibiotico esaminato, secondo l'analisi descritta in par. 3.5.4, è esplicitata nelle *figure (15-20)* sottostanti.

Figura 15 - Sensibilità del test, globale e analizzata per singolo antibiotico

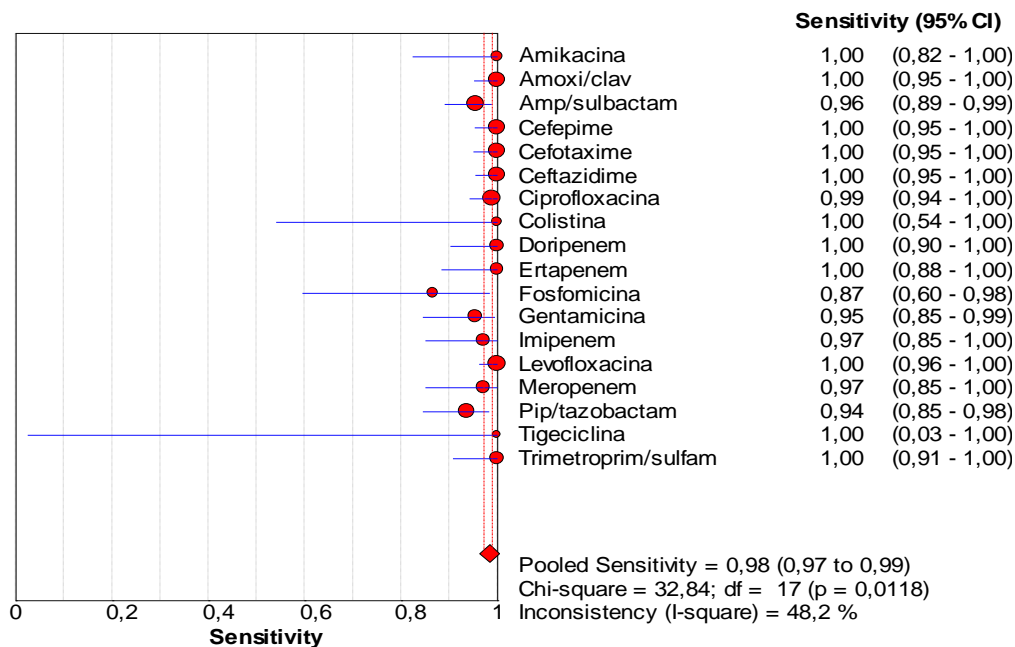


Figura 16 - Specificità del test, globale e analizzata per singolo antibiotico

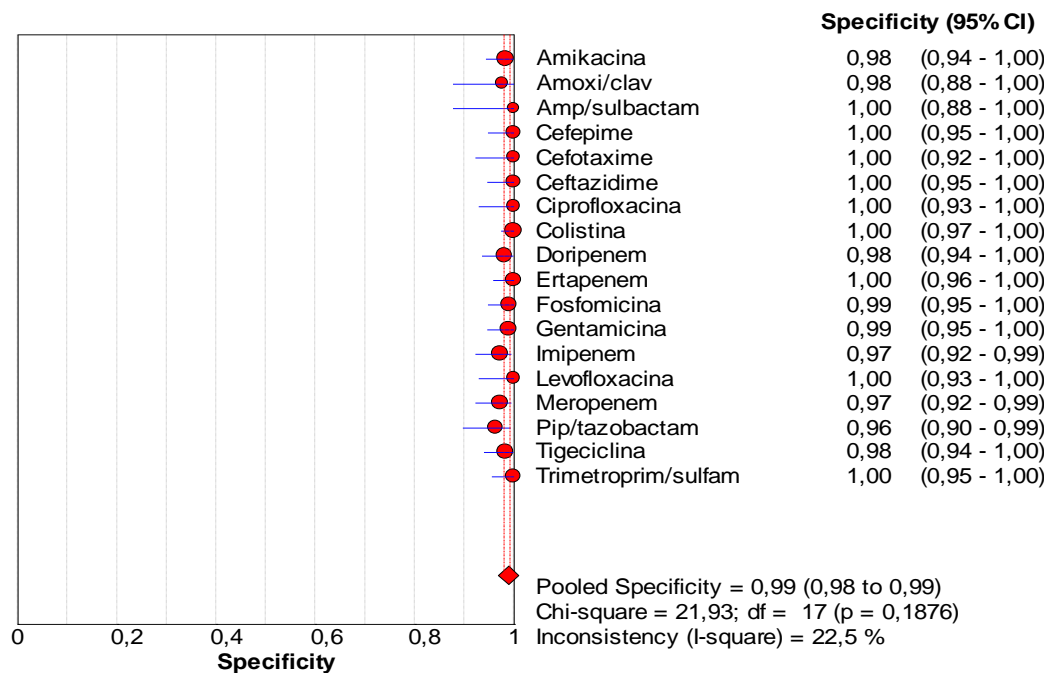


Figura 17 - Rapporto di verosimiglianza positivo (LR+) del test, globale e analizzata per singolo antibiotico

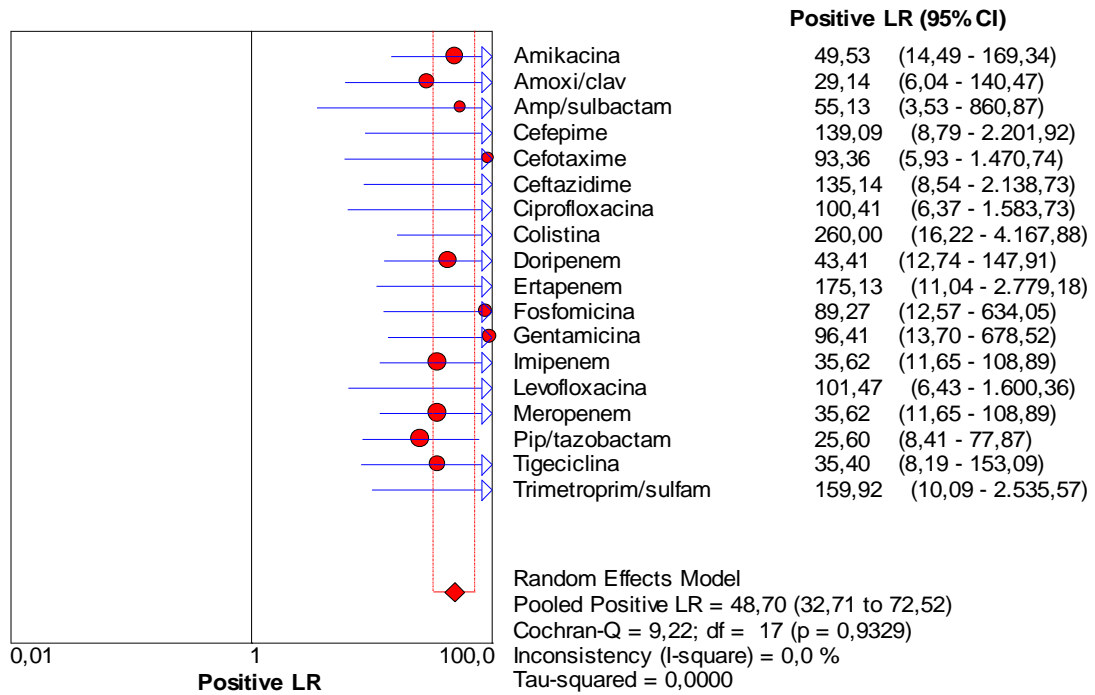


Figura 18 - Rapporto di verosimiglianza negativo (LR-) del test, globale e analizzata per singolo antibiotico

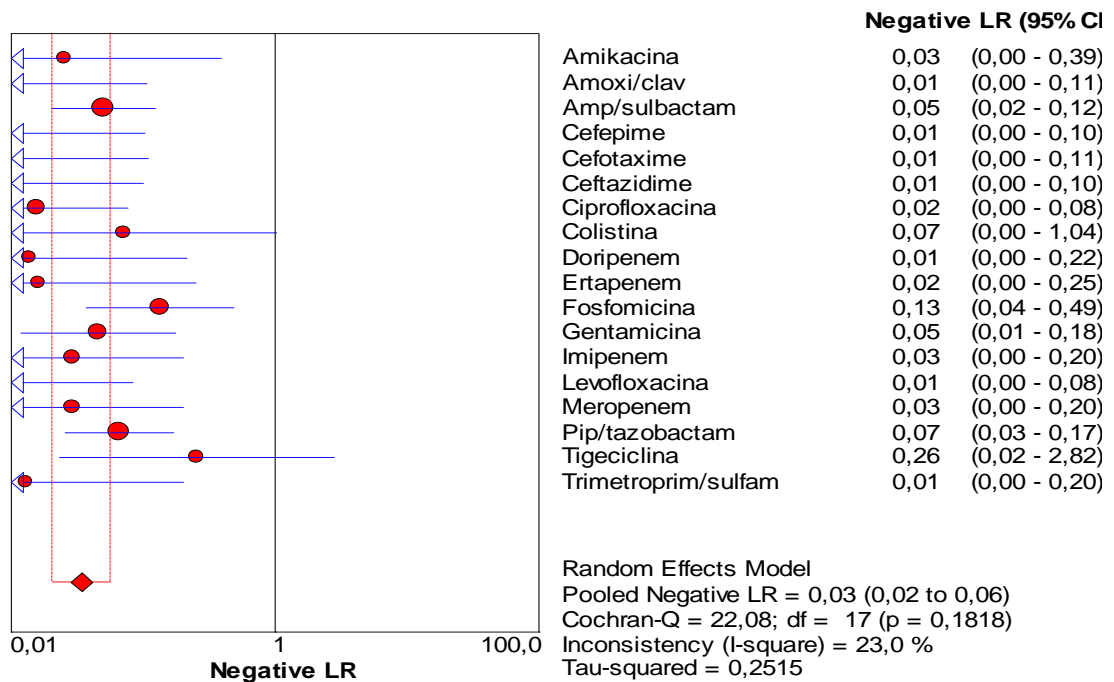


Figura 19 - Odds Ratio Diagnostico (DOR) del test, globale e analizzata per singolo antibiotico

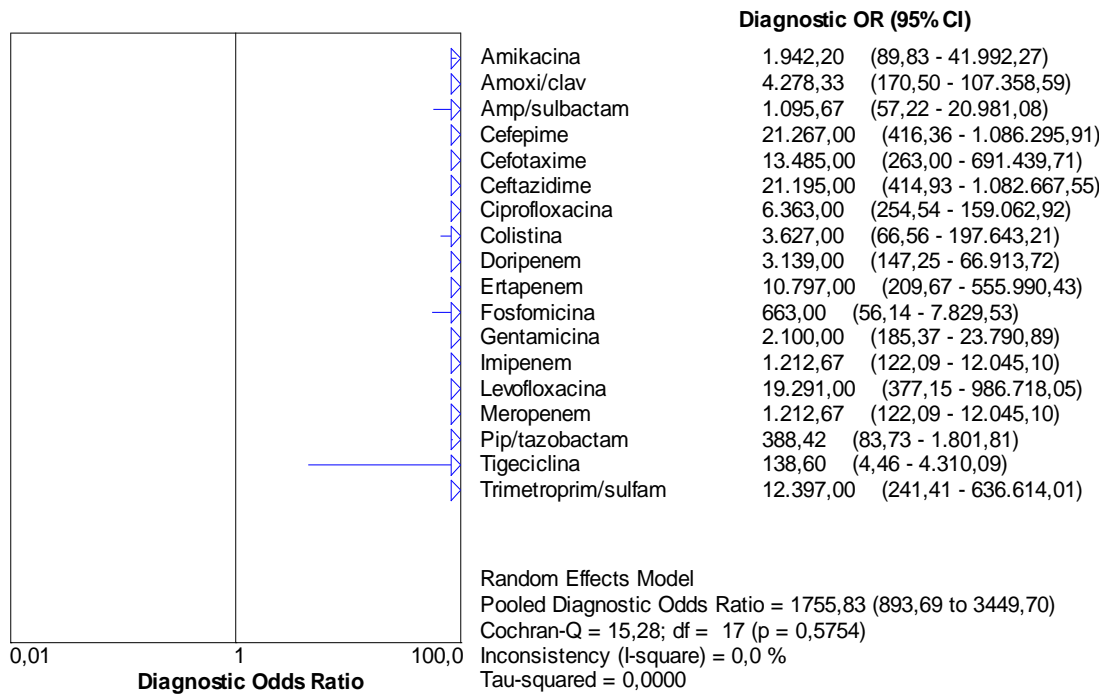
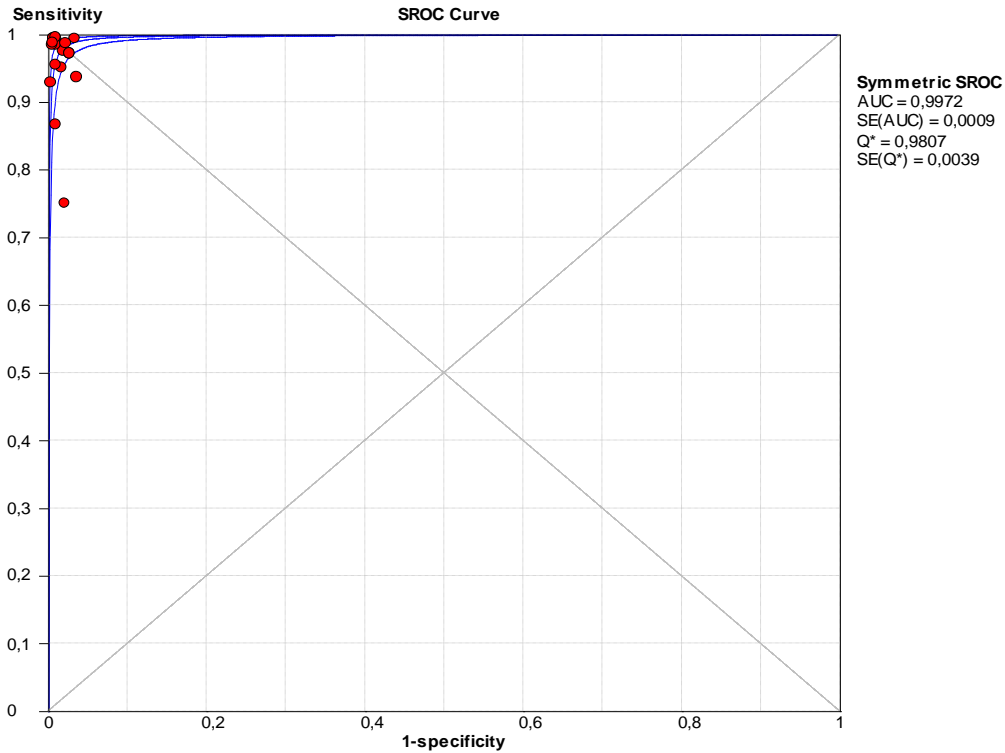


Figura 20 - ROC curve di sensibilità e specificità del test



Inoltre, sono stati calcolati i seguenti parametri di predittività, come indicato in *tabella 21*.

*Tabella 21 -: Parametri di predittività del test*

	PPV	NPV	Pre-test odds	Post-test odds
	0.98	0.99	0.568	49.333
95% IC	0.968-0.987	0.984-0.994	0.523-0.616	28.71-84.74

Infine, l'analisi dei dati eseguita non suddividendo i due gruppi di ceppi per fenotipo di resistenza non ha dimostrato differenze di rilievo, mantenendo risultati accettabili sia in termini di sensibilità/specificità che in termini di predittività, seppur sia stata evidenziata una diminuzione della sensibilità nel test eseguito su ceppi non MDR (*tabella 22*).

*Tabella 22- Parametri del test per i due gruppi MDR/XDR e non MDR/XDR*

	Ceppi MDR/XDR	Ceppi non MDR
Sensibilità (%)	98.7	93.6
Specificità (%)	97.7	99.6
Likelihood Ratio +	43.400	290.6
Likelihood Ratio -	0.012	0.063
Valore predittivo pos	98.1	96.1
Valore predittivo neg	98.3	99.4

### **3.6 Analisi dopo valutazione critica degli errori**

Dopo una valutazione caso per caso degli errori riportati, alla luce delle considerazioni che saranno descritte dettagliatamente in sede di discussione, è stata eseguita un'ulteriore analisi statistica, valutando caso per caso l'esclusione di alcuni errori dal numero totale.

In particolare, è stata corretta l'interpretazione di "falso resistente" o "falso sensibile" ove la categorizzazione rilevata con il metodo rapido appariva corretta rispetto alla lettura del fenotipo globale del ceppo (4 minor errors su Meropenem, 1 Major error su Imipenem e 3 minor errors su Imipenem). Sono stati poi eliminati gli antibiotici con



maggior presenza di errori (Ampicillina/sulbactam, Piperacillina/tazobactam e Fosfomicina).

Dopo tali correzioni, è stata ripetuta l'analisi statistica e dei tassi Categorical Agreement e Essential Agreement. I risultati, piuttosto soddisfacenti per tutti i parametri, sono descritti nelle *tabelle* (23-24) e nelle *figure* (21-25).

*Tabella 23 - Parametri del test dopo revisione critica degli errori, nel totale dei ceppi e per i due gruppi MDR/XDR - non MDR/XDR*

	Tutti i ceppi	Ceppi MDR/XDR	Ceppi non MDR
Sensibilità (%)	99.5	99.4	100
Specificità (%)	99.5	98.2	99.8
Likelihood Ratio +	191.9	56.4	804
Likelihood Ratio -	0.005	0.0	0.0
Valore predittivo pos	98.5	98.5	98.2
Valore predittivo neg	99.8	99.2	100

*Figura 21 - Sensibilità del test, calcolata dopo revisione critica degli errori, globale e analizzata per singolo antibiotico*

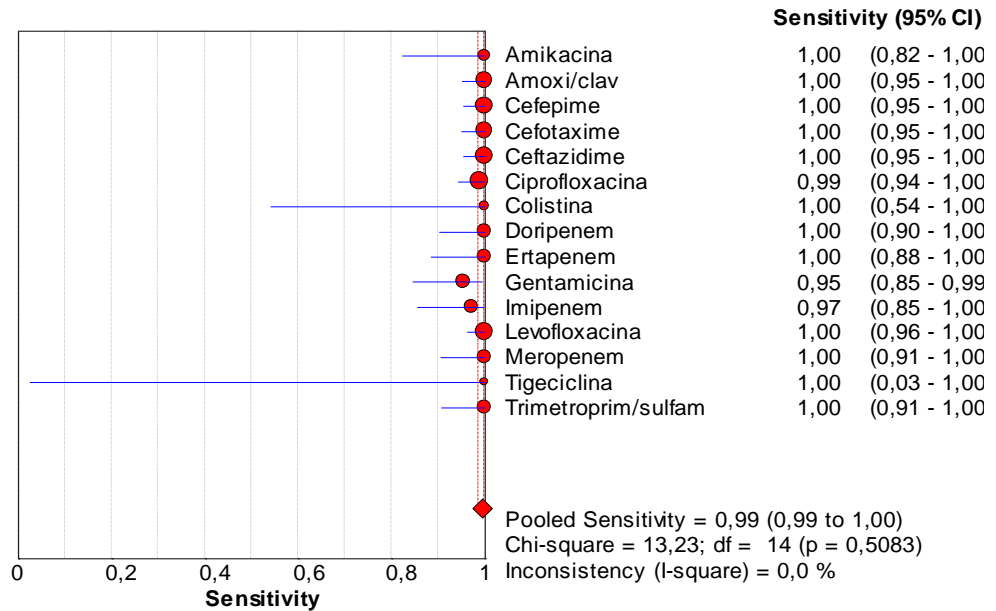


Figura 22 - Specificità del test, calcolata dopo revisione critica degli errori, globale e analizzata per singolo antibiotico

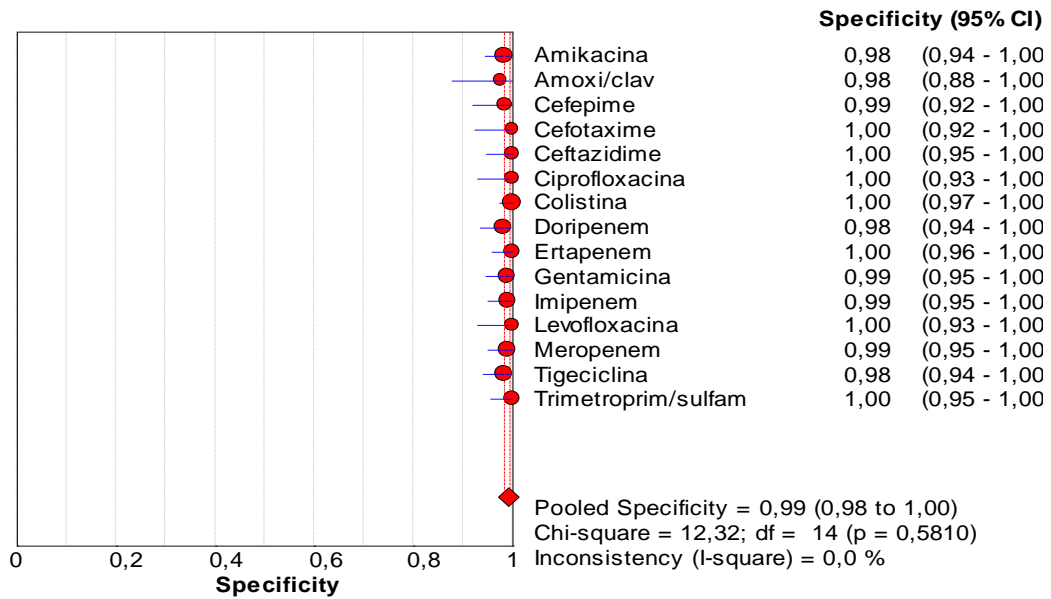


Figura 23 - Rapporto di verosimiglianza positivo (LR+) del test, calcolato dopo revisione critica degli errori, globale e analizzata per singolo antibiotico

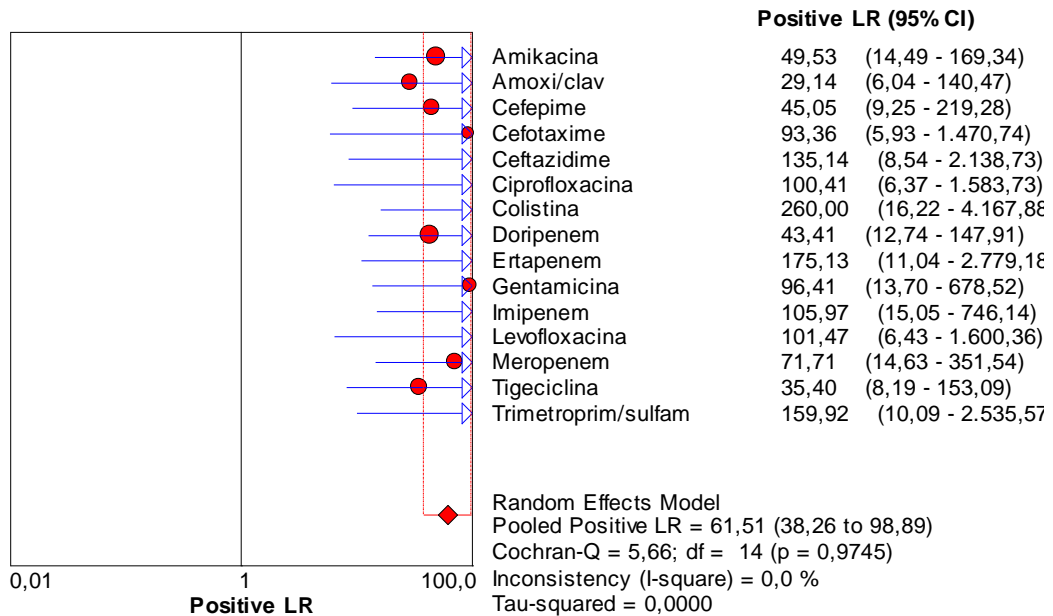


Figura 24 - Rapporto di verosimiglianza negativo (LR-) del test, calcolato dopo revisione critica degli errori, globale e analizzata per singolo antibiotico

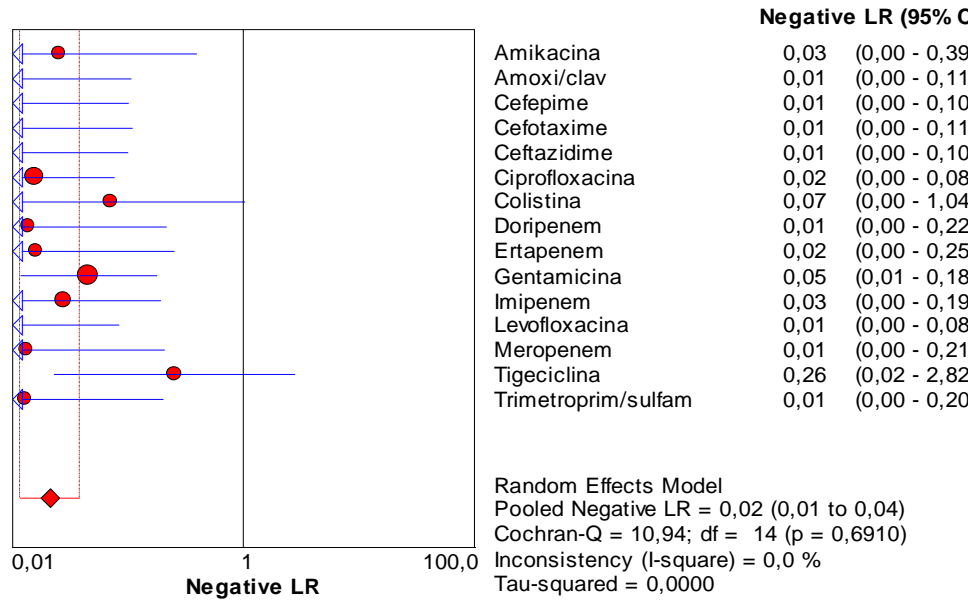


Figura 25 - Odds Ratio Diagnostico (DOR) del test, calcolato dopo revisione critica degli errori, globale e analizzata per singolo antibiotico

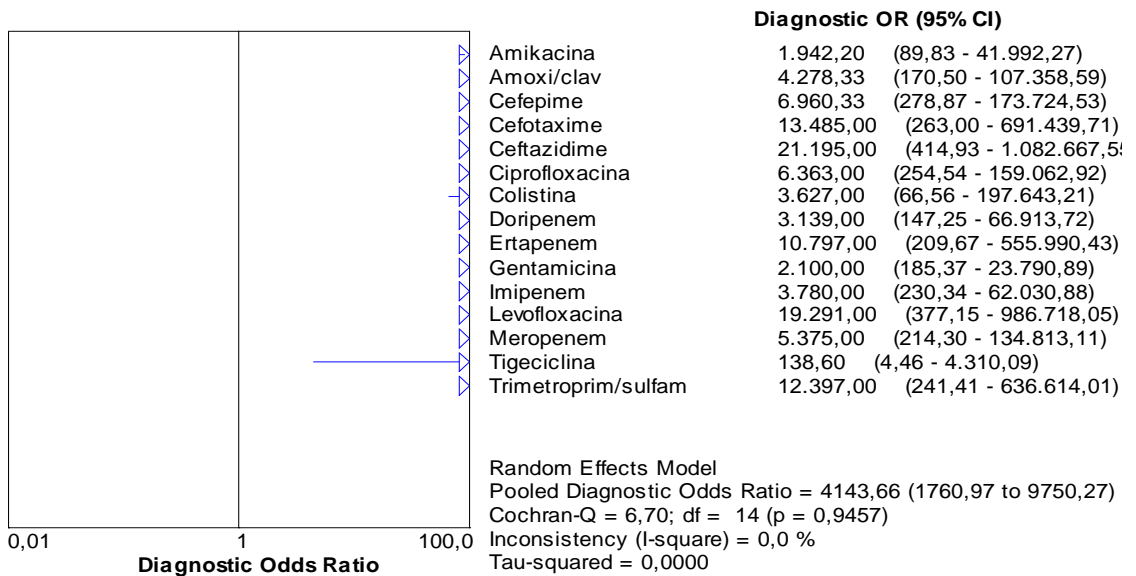


Tabella 24 - Confronto, dopo revisione critica degli errori, tra le MIC ottenute con il percorso diagnostico rapido e di riferimento per tutti i ceppi tes

**Concordanza tra le MIC per tutti i ceppi testati secondo correzione critica degli errori**

Tipo di antimicrobico	Numero di combinazioni microrganismo- antibiotico	Esito della MIC di riferimento <sup>a</sup>			Numero (%) di errori <sup>b</sup>			Categorical Agreement (%)	Essential Agreement (%)
		R	I	S	VME	ME	mE		
Amikacina	145	17	3	125			4	97,2	99,3 (1)
Amoxi/clav	118	83		35		1		99,1	100
Cefepime	145	72	5	68		1	6	95,2	97,9 (3)
Cefotaxime	118	72		46				100	99,1 (1)
Ceftazidime	145	73	4	68		1	4	96,6	98,6 (2)
Ciprofloxacina	145	95		50				100	99,3 (1)
Colistina	145	6		139				100	100
Doripenem	145	32	5	108		1	2	97,3	100
Ertapenem	118	29		89				100	100
Gentamicina	145	44	1	100	1		2	97,3	99,2 (1)
Imipenem	145	27	9	109				100	99,3 (1)
Levofloxacina	145	94	1	50			0	100	100
Meropenem	145	24	12	109			1	99,3	99,3 (3)
Nitrofurantoina*	72			72				100	100
Tigeciclina	118			118			3	97,5	100
Trimetoprim/sulfam	118	51	1	66				100	99,1 (1)
<b>Tot.</b>	<b>2112</b>	<b>719</b>	<b>41</b>	<b>1352</b>	<b>1 (0.1)</b>	<b>4 (0.3)</b>	<b>22 (1.0)</b>	<b>98,7</b>	<b>99,4</b>

a. Esiti della MIC di riferimento che hanno evidenziato un microrganismo sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R) ad uno degli antimicrobici testati

b. Numero di errori suddivisi in Very Major Error (VME), Major Error (ME) e Minor Error (mE)

\* Antimicrobico non utilizzato in terapia in caso di sepsi

# DISCUSSIONE

## Introduzione e selezione dei ceppi

Nelle ultime decadi, la ricerca scientifica in campo microbiologico sta sempre più concentrando i propri sforzi sulla validazione di strategie rapide, efficienti ed il più possibile economiche per l'identificazione di specie e del profilo di sensibilità agli antibiotici. In questo contesto, da un lato le tecniche di biologia molecolare appaiono essere le più promettenti per le future applicazioni diagnostiche, soprattutto in termini di rapidità e per la possibilità di essere utilizzate anche in campioni negativi o laddove è già in corso un'antibioticoterapia. Nel contempo, però, gli strumenti di biologia molecolare al momento disponibili non possono surrogare completamente i test fenotipici a causa dei costi, la non semplice fruibilità in laboratori di primo livello, e la necessità di fornire al clinico, oltre alla presenza o meno di un gene di resistenza, anche la sensibilità ai vari farmaci. Pertanto, la valutazione del fenotipo batterico risulta tutt'ora il gold standard, sia per quanto riguarda l'identificazione dell'antibiotico-resistenza che, soprattutto, il profilo di sensibilità. Per questo motivo, risulta più che mai cruciale discutere e rivedere le metodiche diagnostiche attualmente in uso, allo scopo di continuare a garantire precisione e accuratezza accorciando però i tempi di refertazione e adottando strategie pratiche e versatili per il laboratorio. Oggi più che mai l'antimicrobial stewardship si fonda sul lavoro del microbiologo, soprattutto nel caso di infezioni critiche come quella del torrente circolatorio: in questi casi, una diagnosi il più possibile rapida e il più possibile esatta guida il clinico alla scelta più corretta in termini di terapia, producendo maggior tassi di efficacia farmacologica, minor costi e maggior risparmio di classi terapeutiche per necessità future.

Alla luce di queste premesse, il nostro studio ha indagato una metodica di laboratorio già in uso nella routine diagnostica, modificata nel dettaglio della semina (eseguita a spot invece che con modalità semi-quantitativa). Tale modifica influenza positivamente le tempistiche di refertazione, anticipando di 24 ore non solo l'identificazione di specie

ma anche il profilo di resistenza. Già nel 2014, Sarti e collaboratori avevano proposto la semina a spot per l'identificazione tramite Vitek-MS® dopo sole 5 ore di incubazione, dimostrando con tali metodiche e tempistiche il raggiungimento di una sensibilità e specificità accettabili per un laboratorio microbiologico. Per quanto riguarda però la validità di tale metodica nella determinazione delle Minime Concentrazioni Inibenti tramite brodo-diluizione, la letteratura è tutt'ora piuttosto scarna. In particolare, mancano studi riguardanti l'accuratezza diagnostica e l'analisi di eventuali criticità legate alla crescita batterica e l'espressione dei vari fenotipi di resistenza presenti. Tali dati sono assolutamente necessari per poter assicurare un referto preciso ed affidabile al clinico ed al paziente e per poter riorganizzare conseguentemente i protocolli operativi dei laboratori, in vista di un lavoro di refertazione più continuativo nell'arco delle 24 ore.

Per il nostro studio, pertanto, abbiamo scelto di selezionare ceppi di batteri Gram negativi simulando il work-flow dell'Azienda Ospedaliera di Padova per l'analisi delle emocolture positive. Per l'esecuzione dell'antibiogramma, il metodo tradizionale attualmente in uso, con tecnica di semina semi-quantitativa, è stato messo a confronto con un nuovo metodo più rapido che utilizza una tecnica di semina "a spot". Per questo motivo, abbiamo incluso nello studio i ceppi dei batteri Gram negativi selezionati presso il Servizio di Microbiologia, Dipartimento di Medicina Molecolare, Azienda Ospedaliera di Padova, in corso della routine diagnostica, scegliendo le specie che potrebbero essere più facilmente esaminate con la nuova metodica, date le intrinseche caratteristiche di rapida crescita e la necessità di rapidità diagnostica in caso di sepsi causate da questi patogeni. I ceppi sono stati selezionati considerando i fenotipi di resistenza prevalenti evidenziati nei report epidemiologici locali. La prova, per la maggior parte dei meccanismi di resistenza esaminati, è stata effettuata simulando in prospettiva una condizione peggiorativa dei tassi di resistenza locali, secondo quanto recentemente rilevato nel report aziendale basato su tutti i ceppi isolati nel primo semestre 2017 (*figura 14*).

## Valutazione della ripetibilità e dell'accuratezza diagnostica

L'analisi preliminare dello studio ha considerato la riproducibilità della metodica rapida su una selezione di ceppi peculiari. In particolare, abbiamo scelto di utilizzare per questa valutazione un ceppo totti-sensibile di *E. coli*, un ceppo di *E. coli ESBL*, un ceppo di *P. aeruginosa* MDR ed un ceppo di *K. pneumoniae* XDR. Nel totale delle 670 osservazioni non sono stati osservati errori con diluizioni > 1, ottenendo un Essential Agreement di precisione del 100% ed un Categorical Agreement di Precisione del 98.5%.

E' stata poi condotta l'analisi su tutti i 145 ceppi selezionati, allo scopo di valutare gli errori per il calcolo del Categorical Agreement e l'Essential Agreement, entrambi ampiamente all'interno dei criteri di accettabilità, stabiliti essere maggiori di 90.

Da tali risultati, dunque, la metodica rapida è risultata essere ripetibile ed accurata nell'analisi delle emocolture da germi Gram negativi come *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

La conferma di tale dato è stata ottenuta anche dall'analisi statistica dei dati complessivi, tramite l'analisi dei parametri di sensibilità, specificità, rapporto di verosimiglianza positivo e negativo, Odds-ratio diagnostico, insieme ai valori predittivi positivo e negativo. Infine, i due test (MIC da coltura rapida o tradizionale) sono risultati concordanti anche correggendo la variabilità secondo casualità, evidenziando indici di concordanza molto buoni.

Infine, così come il Categorical Agreement e l'Essential Agreement, anche gli errori rilevati, analizzati per singolo antibiotico e sul totale delle MIC determinate, sono risultati entro il limite del metodo, che prevedeva per i minor errors un'accettabilità con valori < al 5%, per i major errors un'accettabilità con valori < al 3%, e per i Very major errors un'accettabilità con valori  $\leq$  all'1,5% (Patelet al, 2013). Tuttavia, alcune considerazioni sono sorte dall'analisi differenziata per tipologia di fenotipo di sensibilità espresso.

In primo luogo, il confronto tra i ceppi MDR/XDR e quelli non MDR hanno dimostrato la presenza statisticamente significativa di un maggior numero di errori di categoria (CA) nei ceppi più resistenti, ed in particolare per quanto riguarda la presenza di minor Errors. Tale considerazione non è però supportata dal relativo tasso di errori essenziali (EA), mostrando come gli errori nei due gruppi sono ugualmente distribuiti per quanto riguarda le diluizioni al raddoppio. Queste osservazioni suggeriscono che maggiore è il grado di resistenza espresso e maggiore è la possibilità di sbagliare l'interpretazione della categoria di appartenenza basandosi sui valori di MIC ottenuti con qualsivoglia metodo utilizzato per l'antibiogramma. E' da notare che, nel nostro caso, la differenza dei valori di MIC ottenuti con i due metodi a confronto è stata praticamente sempre contenuta entro una diluizione al raddoppio; ciò accade per lo più quando il test di suscettibilità rileva resistenza intermedia ad un antimicrobico, ove un errore di diluizione (sia in aumento che in diminuzione) è sufficiente per modificare l'interpretazione di categoria. Questo limite tecnico, ritenuto accettabile, è comunque un dato che merita di essere maggiormente divulgato in ambito clinico per tutte le implicite conseguenze di ordine terapeutico e assistenziale che comporta.

Per quanto riguarda i ceppi non MDR, al contrario, l'analisi statistica ha dimostrato una sensibilità inferiore rispetto a quelli MDR/XDR, probabilmente dovuto alla presenza di 4 valori falsi positivi (1 Major Errors e 3 minor errors) su *E. coli* e *P. aeruginosa*, che hanno più frequentemente portato dunque a sovrastimare la presenza di resistenza in questi ceppi che invece non presentavano fenotipi di resistenza maggiore. Dal punto di vista clinico, la sovrastima è un errore considerato di minor impatto, in quanto esclude una molecola antimicrobica dalla scelta clinica ma non necessariamente impatta sull'efficacia della restante terapia e dunque sulla mortalità del paziente.

Infine, nel gruppo dei ceppi sensibili, si è rilevato un valore predittivo positivo sensibilmente inferiore a quello del gruppo dei ceppi MDR/XDR. Tale dato potrebbe essere derivato dalla presenza di 4 Very Major Errors di *E. coli* sulle beta-lattamine (3 su ampicillina/sulbactam e 1 su piperacillina/tazobactam), che saranno analizzati nel dettaglio tra poco, e che hanno superato il limite di accettabilità (< 1.5%) dei VME nel



totale dei ceppi non MDR (4 VME su 92 osservazioni di resistenza, 4.4%). A supporto di quest'ultimo dato, è stato valutato un confronto tra la differenza di Major Errors e Very Major Errors: tale differenza non è risultata statisticamente significativa analizzando tutti i ceppi insieme ( $\chi^2 = 1.5$ , con  $p 0.2196$ ), mentre per quanto riguarda i ceppi sensibili si è rilevato un aumento significativo di Very Major Errors probabilmente influenzato proprio dai riscontri sulle beta-lattamine sopra riportati ( $\chi^2 = 18.2$ , con  $p 0.0000$ ).

Date queste considerazioni generali, si è ritenuto opportuno di analizzare caso per caso gli errori rilevati, valutati per singolo antibiotico e/o per ceppo considerato.

#### 1. Very major errors su ampicillina/sulbactam e piperacillina/tazobactam

Gli errori qui riportati, che hanno poi influenzato anche l'analisi statistica sopra descritta, sono stati descritti nei ceppi di *E. coli* ESBL (1 VME per amp/sulb e 1 VME su pip/taz) e non ESBL (3 VME per amp/sulb e 1 VME su pip/taz).

Per queste osservazioni, con il percorso diagnostico di riferimento abbiamo rilevato fenotipicamente la possibile presenza di enzimi tipo  $\beta$ -lattamasi: nel dettaglio, in due ceppi abbiamo riscontrato la presenza di enzimi tipo ESBL e negli altri due la presenza di enzimi tipo penicillinasi. Valutando gli stessi ceppi con il percorso diagnostico rapido, abbiamo potuto comunque confermare la presenza di ESBL, ottenendo, analogamente al metodo di riferimento, risultati di "non sensibilità" nei confronti delle cefalosporine di 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> generazione presenti sul pannello.

I restanti due ceppi di *Escherichia coli* che in combinazione con Piperacillina/Tazobactam hanno fatto registrare altri 2 VME, erano fenotipicamente dei probabili produttori di penicillinasi. In uno, il percorso diagnostico rapido non ha identificato la resistenza all'antibiotico, mentre nell'altro, ha segnalato la possibile presenza di penicillinasi grazie ad un risultato di resistenza nei confronti di Amoxicillina/Clavulanato. In linea teorica, quest'ultimo risultato di resistenza verso l'Amoxicillina/Clavulanato, che ha anche generato un ME, potrebbe essere

interpretato alla stregua di un risultato analogo e complementare alla resistenza nei confronti di Ampicillina/Sulbactam ottenuta con il percorso diagnostico di riferimento. E' da notare, infine, che con il percorso diagnostico rapido è stato comunque possibile rilevare la presenza di ESBL anche nei 2 ceppi in cui sono stati osservati i 2 VME associati alla Piperacillina/Tazobactam.

Alla luce di tali considerazioni, dunque, nella prospettiva di un utilizzo clinico, si potrebbe decidere di non riportare nel referto i risultati ottenuti con i questi due antibiotici che hanno fatto registrare il maggior numero di VME. In tal modo, verrebbero ad essere azzerati ben 6 VME dei 9 complessivamente registrati, senza incidere significativamente nella scelta delle potenziali opzioni terapeutiche e, cosa altrettanto importante, continuando a rilevare efficacemente i meccanismi di resistenza eventualmente presenti.

## 2. Altri errori su piperacillina/tazobactam

In aggiunta ai Very Major errors sopra descritti, sono stati osservati ulteriori 9 errori sull'interpretazione di categoria per piperacillina/tazobactam, con 6 errori con differenza di diluizione > 1.

Tali errori (1 ME e 8 minor errors), si sono per lo più mostrati nei ceppi di *E. coli* ESBL (3 ME con 2 errori essenziali con differenza di 4 diluizioni al raddoppio) e non ESBL (3 mE con 2 errori essenziali rispettivamente di 2 e 4 diluizioni di differenza al raddoppio), considerando negli altri casi 1 mE in *K. pneumoniae* ESBL (Essential Agreement 100%), 1 mE in *P. aeruginosa* non MDR (con differenza di 4 diluizioni), ed infine 1 ME in un ceppo di *P. aeruginosa* MDR (con differenza di 2 diluizioni).

Tali errori si sono rivelati essere in tutti i casi sovrastime del fenotipo di resistenza, con quindi un impatto di minor rilevanza nella pratica clinica delle infezioni correlate al torrente circolatorio. Inoltre, il riscontro in questi casi di resistenza alla piperacillina/tazobactam è stato nella maggioranza dei casi coerente con il profilo fenotipico globale del ceppo analizzato e spesso più verosimile della categoria

refertata con il metodo tradizionale. Infine, la presenza di differenze così significative nelle diluizioni al raddoppio è difficilmente spiegabile con un errore tecnico ma è compatibile, quasi certamente, con l'espressione fenotipica di un sottostante meccanismo di resistenza ai Beta-lattamici.

### 3. Minor errors su cefepime

Le osservazioni già fatte precedentemente per i ME in merito al dosaggio dei  $\beta$ -lattamici, vengono confermate ulteriormente dall'osservazione analitica dei minor errors su cefepime. Infatti, riportiamo come i 5 mE e il ME riscontrati nel dosaggio del Cefepime in combinazione con i ceppi di *E. coli* ESBL hanno fatto registrare un Categorical Agreement per questi ceppi non accettabile all'83.8% (*tabella 12*). Tali errori risultano comunque avere un impatto relativo per il fatto che, nel caso del Major Error, era evidente la presenza di Beta Lattamasi a spettro esteso con prevedibile non sensibilità a cefepime; inoltre i minor errors erano tutti oscillanti tra un fenotipo di resistenza Intermedia o Resistente (sia in sovrastima che in sottostima), per cui difficilmente di impatto clinico in un contesto di resistenza completa o intermedia anche alle altre cefalosporine.

Anche il Categorical Agreement per cefepime nei ceppi di *P. aeruginosa* è risultato inferiore ai criteri di accettabilità (*tabella 16*), con un valore di 83.3: in realtà i campioni di tale ceppo analizzati sono stati purtroppo di numero esiguo, non permettendo un'analisi comparabile agli altri ceppi dal punto di vista numerico.

### 4. Minor errors per carbapenemici nei ceppi di *K. pneumoniae* MDR/XDR

Sono invece significativi gli 8 errori riscontrati sui carbapenemici nei ceppi di *K. pneumoniae* MDR/XDR (*tabella 14*). Nella valutazione di tali dati, è importante sapere che dei 36 ceppi, 6 erano portatori di Beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e 30 produttori di carbapenemasi. Gli errori sono stati osservati su imipenem (1 ME e 3 minor errors) e su meropenem (4 minor errors), in entrambi i casi ottenendo un

Categorical Agreement di 88.9, inferiore ai limiti di accettabilità, ed un Essential Agreement nei limiti di accettabilità ma inferiore al 95%. Tali errori si sommano ad altri 3 (1 ME e 2 mE) su Doripenem, senza però un impatto significativo sul tasso categorico e con un Essential Agreement del 100%. La prima osservazione è che in soli due casi sugli 11 errori rilevati due errori si sono verificati in contemporanea su uno stesso ceppo, ad indicare che in 9 ceppi sui 36 di *K. pneumoniae* MDR/XDR almeno un carbapenemico era errato, seppur in misura minore (25%). Tale dato appare allarmante, soprattutto considerando l'importanza che i carbapenemici hanno nella pratica clinica delle infezioni correlate al torrente circolatorio, in questi di tempi di resistenza ingravescente alle terapie di prima linea e di pratica medica sempre più di approccio difensivo. In realtà, in casi 9 su 11 l'errore riportato è stato di sovrastima, portando all'osservazione che, pur nella consapevolezza della disponibilità di soli 36 ceppi per tale analisi, la metodica rapida apparirebbe più congruente con il fenotipo di resistenza globale osservato rispetto alla metodica standard. I restanti 2 casi sottostimati con un minor error dato sensibile con la metodica rapida e intermedio con la metodica standard, sono avvenuti in contemporanea su un ceppo resistente ad Ertapenem e Doripenem, lasciando pochi dubbi sulla presenza di carbapenemasi e dando poco spazio all'interpretazione clinica nell'uso di imipenem e meropenem.

##### 5. Considerazioni generali su beta-lattamici

In generale, è da notare che, sul totale dei 56 errori osservati, 41 errori sono stati rilevati associati al dosaggio di beta-lattamici (73.2%). Una possibile spiegazione di tutta la diversa tipologia di errori, qui sopra descritta, può essere dovuta al fatto che le beta-lattamasi possono non esprimersi completamente dal punto di vista fenotipico a prescindere dal tipo di antibiogramma eseguito.

Infatti, si possono avere dei valori di MIC anche molto bassi nei confronti di alcune molecole sia pure in presenza del determinante genetico della resistenza. Del resto, una scarsa attendibilità dei risultati, in particolare per le associazioni di una penicillina con un inibitore suicida delle beta lattamasi, è stata già riportata nel corso di altri

tentativi tesi alla validazione dell'antibiogramma rapido (Zappavigna et al, 2013). La variabilità dell'espressione fenotipica e la sua imprevedibilità, rendono cruciale una lettura critica dell'antibiogramma da parte di personale esperto e in grado di individuare meccanismi di resistenza anche non completamente espressi, allo scopo di integrare e ottimizzare la terapia antibiotica secondo il miglior referto possibile di suscettibilità o resistenza.

#### 6. Considerazioni su fosfomicina

L'ultima considerazione riguardo agli errori rilevati riguarda la fosfomicina. Questa molecola non viene praticamente mai usata per il trattamento delle infezioni sistemiche in monoterapia, ove è utilizzata quasi esclusivamente per le infezioni delle vie urinarie perché raggiunge concentrazioni elevatissime e supera di decine di volte le concentrazioni di screening utilizzate nell'antibiogramma. La molecola è eventualmente utilizzata per via sistemica in associazione con altri farmaci, assumendo un ruolo importante soprattutto per il suo profilo di penetrazione nei tessuti e la sua biodisponibilità. Per il nostro studio, fosfomicina è stata saggiata in 118 combinazioni microrganismo/antibiotico. I risultati del percorso di riferimento hanno dimostrato la presenza 12 ceppi resistenti e di 106 sensibili. In contrasto, l'antibiogramma del protocollo diagnostico rapido ha dimostrato la presenza di 2 VME e 1 ME nei ceppi di *K. pneumoniae* MDR/XDR (tabella 14), con un impatto sui valori globali di sensibilità (0.87) e sul tasso di verosimiglianza negativo (LR- = 0.13, con interpretazione del test come "raramente utile"). Alla luce di tali considerazioni, riteniamo che tale molecola non sarebbe da includere in un eventuale referto di emocolture ottenuto col percorso diagnostico rapido, lasciando spazio al suo uso in una eventuale seconda linea dopo conferma con un test con metodo tradizionale.

## 7. Considerazioni su tigeciclina

Anche per tigeciclina l'analisi statistica globale ha evidenziato un basso valore di verosimiglianza negativo e un basso Odds-ratio diagnostico, dovuto alla presenza di 3 minor errors nei ceppi di *K. pneumoniae* MDR/XDR. Tale molecola, però, raramente risulta di prima linea nella terapia delle infezioni del torrente circolatorio, e, a parziale discolora del metodo rapido in esame, presentano dati non accurati anche con alcuni sistemi commerciali utilizzati di routine (Zarkoteu et al, 2012). Comunque sia, qualora occorresse utilizzarli in associazioni antibiotiche verso infezioni severe causate da Gram negativi XDR o PDR, un loro dosaggio adeguato potrebbe essere fatto contemporaneamente con un altro metodo più affidabile.

## 8. Rivalutazione dei dati secondo analisi critica

Come descritto nei risultati, alla luce delle considerazioni sopra riportate gli esperti del gruppo di ricerca hanno valutato caso per caso l'eventuale esclusione di alcuni errori dal numero totale.

Come atteso, i parametri di valutazione (sensibilità, specificità e valori predittivi) sono apparsi complessivamente soddisfacenti, dimostrando un Categorical Agreement del 98.7% e un Essential Agreement del 99.4%.

Tali dati potrebbero probabilmente essere ulteriormente migliorati, specie per quanto riguarda il numero di errori (minor errors), se la consultazione EUCAST (2017) sulla definizione della sensibilità intermedia esitasse in un appianamento di tale "zona grigia". Al momento, infatti, la variabilità della refertazione entro una diluizione e la comunicazione di quel che sembra un "I don't know", lasciano microbiologi e clinici nello stato di dover valutare personalmente, secondo l'interpretazione globale dell'antibiogramma, se la molecola antimicrobica considerata può essere utilizzata (magari incrementando la dose) o se invece si prevede che non funzioni in vivo.

## CONCLUSIONI

L'incremento dell'incidenza di infezioni da germi multi resistenti e la necessità di implementare sempre più i programmi di antimicrobial stewardship impongono al microbiologo lo sforzo crescente di collaborare con il clinico, il farmacista e l'epidemiologo ad un progetto unico, che preveda una diagnosi rapida, precisa e accurata del quadro clinico e dell'agente eziologico. Per tale motivo, è cruciale l'integrazione in un percorso diagnostico condiviso nella cura del paziente con infezioni severe, allo scopo di individuare il rischio di criticità (grazie a parametri biochimici ed il monitoraggio al letto del malato) e di ottimizzare le strategie diagnostiche e terapeutiche a disposizione. In questo quadro complesso, le infezioni del torrente circolatorio rappresentano un punto nodale, richiedendo una diagnostica microbiologica innovativa, in grado di ridurre i tempi di risposta degli esami microbiologici, possibilmente con percorsi diagnostici dedicati e personale qualificato con competenze tecniche specialistiche. In questa prospettiva, il laboratorio deve considerare l'opportunità di rivedere la propria organizzazione interna, individuando e realizzando soluzioni tecniche ed organizzative dedicate *in primis* al paziente di "area critica".

Il nostro studio ha operato in questo contesto, allo scopo di validare una metodica innovativa rapida per la determinazione della Minima Concentrazione Inibente con tempi di refertazione dell'antibiogramma anticipati di almeno 24 ore. Tale arco di tempo può essere di vitale importanza per buona parte di pazienti critici, ma ovviamente la rapidità di refertazione non deve essere fornita a discapito di una riduzione dell'accuratezza diagnostica.

I dati ottenuti con la metodica rapida sono risultati in generale soddisfacenti, mostrando tassi di riproducibilità e di concordanza molto più alti del limite di accettabilità (Categorical Agreement 97.8%, Essential Agreement 99%). Anche gli errori rilevati, analizzando i singoli antibiotici e il totale delle MIC complessivamente determinate, sono risultati entro il limite di accettabilità del metodo, suggerendo che per la maggior parte degli antibiotici testati la metodica rapida di determinazione delle

MIC è in generale affidabile sia nei risultati valoriali delle MIC che per la classificazione della categoria interpretativa di appartenenza.

Sono emerse tuttavia alcune criticità, riguardo alla presenza di alcune discrepanze significative. Innanzitutto, è emersa la scarsa attendibilità dei risultati relativi a tre molecole tra le 19 analizzate (Ampicillina/Sulbactam, Piperacillina/Tazobactam e Fosfomicina). A nostro avviso, un antibiogramma “rapido” che escluda la refertazione di queste tre molecole farebbe rientrare nei limiti di accettabilità i VME e non pregiudicherebbe affatto la possibilità sia di individuare eventuali meccanismi di resistenza sottostanti che di poter selezionare una terapia antimicrobica efficace con un anticipo di circa 24 ore. Resta aperta la discussione se poi testare le altre molecole secondo metodo tradizionale o valutare il prosieguo diagnostico a seconda dell’andamento clinico del paziente. Certo è che nel caso di infezioni rapidamente evolventesi come le sepsi occorre studiare un canale di comunicazione e collaborazione diretto tra laboratorio e reparto allo scopo di adeguare il processo microbiologico al singolo paziente.

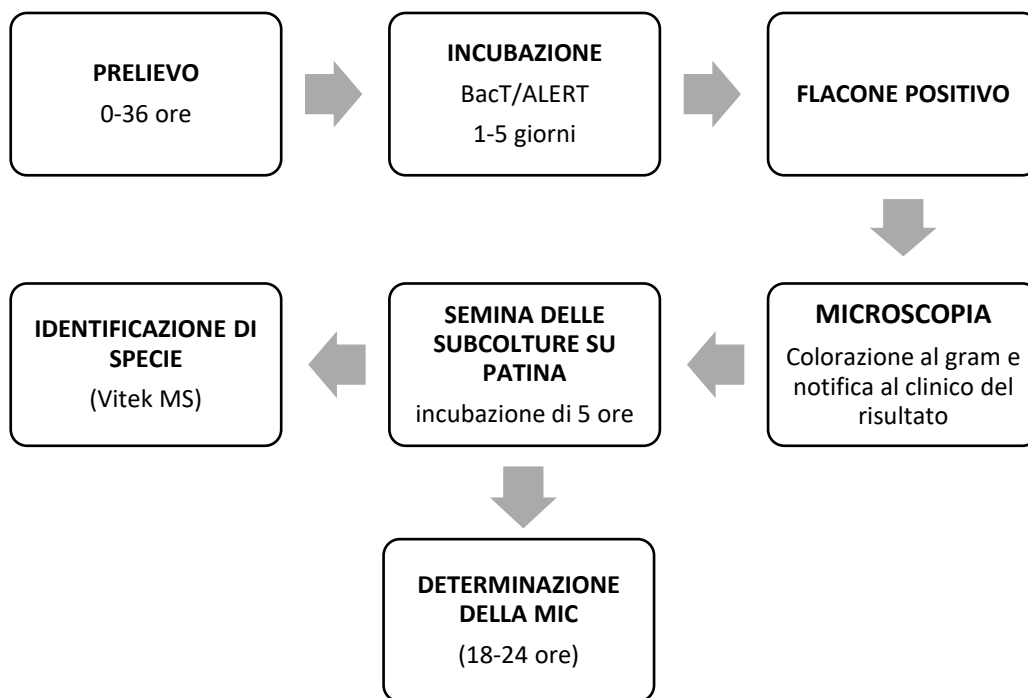
In secondo luogo, sono stati osservati alcuni numerosi minor errors, specie su cefalosporine in ceppi di *E. coli* ESBL e su carbapenemici in ceppi di *K. pneumoniae* MDR/XDR. Queste osservazioni e l’analisi statistica eseguita suggeriscono che, maggiore è il grado di resistenza espresso dai microrganismi, maggiore è la possibilità di “sbagliare” l’interpretazione della categoria di appartenenza basandosi sui valori MIC del metodo rapido, anche se i risultati ottenuti con questo metodo hanno differito sempre di non più di una diluizione al raddoppio rispetto al metodo tradizionale. Tale dato conforta, anche se solo parzialmente, in quanto, sia nell’eventuale ripetizione che nella lettura dell’antibiogramma da parte di operatori differenti, la differenza del valore della MIC di una sola diluizione è considerata accettabile. I dati dell’antibiogramma rapido, generalmente, sembrano mettere meglio in evidenza l’eventuale presenza dei meccanismi di resistenza più diffusi e monitorati attraverso i dati epidemiologici locali. Questa apparente maggiore sensibilità del metodo rapido ha generato una tendenza alla sovrastima dei valori di MIC rispetto al metodo



tradizionale. Tuttavia, va sottolineato che, nella maggioranza dei casi, il fenotipo identificato con il metodo rapido evidenziava correttamente il meccanismo di resistenza sottostante rilevato anche dall'antibiogramma tradizionale di riferimento. Tale considerazione porta alla conclusione di poter includere queste molecole nel referto, dato che eventuali differenze con il metodo standard non inficerebbero comunque l'esito prescrittivo del clinico.

Dalle raccomandazioni AMCLI (Sarti et al, 2014) e le conclusioni del nostro studio, dunque, sarà possibile modificare la procedura di analisi delle emocolture secondo la flowchart mostrata in *figura 26*, anticipando di 24 ore la refertazione rispetto quanto accade attualmente e mantenendo alti livelli di accuratezza diagnostica.

*Figura 26 - Algoritmo diagnostico proposto per la diagnosi microbiologica di sepsi*



Nella valutazione dei risultati del nostro studio, resta importante la riflessione che, dal punto di vista del monitoraggio epidemiologico, sia i dati locali di Padova che quelli del territorio nazionale vedono valori medi di MIC sempre più avvicinarsi ai valori di breakpoint, a causa del rapido incremento dei ceppi multi-resistenti tra gli isolati.

Inoltre, va ricordato che i meccanismi di resistenza possono essere espressi in maniera imprevedibile a prescindere dal tipo di antibiogramma eseguito, probabilmente in relazione a diverse fasi metaboliche dei microrganismi e/o alla variabile composizione dell'inoculo. Queste due considerazioni potrebbero spiegare, almeno parzialmente, la presenza di errori significativi come il frutto di una variabilità biologica non prevedibile né standardizzabile.

Uno dei compiti fondamentali del microbiologo, soprattutto nelle infezioni gravi, rimane quello di segnalare nel referto l'interpretazione fenotipica dell'antibiogramma, che non è la semplice categorizzazione tra "sensibile", "intermedio" o "resistente", ma l'interpretazione del possibile meccanismo alla base di eventuali resistenze. In corso di terapia, i meccanismi di resistenza non rilevati con l'antibiogramma si possono manifestare "*in vivo*" e possono essere causa di fallimenti terapeutici. Per questo motivo, la lettura dell'antibiogramma deve essere eseguita ed interpretata da personale esperto, allo scopo di individuare la terapia ottimale per lo specifico paziente, nello suo specifico contesto, con la specifica presentazione clinica. In particolare, reparti di area critica come quelli di terapia intensiva, ove le sepsi sono all'ordine del giorno, necessitano di iniziare la terapia antibiotica empirica in tempi rapidi, correttamente ed utilizzando antibiotici di "seconda e terza" linea, alla luce dei dati epidemiologici noti. Questo implica una conoscenza profonda da parte del clinico delle strategie a disposizione e la possibilità di confrontarsi con il microbiologo nella lettura dei test diagnostici rapidi e di riferimento per l'ottimizzazione del trattamento nel più breve tempo possibile. Lo scopo finale primario resta la cura del paziente, senza dimenticare che il medico oggi ha la responsabilità di agire per ridurre la pressione selettiva impropria sugli antibiotici.

In conclusione, la metodica testata per la determinazione rapida dell'antibiogramma nei germi Gram negativi analizzati ha dimostrato valori accettabili di concordanza con il metodo standard per la maggior parte delle molecole impiegate nella terapia antibiotica di prima linea per le infezioni del torrente circolatorio. Tra questi, valutiamo positivamente i risultati ottenuti con gli aminoglicosidi, i chinoloni, le cefalosporine e i

carbapenemi, che rappresentano le molecole di più vasto utilizzo clinico. A parziale conforto dei nostri dati, possiamo dichiarare che gli errori rilevati con il metodo rapido sono in linea con i dati presenti in letteratura e con i dati di validazione dei metodi commercializzati per la routine, ove la ripetibilità e l'affidabilità non sono mai al 100% rispetto al gold standard. Tale informazione deve essere ricordata sempre, sia al tavolo di laboratorio e che al letto del malato, ove l'interpretazione dell'antibiogramma e la scelta terapeutica devono sempre essere guidate da expertise, prudenza e monitoraggio clinico.



## **PROGETTO DI RICERCA 2**

**Uso della spettrometria di massa (MALDI-TOF)  
per la rilevazione precoce  
della resistenza ai fluorchinoloni**

## RAZIONALE DELLO STUDIO

La spettrometria di massa tramite MALDI-TOF è stata una delle applicazioni più innovative dell'ultimo decennio, con la sua introduzione in gran parte dei laboratori di microbiologia per l'identificazione routinaria di specie microbica. La facilità di esecuzione, la rapidità dell'analisi e l'elevata versatilità lo rendono infatti lo strumento perfetto per un workflow diagnostico efficace, efficiente e a basso costo. Come già descritto nell'introduzione, la sfida odierna è rappresentata dall'uso di questa procedura nella rilevazione di specifici meccanismi di resistenza, la cui rilevazione rapida routinaria da campioni biologici o colture potrebbe avere un'utilità nell'ottimizzazione della terapia antimicrobica di prima linea. L'opportunità che si prospetta con il MALDI-TOF è di rilevare con sollecitudine alcuni determinanti predittivi di resistenza, da segnalare preliminarmente e da integrare poi con l'antibiogramma tradizionale ed eventuali altri test di conferma (es. test molecolari). Tale percorso potrebbe infatti incoraggiare il clinico ad usare farmaci di prima linea, se indicato, o al contrario scongiurare l'uso di molecole inefficaci che potrebbero portare al fallimento terapeutico. Gli studi attualmente disponibili per questa applicazione sono solo preliminari, e l'evidenza di validità piuttosto scarsa, anche se più promettente per alcuni ceppi particolari come quelli di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (Zboromyrska et al, 2013).

Il problema della resistenza ai chinoloni e la loro difficile applicazione terapeutica nei nostri paesi a causa della bassa prevalenza di sensibilità potrebbe trovare una seppur parziale soluzione con un approccio diagnostico come quello sopra-descritto. La levofloxacina e la ciprofloxacina sono stati per lungo tempo considerati farmaci di prima scelta e sono pertanto stati sovra-utilizzati. Studi recenti in paesi europei, infatti, mostrano come il loro abuso sia correlato ad un altissimo tasso di resistenza, che arriva fino al 75% dei ceppi Gram negativi (Fournier et al, 2013). E' da notare poi che la resistenza ai chinoloni è stata considerata come il primo step, in parte necessario, per lo sviluppo di altre resistenze come quelle verso le beta-lattamasi a spettro esteso. Uno studio francese (Guillard et al, 2014) mostrava infatti che il 97% dei ceppi di

*Enterobacteriaceae* ESBL portava anche mutazioni correlate alla resistenza plasmidica ai chinoloni, definendola come un determinante maggiore ed in fase di crescente espansione anche a causa della rapida trasmissibilità.

Date tali premesse, il nostro studio ha valutato l'utilità e l'applicabilità di un percorso rapido per la rilevazione della resistenza plasmidica ai chinoloni. L'ipotesi è che tali mutazioni, isolate da altre mutazioni cromosomiche, possano essere predittive della resistenza a chinoloni e aminoglicosidi testata tramite antibiogramma tradizionale. Se i ceppi che producono il *qnr* sono però facilmente rilevabili anche tramite metodiche di PCR, la variante dell'amino-acetiltransferasi *aac(6')-Ib-cr* è in generale più difficile da rilevare a causa della necessità di identificare le mutazioni dei codoni 102 (Trp-Arg) e 179 (Asp-Tyr), cosa che rende poco praticabile la ricerca routinaria diagnostica. Dal punto di vista fenotipico, in letteratura è segnalata la possibilità di ritrovare la mutazione tramite diffusione su disco (Wachino et al, 2011), ma per ottenere risultati con questa metodica sono necessarie almeno 24 ore di incubazione. Sulla ricerca di tale espressione enzimatica tramite spettrometria di massa, invece, è presente un'esperienza di ricerca (Pardo et al, 2016), realizzata con coltura in brodo di ceppi di *Enterobacteriaceae* con concentrazioni scalari di norfloxacin, poi ricercate al MALDI-TOF nella forma nativa e acetilata. Gli autori avevano ottenuto risultati prossimi al 100%, confrontando i dati spettrometrici con l'analisi in biologia molecolare ed il test fenotipico validato da Wachino e collaboratori (2011). Non esistono invece studi spettrometrici effettuati con colture su terreno solido e con tempistiche ridotte (rispetto alle 18 ore necessarie per la coltura in brodo), che potrebbero rendere appetibile poi il test nella pratica clinica.

In questo contesto, nel nostro studio è stata pertanto testata la presenza di *aac(6')-Ib-cr* nei ceppi di *E. coli* provenienti da differenti campioni, e seminati con tecnica a spot in piastre di agar sangue, ricercando al contempo gli spettri corrispondenti alle forme di norfloxacin native e acetilate (metodo "indiretto") e il picco corrispondente all'enzima *aac(6')-Ib-cr* (metodo "diretto").

# MATERIALI E METODI

## 2.1 Disegno dello studio e criteri di inclusione

Il presente studio è stato condotto dopo adeguato periodo di training per l'utilizzo del software di ricerca Saramis™ (Biomerieux) associato alla strumentazione Vitek-MS (Biomerieux), le cui caratteristiche saranno descritte a breve.

Da aprile a luglio 2017, sono stati inclusi nello studio isolati batterici di *Escherichia coli* selezionati nel corso della diagnostica microbiologica di routine effettuata presso il Servizio di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera di Padova, Dipartimento di Medicina Molecolare, Università di Padova.

Criteri di inclusione nello studio sono stati i seguenti:

- Ceppi provenienti da campioni di urocoltura, coltura da materiale respiratorio ed emocoltura
- Identificazione di specie positiva per *Escherichia coli*
- Presenza di fenotipi di resistenza variabili (toti-sensibili, multi resistenti)
- Antibiogramma eseguito secondo il metodo MIC in brodo diluizione

Per ogni ceppo incluso nello studio sono stati valutati e registrati i seguenti parametri: il profilo di identificazione eseguito secondo routine, lo spettro di sensibilità agli antimicrobici eseguito secondo brodo-diluizione, i dati anagrafici dei pazienti, i dati rilevati con il test da validare.

Tutti i ceppi utilizzati nel presente studio sono stati isolati nel corso della tradizionale diagnostica di routine: per tale motivo non è stato necessario procedere alla raccolta di un consenso informato da parte dei pazienti né all'approvazione del comitato etico. I dati sono stati trattati secondo la normativa vigente sulla privacy.

## 2.2 Metodica di preparazione dei campioni

Una volta selezionati ed inclusi nello studio, i ceppi sono stati riseminati secondo la tecnica descritta nel paragrafo 2.4 del Progetto di Ricerca 1 (pag. 39). In particolare, i ceppi selezionati sono stati seminati "a spot" (figura 9) in piastra di agar sangue, con



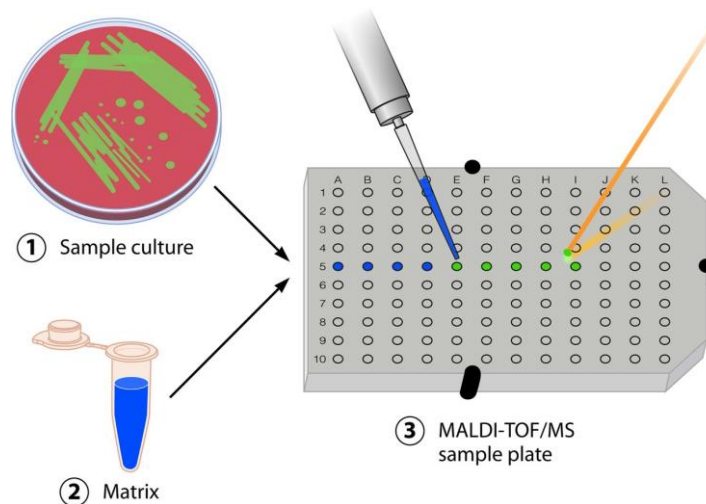
apposizione su patina di un disco di carta bibula contenente 10 mcg di norfloxacina. Le piastre sono state incubate per 5 ore a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1$  e poi valutate per la presenza o meno di un alone di inibizione nella patina di crescita batterica intorno al disco di antibiotico.

Da tali piastre, è stato dunque prelevato il materiale per l'analisi spettrometrica, estraendolo dalle seguenti aree:

- L'area sotto il disco di norfloxacina, per l'eventuale rilevazione di norfloxacina acetilata (AcetilNorf)
- La patina intorno al disco o all'eventuale alone di sensibilità, per l'eventuale rilevazione di norfloxacina acetilata (AcetilNorf) e dell'enzima *aac(6')-Ib-cr*.

Il campione prelevato è stato poi depositato su uno dei pozzetti della piastrina target, predisposta per l'inserimento nel Vitek-MS (figura 27). Tale piastrina è monouso, di policarbonato inerte, e contiene 48 pozzetti suddivisi in tre quadranti, con la possibilità di apporre su un pozzetto centrale il campione di controllo. Ad ogni colonia posta sul pozzetto è stato aggiunto 1  $\mu\text{l}$  di matrice di acido alfa-ciano-4-idrossicinnamico, lasciato poi asciugare per qualche minuto allo scopo di far evaporare il solvente. Una volta che il materiale depositato è stato lasciato asciugare, le piastre sono state considerate pronte per essere inserite all'interno della strumentazione e per l'avviamento del processo di analisi previa chiusura delle valvole e predisposizione del vuoto.

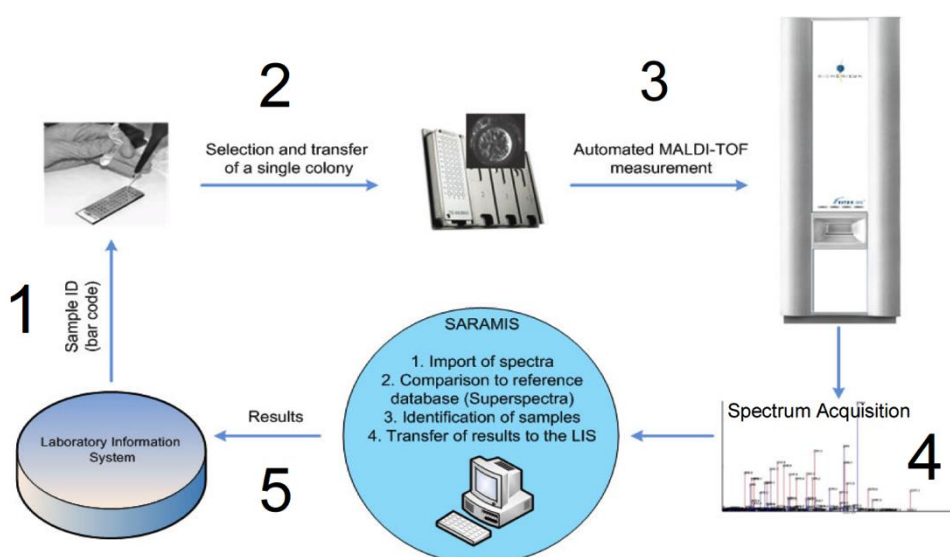
Figura 27 - Preparazione della piastra di lavoro per l'analisi del campione al MALDI-TOF (tratta da Biomerieux, 2012)



### 2.3 Metodica di utilizzo di VitekMS con software Saramis™

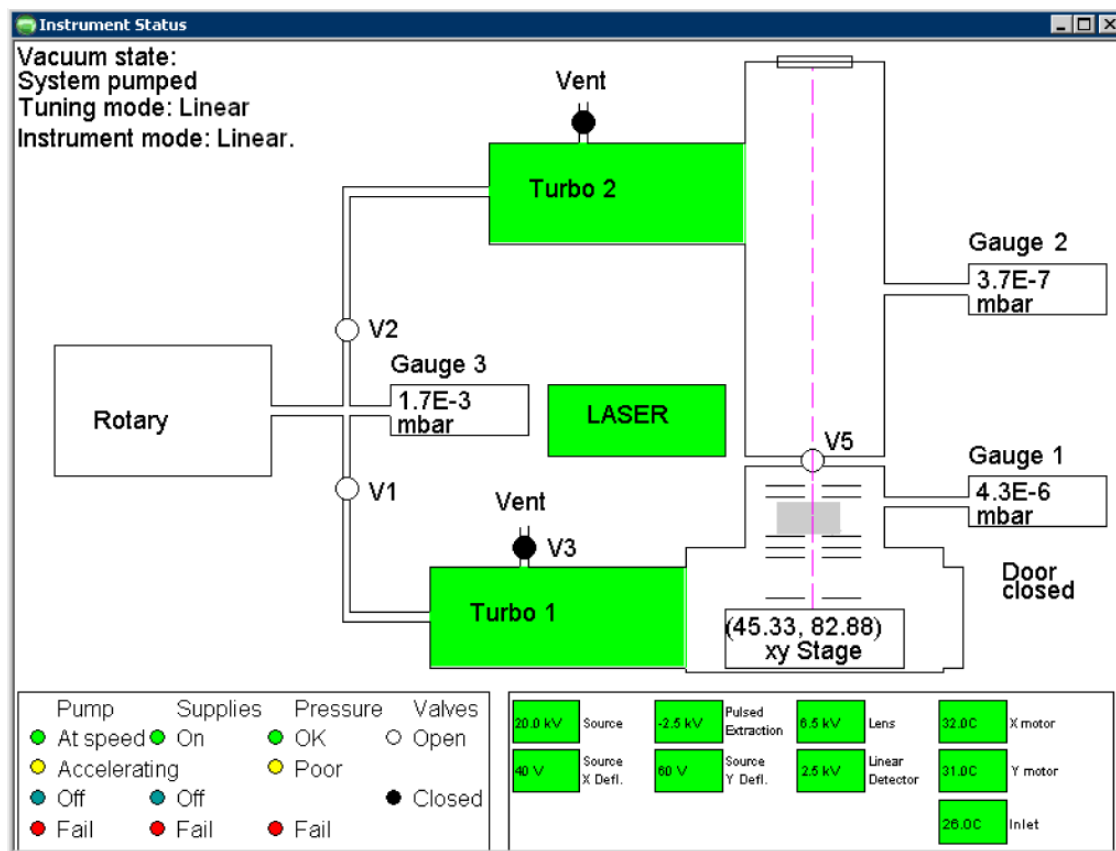
Il presente studio è stato condotto con l'ausilio del software di ricerca Saramis™ associato alla strumentazione Vitek-MS® (Biomerieux). Tale stazione computerizzata permette di analizzare tramite spettrometria di massa i ceppi preparati, esportando i singoli spettri per una valutazione scorporata, personalizzata e non automatizzata delle molecole rilevate (figura 28).

Figura 28 – Procedimento del flusso di lavoro con MALDI MS Plus® e Software Saramis™ (tratta da Biomerieux, 2012)



Il sistema Launchpad® e il pannello di controllo presenti nel programma del software permettono inoltre di poter guidare manualmente la strumentazione in tutti i suoi processi. In particolare, tali manovre partono dal controllo diretto dell'apertura e chiusura delle valvole per la predisposizione del vuoto, che può essere monitorato continuamente secondo un'apposita schermata che riassume schematicamente le componenti maggiori dello strumento e lo status presente (figura 29).

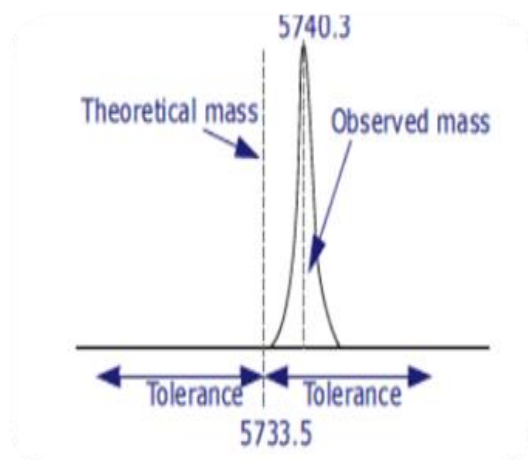
Figura 29 – Schermata di controllo dello stato della strumentazione e delle eventuali problematiche dei componenti in corso (Instrument Status)



Dopo predisposizione del progetto di lavoro e registrazione nel software di interfaccia, dunque, ogni piastrina è stata preparata con la deposizione di campione secondo la metodica sopra descritta ed inserita nella strumentazione per l'avvio dell'analisi "manuale".

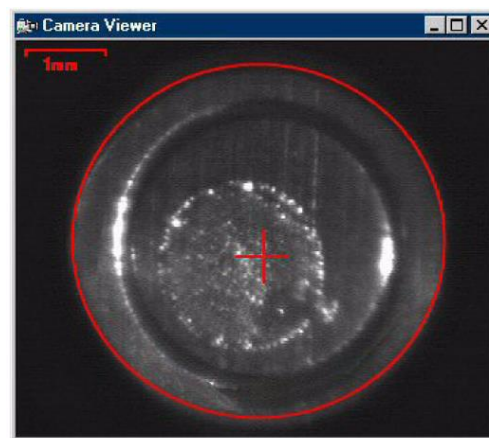
Prima dell'inizio di ogni esperimento, è stata necessaria, come da protocollo operativo, la calibrazione manuale della strumentazione, che consiste in estrema sintesi nell'impostazione del range di analisi degli spettri, la "centratura" del laser nella posizione corretta dei pozzetti, l'aggiustamento della potenza del laser e la validazione della tolleranza concessa (0.07%) valutata tramite il confronto del campione di controllo con un ceppo noto di *E. coli* (figura 30).

Figura 30 – Esempio di impostazione teorica per la calibrazione del ceppo di *E. coli* di controllo.



Dopo verifica della calibrazione ed il raggiungimento della corretta pressione all'interno dell'analizzatore, il laser ionizzante inizia ad agire scorrendo sui singoli pozzetti, ed è possibile seguire ed eventualmente guidare il suo percorso attraverso una telecamera che si sposta lungo i vari pozzetti (figura 31).

Figura 31 – Visione del pozzetto analizzato tramite telecamera per eventuale guida della direzione del laser (Axima Assurance, 2007)



Le immagini sono visibili nella stazione di acquisizione. Per ogni pozzetto analizzato si genera uno spettro peculiare di ogni microrganismo in esame, visualizzabile in tempo reale. Lo strumento è in grado di analizzare circa un pozzetto al minuto. Sono stati acquisiti con questo metodo spettri da 0 a 25.000 Da, secondo impostazione manuale, appaiati automaticamente al dato quantitativo di ogni picco. Ogni spettro elaborato dal sistema è stato infine registrato e reso a disposizione per l'analisi del ceppo.

## 2.4 Analisi dei picchi e confronto con le MIC per ciprofloxacina e gentamicina

Come già esplicitato nei paragrafi precedenti, una volta completata l'acquisizione degli spettri, ogni ceppo è stato valutato secondo l'espressione dei picchi relativi alle forme di norfloxacina e l'espressione di *aac(6')-Ib-cr*. In particolare, l'acetilazione della norfloxacina attraverso l'azione dell'amino-acetiltransferasi ne aumenta il peso molecolare di 64 Da, rendendola individuabile al MALDI-TOF avendo noto quello della forma nativa (Robicsek et al, 2006; Hrabak, 2015).

Sono stati dunque registrati ai fini della ricerca i picchi relativi a:

- le forme native di norfloxacina
  - [Norf+H]<sup>+</sup>: 320 Da
  - [Norf+Na]<sup>+</sup>: 342 Da
- le forme acetilate di norfloxacina
  - [AcetilNorf+H]<sup>+</sup>: 362 Da
  - [AcetilNorf+Na]<sup>+</sup>: 384 Da
- il picco corrispondente all'enzima *aac(6')-Ib-cr*: 16.574 Da.

Essi sono stati registrati in termini di presenza/assenza, tenendo conto della tolleranza stabilita, pari allo 0.07%, come da indicazioni della ditta produttrice (Biomerieux).

La presenza o meno di questi picchi noti è stata confrontata con la presenza o meno di un fenotipo di resistenza per ciprofloxacina e gentamicina, secondo i valori di MIC refertati con il metodo standard. Grazie a tale confronto, è stata calcolata l'accuratezza del metodo secondo i parametri di sensibilità, specificità e concordanza.

La concordanza tra i due test è stata effettuata con il test K di Cohen (*Graphpad Scientific Software, QuickCalcs*) secondo i criteri di interpretazione già mostrati in *tabella 4 (p.47)*.

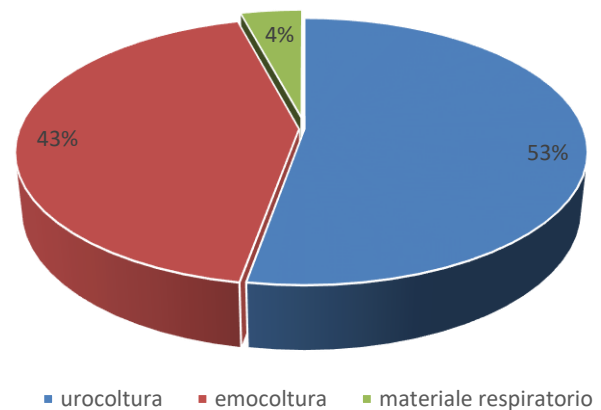
L'analisi statistica è stata infine condotta tramite il calcolo dei parametri descritti nel paragrafo 2.6 del Progetto di ricerca 1 (pag 44).

# RISULTATI

## 3.1 Caratteristiche dei ceppi analizzati

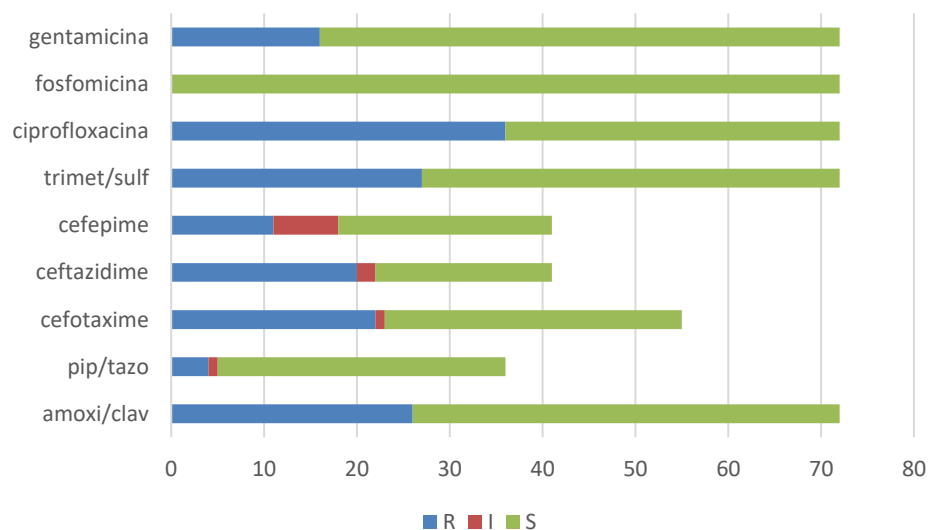
Per lo studio in esame sono stati inclusi 72 ceppi di *E. coli*, provenienti da urocoltura, emocoltura e materiale respiratorio secondo la distribuzione descritta in *figura 32*.

*Figura 32 - Provenienza dei ceppi inclusi nello studio*



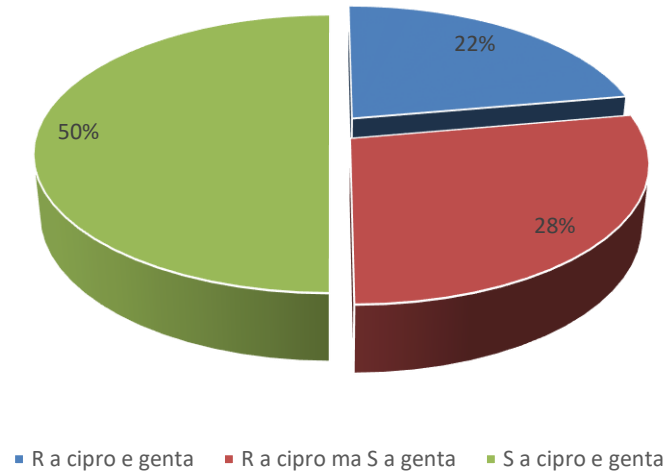
I profili di sensibilità espressi dai ceppi sono stati variabili e sono rappresentati nel grafico sottostante (*figura 33*). In particolare, abbiamo incluso nello studio 36 ceppi sensibili alla ciprofloxacina e 36 ceppi resistenti (50%), mentre solo 16 ceppi ( 22%) mostravano un profilo fenotipico resistente a gentamicina

*Figura 33 - Profili di sensibilità dei ceppi inclusi nello studio*



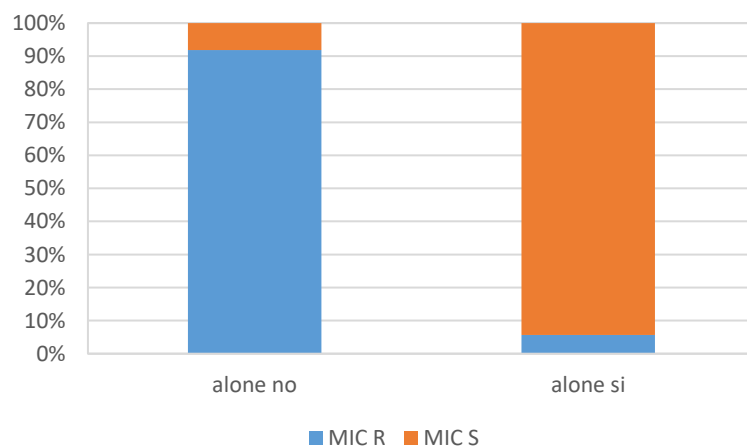
In particolare, la distribuzione delle MIC per chinoloni e aminoglicosidi è stata rappresentata dalle seguenti percentuali (*figura 34*).

*Figura 34 - Profili di sensibilità dei ceppi per ciprofloxacina e gentamicina*



Infine, la concordanza osservata tra MIC per ciprofloxacina e presenza dell'alone di inibizione sulla patina intorno al dischetto di norfloxacina è rappresentata nella *figura 4*. In questo caso, la concordanza tra le due osservazioni è risultata, secondo il test K di Cohen, come "molto buona", avendo rilevazioni corrette nel 93.06% dei casi e un indice K di 0.861 (0.744-0.979).

*Figura 35 - Concordanza osservata tra MIC per ciprofloxacina e presenza dell'alone di inibizione sulla patina intorno al dischetto di norfloxacina*



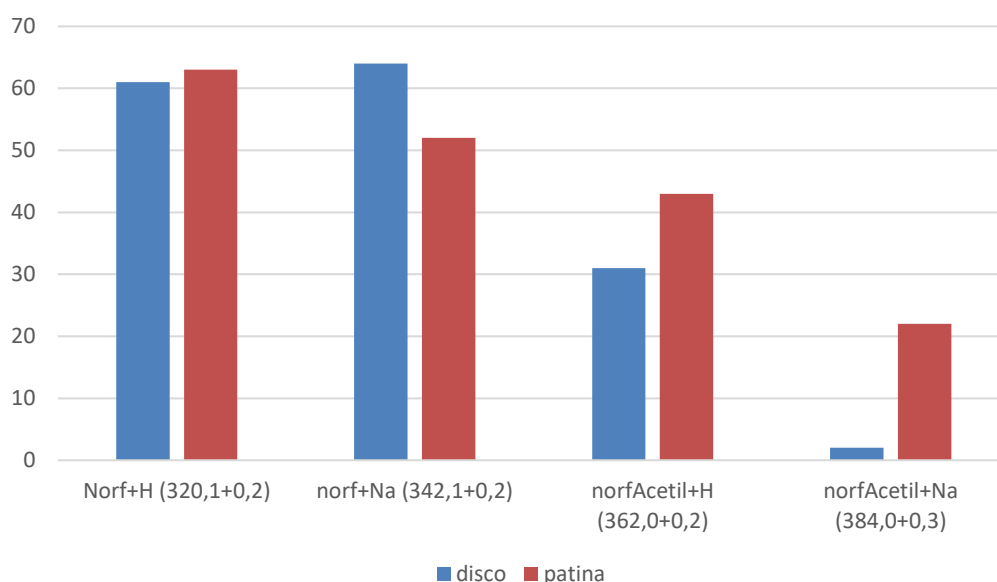
### 3.2 Analisi tramite metodo "indiretto"

Per quanto riguarda la determinazione del metodo indiretto, innanzitutto è stata valutata la presenza dei picchi di norfloxacina disciolta in acqua distillata, con rilevazione di un picco di 320.4 Da, corrispondente a Norfloxacina nativa coniugata con H (Norf+H), ed un piccolo picco di 383.9 Da, corrispondente alla Norfloxacina acetilata coniugata con Na (AcetilNorf+Na).

E' stato poi testato un campione di bianco analitico con la seguente procedura. In una piastra di agar sangue sono state seminate con tecnica a spot 7 gocce di sangue sterile, ed incubate con disco di norfloxacina per 5 ore. In questo caso, sono stati rilevati sotto il disco i picchi corrispondenti a Norf+H (320.3 Da), Norf+Na (341.9 Da) e AcetilNorf+H (362.0 Da). Quest'ultimo dato invece non è stato rilevato nell'area intorno al disco impregnato di antibiotico, con evidenza solo della presenza di Norf+H (320.2 Da) e Norf+Na (341.9 Da).

Riguardo invece ai 72 ceppi analizzati, i picchi di norfloxacina rilevati sono rappresentati in *figura 36*. A tal proposito, si precisa che l'analisi dell'area sotto il disco è stata resa disponibile solo per 66/72 campioni per motivi tecnici.

*Figura 36 - Rilevazione dei picchi di Norfloxacina nei campioni analizzati*





Per quanto riguarda l'analisi dell'area sotto il disco, in solo un campione su 66 (1.5%) non è stato rilevato alcun picco di norfloxacina nativa, mentre nell'area intorno al disco questo è accaduto in 4 casi su 72, con una sensibilità pertanto del 94.4%.

La percentuale di rilevazione dei picchi di norfloxacina acetilata invece, suddivisa per profilo di sensibilità per chinoloni ed aminoglicosidi, è rappresentata nelle *Tablelle 25 e 26*.

*Tabella 25 - Percentuale di rilevazione dei picchi di Norfloxacina acetilata nell'area sotto il disco dei campioni analizzati, suddivisi per profilo di sensibilità per ciprofloxacina e gentamicina*

	AcetilNorf+H (362,0 $\pm$ 0,2)	AcetilNorf+Na (384,0 $\pm$ 0,3)	Almeno un picco di AcetilNorf
Cipro R	37,5	3,1	40,6
Cipro S	53	2,9	55,9
Genta R	14,3	0	14,2
Genta S	55,8	3,8	57,7
Cipro e genta R	12,5	0	12,5
Cipro R – genta S	50	5	55
Cipro e genta S	50	2,8	52,8

*Tabella 26 - Percentuale di rilevazione dei picchi di Norfloxacina acetilata nell'area attorno al disco dei campioni analizzati, suddivisi per profilo di sensibilità per ciprofloxacina e gentamicina*

	AcetilNorf+H (362,0 $\pm$ 0,2)	AcetilNorf+Na (384,0 $\pm$ 0,3)	Almeno un picco di AcetilNorf
Cipro R	45,7	22,9	57,1
Cipro S	75,7	37,8	78,4
Genta R	37,5	25	50
Genta S	66	32,1	73,2
Cipro e genta R	37,5	25	56,25
Cipro R - genta S	45	20	60
Cipro e genta S	77,8	38,9	80,6

Come si può notare dai dati presentati, il confronto con i risultati delle MIC ha evidenziato una debolissima corrispondenza tra la presenza di norfloxacina acetilata e profilo fenotipico resistente ai fluorochinoloni ed eventualmente aminoglicosidi. Infatti, le osservazioni concordanti sono state inferiori a quanto atteso per casualità (43.9% per l'area sotto il disco e 37.5% per l'area intorno al disco), con valori di K rispettivamente di 0.123 e 0.250.

Come intuibile, anche i parametri di analisi statistica del metodo hanno dato risultati non soddisfacenti, come evidente nelle *tabelle 27 e 28*, con valori di sensibilità e specificità ben al di sotto dei limiti di accettabilità.

*Tabella 27 - Parametri di valutazione statistica dei valori ottenuti dall'analisi dei ceppi sotto il disco di antibiotico*

		Intervallo di confidenza al 95%
Sensibilità (%)	40.6	25.5-57.7
Specificità (%)	47.0	31.4-63.2
Likelihood Ratio +	0.7	0.4-1.3
Likelihood Ratio -	1.2	0.8-1.9
Valore predittivo pos	41.9	26.4-59.2
Valore predittivo neg	45.7	30.4-61.8

*Tabella 28 - Parametri di valutazione statistica dei valori ottenuti dall'analisi dei ceppi intorno al disco di antibiotico*

		Intervallo di confidenza al 95%
Sensibilità (%)	55.5	39.5-70.4
Specificità (%)	19.4	9.7-35.0
Likelihood Ratio +	0.6	0.4-0.9
Likelihood Ratio -	2.2	1.0-4.8
Valore predittivo pos	40.8	28.2-54.7
Valore predittivo neg	30.4	15.6-50.8

### **3.3 Analisi tramite metodo “diretto”**

Per la rilevazione con il metodo diretto, è stata trovata una sola positività (1,3%) tra i batteri resistenti ai chinoloni in corrispondenza del picco atteso per *aac(6')-Ib-cr* (16587 Da). Nessuna corrispondenza con il picco atteso per *aac(6')-Ib-cr* è stata invece osservata nei ceppi sensibili ai chinoloni.

Come intuibile, all'analisi statistica la concordanza rilevata tra fenotipo di resistenza per fluorchinoloni e presenza del picco correlato all'espressione enzimatica è risultata minima, avendo osservato 37 osservazioni concordanti (51.39%), ossia tanto quanto atteso per casualità (50%). L'indice kappa è risultato essere 0.028 (0.026-0.082).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La determinazione rapida delle resistenze tramite spettrometria di massa ha dato, in studi preliminari, risultati promettenti. Sulla determinazione di *aac(6′)-Ib-cr*, però, attualmente è presente solo un’esperienza di ricerca (Pardo et al, 2016), realizzata con coltura in brodo di ceppi di *Enterobacteriaceae* con concentrazioni scalari di norfloxacin, poi ricercate al MALDI-TOF nella forma nativa e acetilata. Apparentemente tale studio aveva portato dati estremamente soddisfacenti, lasciando presagire la possibilità di poter utilizzare tale metodo a supporto della diagnostica microbiologica.

Date le tempistiche lunghe della coltura in brodo e la conseguente scarsa utilità nella pratica clinica, nel nostro studio è stato scelto di testare un metodo più rapido ed eventualmente accessibile alla routine di laboratorio. La semina rapida “a spot” è apparsa particolarmente appropriata, essendo stata indicata anche dall’Associazione Microbiologi Clinici Italiani (Sarti et al, 2014) come metodica valida per l’identificazione rapida di specie da emocoltura tramite MALDI-TOF. Tale tecnica porta infatti all’isolamento di una patina di crescita batterica in 5 ore dalla semina, permettendo di poter lavorare in tempi brevi con le colonie microbiche, proprio come richiesto dalla spettrometria di massa.

Purtroppo, l’analisi presentata non ha riportato risultati soddisfacenti sulla rilevazione né dei picchi di norfloxacin acetilata né dell’enzima *aac(6′)-Ib-cr*.

In primo luogo, nel metodo diretto solo in un caso è stato rilevato un picco compatibile con l’espressione enzimatica, lasciando supporre che la tempistica di incubazione e la metodica utilizzata non siano congruenti con tale valutazione.

In secondo luogo, con il metodo indiretto sono stati ottenuti risultati di bassa concordanza con i valori di MIC per ciprofloxacina, bassa sensibilità e ancor più bassa specificità, sia per l’analisi del terreno sotto il disco di antibiotico che delle colonie attorno allo stesso. Ipotizziamo che, in questo caso, l’interazione con la matrice (molto vicina alla norfloxacin in termini di peso molecolare), la presenza

di acetilazione spontanea e/o incompleta o la coniugazione con il terreno di crescita possano aver influenzato i risultati. Tali ipotesi possono essere confermate dalla valutazione eseguita sia con norfloxacin in acqua sterile che seminando sangue sterile con tecnica a spot ed apponendo il disco di norfloxacin per incubazione. In entrambi i casi, infatti, è emerso il riscontro confondente di un piccolo picco di Norfloxacin acetilata pur in assenza di ceppi batterici, probabilmente a causa di una acetilazione spontanea. Tale osservazione appare essere la spiegazione più plausibile dell'insufficienza dei risultati ottenuti sui 72 campioni analizzati.

Sicuramente, in entrambe le determinazioni (diretta ed indiretta), il fattore "tempo" potrebbe aver giocato un ruolo chiave nell'impedire ai ceppi di esprimere l'enzima. In tal caso, però, metodiche con tempi di processazione più lunghi risulterebbero inutili ai fini dell'uso del MALDI-TOF nell'ottimizzazione della terapia di prima linea. La metodica, in tal caso più indagativa e lunga, potrebbe risultare inadatta per una diagnostica di routine di laboratorio, ove la determinazione delle MIC già fornisce dati precisi e affidabili nelle stesse tempistiche.

In conclusione, l'analisi tramite spettrometria di massa della resistenza plasmidica ai chinoloni tramite rilevazione dell'enzima mutato *aac(6')-Ib-cr* non si è rivelata una metodica affidabile e sensibile se associata alla preparazione rapida del campione su terreno di coltura solido. Tale metodica infatti non ha dimostrato alcuna applicabilità nella pratica clinica. Ulteriori valutazioni potranno essere proseguite, tenendo sempre conto della necessità di garantire un risultato rapido e preciso allo stesso tempo, che possa guidare la scelta del clinico ad una terapia mirata ed ottimale.

# BIBLIOGRAFIA

Ambler, R.P. (1980) 'The structure of beta-lactamases' *Biol Sc* 289 (1036) pp. 321–31

Axima Assurance (2007) 'Getting started guide using Launchpad 2.8 software' *Shimadzu Biotech*

Bado, I., Gutiérrez, C., García-Fulgueiras, V., Cordeiro, N.F., Araújo Pirez, L., Seija, V., Bazet, C., Rieppi, G., Vignoli, R. (2016) 'CTX-M-15 in combination with aac(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay'. *J Glob Antimicrob Resist* 6 pp. 5-9

BioMérieux®SA (2010) 'BacT/ALERT® 3D - User Manual' [Online] (Disponibile su: [http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/automated\\_analyzer/user\\_manuals/Biomerieux%20Bact-Alert%203D%20-%20User%20Manual.pdf](http://www.frankshospitalworkshop.com/equipment/documents/automated_analyzer/user_manuals/Biomerieux%20Bact-Alert%203D%20-%20User%20Manual.pdf) Ultimo accesso 20/07/2017)

BioMérieux®SA (2012) 'Vitek MS Plus – User Manual' Version A

Bloos, F., Hinder, F., Becker, K. Sachse, S., Mekontso Dessap, A., Straube, E. Cattoir, V., Brun-Buisson, C., Reinhart, K., Peters, G., Bauer, M. (2009) 'A multicenter trial to compare blood culture with polymerase chain reaction in severe human sepsis'. *Intensive Care Med* 36, 2 pp. 241–247

Boot, R. (2012) 'Frequent major errors in antimicrobial susceptibility testing of bacterial strains distributed under the Deutsches Krebsforschungs zentrum Quality Assurance Program' *Laboratory Animals* 46 pp. 253–257

Bottarelli, E. (2017) 'Quaderni di epidemiologia - Capitolo 11' [Online] Disponibile su [http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/screen/ind\\_con.htm](http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/screen/ind_con.htm) (Ultimo accesso 6 Agosto 2017)

Bouza, E., Sousa D., Munoz, P., Rodriguez-Creixems, M., Fron, C., Lechuz, J.G. (2004) 'Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results' *Clin Infect Dis* 39, 8 pp. 1161-9

Brunelli, T., Degl'Innocenti, R., Conti, A., Casprini, P. (2010) 'Use of MALDI-ToF Mass spectrometry in direct microorganism identification in clinical laboratories' *Micr. Medica* 25, 3 pp. 151-153

Bullman, S., Lucey, B., Sleator, R.D. (2012) 'Molecular diagnostics: the changing culture of medical microbiology' *Bioengineered* 3, 1 pp. 1-7

Bush, K. and Jacoby, G.A. (2010) 'Updated functional classification of B-Lactamases' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54, 3 pp. 969-976

Centers do Disease Control and Prevention (CDC) (2016) 'Laboratory Methods for the diagnosis of Meningitis' [Online] Disponibile su <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt11-antimicrobial-suscept-testing.html> (Ultimo accesso 03/09/2017)

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) 'Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement' *CLSI document M100-S18 Vol.2 No.1*

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2009) 'Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Eight Edition' *CLSI document M07-A8 Vol.29 No.2*

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2017) 'Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27<sup>th</sup> Edition' [Online] Disponibile su <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/> (non acquistato)

Cockerill, F.R., Wilson, J.W., Vetter, E.A., Goodman, K.M., Torgerson, C.A., Harmsen, W.S., Schleck, C.D., Ilstrup, D.M., Washington, J.A. 2<sup>nd</sup>, Wilson, W.R. (2004) 'Optimal testing parameters for blood cultures' *Clin Infect Dis* 38 pp. 1724-1730.

Conti A. and De Rosa R. (2008) 'Quality assurance della emocoltura' *Rimel/IJLaM* 4, 3-S1

Courvalin, P. (2008) 'Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance' *JIntern Med* 264, 1 pp. 4-16

Cohen, J. (1960) 'A coefficient of agreement for nominal scales' *Educ. Psychol. Meas.* 20 pp. 37-46

De Backer, D., Dorman, T. (2017) 'Surviving Sepsis Guidelines. A Continuous Move towards Better Care of Patients With Sepsis' *JAMA* 317, 8 pp. 807-808

De Canale, E., Sciro, M. (2014) 'Istruzione operativa, metodo interno: emocolture' – Manuale ad uso interno Azienda Ospedaliera di Padova

De Carolis, E., Vella, A., Vaccaro, L., Torelli, R., Spanu, T., Fiori, B., Postenarom B.R., Sanguinetti, M. (2014) 'Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology' *J Infect Dev Ctries*, 9 pp. 1081-1088

Dellit, T.H., Owens, R.C., McGowan, J.E., Gerding, D.N., Weinstein, J.P., Huskins, W.C., Paterson, D.L., Fishman, N.O., Carpenter, C.F., Brennan, P.J., Billeter, M. and Hooton, T.M. (2007) 'Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America Guidelines for Developing an Institutional Program to Enhance Antimicrobial Stewardship' *CID* 44 pp. 159-77

Demirev, P., Sandrin, T.R. (2016) 'Application of Mass Spectrometry in Microbiology. Drom Strain Characterization to Rapid Screening for Antibiotic Resistance'. *Springer Ed.*

Domokos, J., Kristóf, K., Szabó, D. (2016) 'Plasmid-mediated quinolone resistance among extended spectrum beta lactase producing Enterobacteriaceae from bloodstream infections' *Acta Microbiol Immunol Hung.* 63, 3 pp. 313-323

Donati, V., Feltrin, F., Hendriksen, R.S., Svendsen, C.A., Cordaro, G., Garcia-Fernandez, A., Lorenzetti, S., Lorenzetti, R., Battisti, A., Franco, A. (2014) 'Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in Klebsiella spp. from Companion Animals in Italy' *PLOS ONE* 9; 3

European Medicine Agency (EMA) and European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2009) 'The bacterial challenge: time to react' [Online] Disponibile su: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909 TER The Bacterial Challenge Time to React.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf) (ultimo accesso 20/07/2017)

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)(2016) 'Data from the ECDC Surveillance Atlas - Antimicrobial resistance' [Online] Disponibile su: <https://ecdc.europa.eu/en/antimicrobial-resistance/surveillance-and-disease-data/data-ecdc> (Ultimo accesso 20/07/2017)

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)(2016) 'Proposals for EU guidelines on the prudent use of antimicrobials in humans' [Online] Disponibile su: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/proposals-eu-guidelines-prudent-use-antimicrobials-humans> (Ultimo accesso 20/07/2017)

Favrot, L., Blanchard, J.S., Vergnolle, O. (2016) 'Bacterial GCN5-Related N-Acetyltransferases: From Resistance to Regulation' *Biochemistry* 55, 7 pp. 989-1002

Frasson, I., Cavallaro, A., Bergo, C., Richter, S.N., Palù, G. (2011) 'Prevalence of aac(6)-Ib-cr plasmid-mediated and chromosome-encoded fluoroquinolone resistance in Enterobacteriaceae in Italy' *Gut Pathog.* 3:12.

Fedeli, U., Piccinni, P., Schievano, E., Saugo, M, Pellizzer, G. (2016) 'Growing burden of sepsis-related mortality in northeastern Italy: a multiple causes of death analysis' *BMC Infectious Diseases* 13, 16 p. 330

Ferrer, R., Martin-Loeches, I., Phillips, G., Osborn, T.M., Townsend, S., Dellinger, R.P., Artigas, A., Levy M.M. (2014) 'Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline based performance improvement program' *Crit Care Med* 42, 8 pp.1749-1755

Finch, R. and Hunte, P.A. (2006) 'Antibiotic resistance - action to promote new technologies. Report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12–13 December 2005' *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, S1 pp. 3-22

Fournier, P.E., Drancourt, M., Colson, P., Rolain, J.M., La Scola, B., Raoult, D. (2013) 'Modern clinical microbiology: new challenges and solutions' *Nature Reviews Microbiology* 11 pp.574-585

Giavarina, D., Pistolato, G., Dorizzi, R.M. (2007) 'A simple and effective Bayesian calculator for daily practice of laboratory medicine' *RIMeL - IJLaM* 3 pp. 94–98

Guan, XZ; Xue, XY; Liu, YX; Wang, J; Wang, Y; Wang, JX; Wang, KF; Jiang, H; Zhang, LN; Yang, B; Wang, N; Pan, L. (2013) 'Plasmid-mediated quinolone resistance - current knowledge and future perspectives.' *Journal of International Medical Research* , 41, 1, p. 20-30

Guillard, T., De Champs, C.; Cambau, E.; Chau, F.; Fantin, B.; Massias, L. (2013) 'Ciprofloxacin Treatment Failure in a Murine Model of Pyelonephritis Due to an AAC(6')-Ib-cr-Producing Escherichia coli Strain Susceptible to Ciprofloxacin *In Vitro*' *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57 (12) pp. 5830-5835

Guillard, T.; De Champs, C.; Bajolet, O.; Bertrand, X.; Cholley, P.; Gbaguidi-Haore, H. (2014) 'AAC(6')-Ib-cr is the major plasmid-mediated quinolone resistance determinant in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in eastern France' *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2, 2 pp. 111-113

Hall, H. and Barlow, M. (2005) 'Revised Ambler classification of  $\beta$ -lactamases' *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55, 6 pp. 1050–1051

Hart, P.J., Wey, E., McHigh, T.D., Balakrishnan, I., Belgacem, O. (2015) 'A method for the detection of antibiotic resistance markers in clinical strains of Escherichia coli using MALDI mass spectrometry' *Journal of Microbiological Methods* 111 pp. 1–8

Hillenkamp, F., Katalinic J. P. (2007) 'MALDI MS. A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Application' *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim. [Online] Disponibile su [https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527333312\\_c01.pdf](https://application.wiley-vch.de/books/sample/3527333312_c01.pdf) (Ultimo accesso 30/08/2017)

Hrabák, J., Chudáčková, E., Walková, R. (2013) 'Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry for Detection of Antibiotic Resistance Mechanisms: from Research to Routine Diagnosis' *Clinical Microbiology Reviews* 26, 1 p. 103–114

Idelevich, E.A., Schule, I., Grunastel, B., Wullenweber, J., Peters, G., Becker, K. (2014) 'Acceleration of antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by inoculation of Vitek 2 card with briefly incubated solid medium cultures' *Journal of Clinical Microbiology* 52, 11 pp. 4058-4062

Izadpanah, M., Khalili, H. (2015) 'Antibiotic regimens for treatment of infections due to multidrug-resistant Gram-negative pathogens: An evidence-based literature review' *J Res Pharm Pract* 4 pp.105 – 14



- Jacoby, G. (2005) 'Mechanisms of resistance to quinolones' *Clin Infect Dis* 41, 2 S120-126
- Jenkins, S.G., Schuetz, A.N. (2012) 'Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy' *Mayo Clin Proc* 87, 3 pp. 290-308
- Jiang, X.B., Li, J., Zhang, Y.S., Yan, H., Wang, Y.X., Shi, L., Zhou, L.J. (2014) 'Detection of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and qnrS expression in Enterobacteriaceae clinical isolates' *Journal Of Infection In Developing Countries* 8, 12; p. 1625-p1629
- Jorgensen, J.H. (1993) 'Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system' *J. Clin. Microbiol.* 31 pp. 2841-2844
- Jung, J. S., Eberl T., Sparbier, K., Lange, C., Kostrzewa, M., Schubert S., Wieser A. (2014) 'Rapid detection of antibiotic resistance based on mass spectrometry and stable isotopes' *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 33 pp. 949–955
- Kostrzewa, M., Sparbier. K., Maier, T. and Schubert, S. (2013) 'MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms' *Proteomics Clin.* 7, 767–778
- Kraker, M.E.A., Stewardson, A.J., Harbart, S. (2016) 'Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050?' *PLoS Med* 13, 11: e1002184
- Kroumova, V., Gobbato, E., Macaluso, P., Tamburelli, S., Marini, F. Perone, M., Orlandi, S., Viviani, M., Fortina, G. (2010) 'Preliminary indications for antibiotic susceptibility tests in less than six hour in positive blood cultures' *Microbiologia Medica* 25 pp. 238-243
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K.E., Light, B., Parrillo, J.E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., Kumar, A., Cheang, M. (2009) 'Duration of hypotension before initiation effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock' *Crit Care Med* 34 pp. 1589-96
- Lamoth F., Jaton K., Prod'hom G., Senn L., Bille J., Calandra T., Marchetti O. (2010) 'Multiplex blood PCR in combination with blood cultures for improvement of microbiological documentation of infection in febrile neutropenia'. *J. Clin. Microbiol* 48 pp. 3510-3516.
- Leclercq, R., Canto, R., Brown, D.F., Giske, C.G., Heisig, P., MacGowan, A.P., Mouton, J.Q., Nordmann, P., Rodloff, A.C., Rossolini, G.M., Soussy, C.J., Steinbakk, M., Winstanley, T.G., Kahlmeter, G. (2013) 'EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing'. *Clin Microbiol Infect* 19 pp. 14-160.

Livermore, D.M., Mushtag, S., Nguyen, T., Warner, M. (2011) 'Strategies to overcome extended-spectrum B-lactamases (ESBLs) and AmpC B-lactamases in Shigellae' *Int J Antimicrob Agents* 37, 5 pp. 405-409

Lucignano, B., Ranno, S., Liensenfeld, O., Pizzorno, B., Putignani, L., Bernaschi P., Menichella D. (2011) 'Multiplex PCR allows rapid and accurate diagnosis of bloodstream infections in newborns and children with suspected sepsis'. *J. Clin. Microbiol.* 49, 6 pp.2252-8

Machuca, J., Ortiz, M., Recacha, E., Díaz-De-Alba, P., Docobo-Perez, F., Rodríguez-Martínez, J.M., Pascual, Á. (2016) 'Impact of AAC(6)-Ib-cr in combination with chromosomal-mediated mechanisms on clinical quinolone resistance in Escherichia coli.' *J Antimicrob Chemother.* 71, 11 pp. 3066-3071

Magiorakos, A.P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L. (2012) 'Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance'. *Clin Microbiol Infect* 18, 3 pp. 268-281

Mancini, N., Clerici, D., Diotti, R., Perotti, M., Ghidoli, N., De Marco, D., Pizzorno, B., Emrich, T., Burioni, R., Ciceri, F., Clementi, M. (2008) 'Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies' *J Med Microbiol* 57, 5 pp. 601-604

Masia, S. (2017) 'La sepsi: sviluppo e validazione di un percorso diagnostico delle emocolture per una rapida identificazione di specie e valutazione della MIC' Tesi di laurea, Corso di laurea magistrale in Biotecnologie Farmaceutiche.

Maysent, S., Screen, J., Scopes, E., Saegeman, V., Merckx, R., Roberts, P., Owen, V. (2017) 'Evaluation of Thermo Scientific™ Sensititre™ system for MIC determination of cephalosporins with EUCAST breakpoints for Enterobacteriaceae, Acinetobacter and Pseudomonas' [Online] (Ultimo accesso 2/9/2017) Disponibile su <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/Evaluation-Evaluation-of-Sensititre-for%20MIC-Gram-negative-organisms-LT2329A-EN.pdf>

Meletis, G. (2016) 'Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives' *Therapeutic Advances in Infectious Disease* 3, 1 pp. 15-21

Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T. (2009) 'The real threat of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing bacteria' *Lancet Infect Dis.* 9, 4 pp. 228-36

O'Neill, J. (2014) 'Review on Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations'. *London: Review on Antimicrobial Resistance.* [Online] (Ultimo accesso 16/08/2017) Disponibile su: <https://amr->

[review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%2020Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations\\_1.pdf](http://www.review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%2020Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)

Oleksiuk, M., Screen, J., Scopes, E., Bursens, J. (2015) 'Evaluation Of Thermo Scientific Sensititre Susceptibility MIC Plates For The MIC Determination Of Gram Negative Isolates For Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulanic Acid, Cefotaxime, Meropenem and Piperacillin-Tazobactam' [Online] Disponibile su: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/Evaluation-Sensititre-Susceptibility-MIC-Plates-Gram-Negative-Amoxicillin-Clavulanic%20Acid-LT2172-EN.pdf> (Ultimo accesso 20/07/2017)

Opota O., Jatton K., Greub, G. (2015) 'Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood'. *Clin Microbiol Infect* 21 pp. 323-31

Pagano, M., Gauvreau, K. (2003) 'Biostatistica' Ed. *Idelson-Gnocchi*

Pardo, C.A., Tan, R.H., Hennequin, C., Beyrouthy, R., Bonnet, R., Robin, F. (2016) 'Rapid detection of AAC(6)-Ib-cr production using a MALDI-TOF MS strategy' *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 35, 12 pp. 2047-2051

Parks, L. (2013) 'MALDI-TOF technology joins the resistance' *Bioanalysis* (2013) 5(4), 399-401

Patel, J.B., Sharp, S., Novak-Weekley, S. (2013) 'Verification of antimicrobial susceptibility testing methods: a practical approach'. *Clinical Microbiology* 35, 13 pp. 103-109

Paterson, D.L., Doi, Y. (2007) 'A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli' *Clin Infect Dis* 45 pp. 1179

Pea, F., Viale, P. (2009) 'Bench-to bedside review: appropriate antibiotic therapy in severe sepsis and septic shock – does the dose matter?' *Critical care* 13 pp. 214-227

Pfaller, M.A., Segreti, J. (2006) 'Overview of the clinical profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases' *Clin Infect Dis* 42 pp.153-163

Pinho, M.G., Klos, M., Veening, J.W. (2013) 'How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria' *Nature Reviews Microbiology* 11, 9 pp 601-14

Poltronieri, F. (2001) 'La valutazione dei metodi di analisi qualitativi utilizzando le linee guida contenute nel documento NCCLS EP12-P "User protocol for evaluation of qualitative test performance; Proposed guideline"' *Riv Med Lab - JLM* 2, 1 pp.113-117

Procop, G.W. (2007) 'Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens' *Clin. Infect. Dis.* 45, 2 pp. 99-111

Robiscsek, A., Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Macielag, M., Abbanat, D., Hye Park, C., Bush, K., Hooper D.C. (2006) 'Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase' *Nature Medicine* 12, 1 pp. 83-88

Rodney, E.R., Gauthier, T.P (2017) 'Stewards working to save antibiotics: pharmacy& the medical Laboratory' [Online] Disponibile su: <https://infectioncontrol.tips/2017/04/27/antibiotics-pharmacy-lab/> (ultimo accesso 20/07/2017)

Romero-Gomez, M.P., Gomez-Gil, R., Pano-Pardo, J.R., Mingorance, J. (2012) 'Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective' *Journal of Infection* 65 pp. 513-520

Saffert, R.T., Cunningham, S.A., Mandrekar, J., Patel, R. (2012) 'Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry' *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 73 pp. 21–26

Saini, A., Bansal, R. (2012) 'Insights on the structural characteristics of NDM-1: The journey so far' *Advances in Biological Chemistry* 2 pp. 323-334

Sammarco, M.L., Ripabelli, G., Tamburro, M. (2014) 'Epidemiologia molecolare delle malattie infettive: metodi di analisi ed interpretazione dei risultati' *Ann Ig* 26 pp. 10-45

Saravolatz, L.D., Pea, F., Viale, P. (2006) 'The antimicrobial therapy puzzle: could pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships be helpful in addressing the issue of appropriate pneumonia treatment in critically ill patients?' *Clinical Infectious Disease* 42, 12 pp.1764-1771

Sarti, M., Farina, C., Luzzaro, F., Mauri, C., Nozzi, D., Sambri, V., Cellini, A., Cosentino, M., Pedna, M.F., Pifferi, L. e Clerici, P. (2014) 'Position paper AMCLI sulla possibilità d'identificazione diretta dei microrganismi da emocoltura positiva con il dispositivo VitekMS. Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI)' [Online] Disponibile su [http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/Position\\_Paper\\_Identificazione\\_rapida-da\\_emocolture\\_con\\_Maldi-Tof.pdf](http://www.amcli.it/wp-content/uploads/2015/10/Position_Paper_Identificazione_rapida-da_emocolture_con_Maldi-Tof.pdf) (Ultimo accesso 6/08/2017)

Schultsz, C., Lan, N.P.H., van Dung, N., Visser, C., Anh, T.t.N., Bay, P.V.B., Hong, T.T.K., Brinke, P., Hendriks, W., Osinga, T., van der Waals, F., Botma, J., Hien, T.T., Farrar, J.J., van Doorn, H.R., Chau, N.V.V., de Jong, M.D. (2014) 'Network building and knowledge exchange with telemicrobiology' *Lancet Glob Health* 2, 2 e78

Screen, J., Saegeman, V., Merckx, R., Roberts, P., Owen, P. (2017) 'Evaluation of Thermo Scientific™ Sensititre™ System for MIC determination of fluoroquinolones with

EUCAST breakpoints for Enterobacteriaceae, Acinetobacter and Pseudomonas' [Online] Disponibile su: <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/Evaluation-of-Sensititre-System-for-fluoroquinolones-using-EUCAST-breakpoints-for-Gram-negatives-LT2341A-global-EN.pdf> (Ultimo accesso 20/07/2017)

Segal-Maurer, S., Urban, C., Rahal, J.J. (1996) 'Current perspectives on multidrug-resistant bacteria. Epidemiology and Control' *Infectious Disease Clinics of North America* 10, 4 pp. 939-957

Sharp, S.E., (2014) 'Verification of Antimicrobial Susceptibility Testing Methods "A practical approach"' [Online] Disponibile su: <http://www.asmbanches.org/brcano/meetings/2016SprPpts/5.2SharpRed.pdf> (Ultimo accesso 20/07/2017)

Soundararajan, N., Shanmugam, P., Devanbu, C., Sattar, S.B.A. (2016) 'A study on the aac(6')-Ib-cr gene prevalence among ciprofloxacin-resistant strains of uropathogenic *Enterobacteriaceae*.' *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 6, 4 pp. 258-261.

Subramanian, G.K., Gnanasoundari, P., Chakraborty, S., Krishnan, P. (2016) 'Occurrence of aac(6')-Ib variants among Enterobacteriaceae: Is aac(6')-Ib-cr the most predominant variant?' *Indian J Med Microbiol*. 34, 3 pp. 400-1

Stewardson, A.J., Allignol, A., Beyersmann, J., Graves, N., Schumacher, M., Meyer, R., Tacconelli, E., De Angelis, G., Farina, C., Pezzoli, F., Bertrand, X., Gbaguidi-Haore, H., Edgeworth, J., Tosas, O., Martinez, J.A., Ayala-Blanco, M.P., Pan, A., Zoncada, A., Marwick, C.A., Nathwani, D., Seifert, H., Hos, N., Hagel, S. Pletz, M., Harbarth, S. and the TIMBER Study Group (2016) 'The health and economic burden of bloodstream infections caused by antimicrobial-susceptible and non-susceptible *Enterobacteriaceae* and *Staphylococcus aureus* in European hospitals, 2010 and 2011: a multicentre retrospective cohort study' *Eurosurveillance* 21, 33 pii=30319

Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C., Robicsek, A. (2009) 'Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat'. *Clin Microbiol Rev* 22 pp. 664–689

Tamma, P.D., Girdwood, S.C., Gopaul, R., Tekle, T. Roberts, A.A., Harris, A.D. Cosgrove, S.E., Carrol, K.C. (2013) 'The Use of Cefepime for treating AmpC  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae' *Clinical Infectious Diseases* 18 pp. 1-8

Tascini, C. (2008) 'L'interpretazione del fenotipo antibiotico come strumento per il clinico' *Springer-Verlag editore*

Tenover, F.C. (2010) 'Potential impact of rapid diagnostic testing on improving antimicrobial use'. *Ann NY Acad Sci* 1213 pp. 70–80

Tessari, A., Squarzon, L., Cavallaro, A., Parisi, S.G., Cruciani, M., Palù, G. (2010) 'Evaluation of the Uro4 HB&L™ system for the rapid diagnosis of lower respiratory' *Journal of Microbiological Methods* 81 pp. 235-238

Thermo-scientific (2017) 'Sensititre® quality control results' [Online] Disponibile su: [http://www.trekds.com/techdocs/qccert/bopo6f\\_b3152.pdf](http://www.trekds.com/techdocs/qccert/bopo6f_b3152.pdf) (Ultimo accesso 20/07/2017)

Thermo-scientific (2016) 'Sensititre MIC, Breakpoint, Susceptibility Plates - Performance information' [Online] Disponibile su: <http://www.trekds.com/techdocs> (Ultimo accesso 20/07/2017)

Thern, J., De With, K., Strauss, R., Steib-Bauert, M., Weber, N., Kern, W.V. (2014) 'Selection of hospital antimicrobial prescribing quality indicators: a consensus among German antibiotic stewardship (ABS) networkers' *Infection* 42 pp. 351-362

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017) 'Breakpoint tables interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017' [Online] Disponibile su: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (Ultimo accesso 20/07/2017)

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017) 'Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 6.0, 2017' [Online] Disponibile su: [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/) (Ultimo accesso 20/07/2017)

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017) 'Consultation on definition of intermediate category, October 2015 Steering Committee responses June 2016. Proposed modifications to EUCAST definition of the intermediate category' [Online] Disponibile su: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/2016/2\\_0160919\\_Intermediate\\_consultation\\_comments\\_and\\_responses.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/2016/2_0160919_Intermediate_consultation_comments_and_responses.pdf) (Ultimo accesso 31/08/2017)

Tumbarello, M., Viale, P., Viscoli, C., Treçarichi, E.M., Tumietto, F., Marchese, A., Spanu, T., Ambetti, S., Ginocchio, F., Cristini, F., Losito, A.R., Tedeschi, S., Cauda, R. and Bassetti, M. (2012) 'Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of Combination Therapy' *Clinical Infectious Disease* 55, 7 pp. 943-50

Varaldo, P.E. (2002) 'Antimicrobial resistance and susceptibility testing: an evergreen topic' *J Antimicrobial Chemother* 50 pp.1-4

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. (2012) 'MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics identification of microorganisms and beyond' *Appl Microbiol Biotechnol* 93 pp. 965-974

Vasoo, S., Barreto, J.N., Tosh, P.K. (2015) 'Emerging Issue in Gram-negative Bacterial Resistance: An Update for the Practicing Clinician' *Mayo Clin Proc.* 90, 3 pp. 395-403

WHO (2014) 'Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance' [Online] Disponibile su [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf) (Ultimo accesso 25/08/2017)

Viaggi, B., Tascini, C., Rossilini, G.M. (2016) 'Gestione diagnostico-terapeutica del paziente di area critica con infezione grave da patogeni batterici multiresistenti' *Mercurio editore*

Viaggi, B., Pecile, P., Rossolini, G.M. (2017) 'Sepsis stewardship, antibiotic stewardship e percorso microbiologico: tre nuove organizzazioni integrate per affrontare la sfida' [Online] Disponibile su <https://www.ars.toscana.it/it/in-evidenza/3745-sepsis-stewardship-antibiotic-stewardship-e-percorso-microbiologico-tre-nuove-organizzazioni-integrate-per-affrontare-la-sfida.html> (Ultimo accesso 1/9/2017)

Wachino, J., Yamane, K., Arakawa, Y. (2011) 'Practical Disk-Based Method for Detection of Escherichia coli Clinical Isolates Producing the Fluoroquinolone-Modifying Enzyme AAC(6')-Ib-cr' *Journal of Clinical Microbiology* 6 pp. 2378-2379

Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. (2012) 'MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics - identification of microorganisms and beyond (mini review)' *Appl Microbiol Biotechnol* 93 pp. 965–974

Wieser, A., Schubert S. (2016) 'MALDI-TOF MS entering the microbiological diagnostic laboratory – from fast identification to resistance testing' *Trends in Analytical Chemistry* 84 pp. 80–87

Wimmer, J.L., Long, S.W., Cernoch, P., Land, G.A., Davis, J.R., Musser, J.M., Olsen, R.J. (2012) 'Strategy for Rapid Identification and Antibiotic Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria Directly Recovered from Positive Blood Cultures Using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix System'. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 7 pp. 2452–2454

Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M. (2011) 'Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance'. *FEMS Microbiol Rev.* 35, 5 pp. 736-755

Yanat, B., Rodríguez-Martínez, J.M., Touati, A. (2017) 'Plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae: a systematic review with a focus on Mediterranean countries.' *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 36, 3 pp. 421-435

Yang, T., Zeng, Z., Rao, L., Chen, X., He, D., Lv, L., Wang, J., Zeng, L., Feng, M., Liu, J.H. (2014) 'The association between occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance

and ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolates of different origins' *Veterinary Microbiology* 170, 1-2 pp. 89-96

Zappavigna, A., Cavatorta, E., Chiarabini, R., Schiavo, R., Padrini, D., Reboli, C., Confalonieri, M. (2013) 'Direct antimicrobial susceptibility testing of Gram negative bacteria from positive blood cultures'. *Microbiologia Medica* 28, 3 pp. 171-173

Zarkoteu, O., Pournaras, S., Altouvas, G., Pitiriga, V., Tziraki, M., Mamali, V., Themeli-Digalaki, K., Tsakris, A. (2012) 'Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for extended-spectrum cephalosporin and carbapenem resistant Gram negative pathogens' *Journal of Clinical Microbiology* 50, 11 pp. 3747-3750

Zavascki, A.P., Bulitta, J.B., Landersdorfer, C.B. (2013) 'Combination Therapy for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacteria' *Expert Rev Anti Infect Ther* 11, 12 pp. 1333-1353.

Zboromyrska, Y., Ferrer-Navarro, M., Marco, F., Vila, J. (2014) 'Detección de resistencia a agentes antibacterianos mediante MALDI-TOF espectrometría de masas' *Rev Esp Quimioter* 27, 2 pp. 87-92