UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

Sistemi di identificazione batterica: analisi comparativa tra due metodologie su ceppi di *Enterobacter spp*

Bacterial identification systems: a comparative analysis of two methodologies using *Enterobacter spp* strains

Relatore:
Dott. Gianluca Morroni

Tesi di Laurea di:
Chiara Barchiesi

Correlatore:
Dott.ssa Maria Armiento

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE 1
1.1 *Enterobacter spp* 1
1.2 Importanza dell'identificazione di *Enterobacter* 3
1.3 Storia dei metodi di identificazione batterica 5
1.4 Tecnologia Vitek 8
1.5 Tecnologia MALDI-ToF 10
2. SCOPO DELLA TESI 13
3. MATERIALI E METODI 14
3.1 Allestimento delle colture batteriche di *Enterobacter* 14
3.1.1 Materiali necessari nell'allestimento delle colture batteriche di Enterobacter 14
3.1.2 Procedimento per l'allestimento delle colture batteriche di Enterobacter 15
3.2 Identificazione mediante MALDI-ToF 17
3.2.1 Materiali per l'allestimento di una piastrina d'identificazione MALDI-ToF 17
3.2.2 Procedimento per l'allestimento di una piastrina d'identificazione MALDI-ToF 18
3.3 Identificazione tramite Vitek 21
3.3.1 Materiali necessari per l'allestimento di una card d'identificazione Vitek 21
3.3.2 Procedimento per l'allestimento di una card d'identificazione Vitek 22
4. RISULTATI 25
4.1 Tabella dei risultati d'identificazione MALDI-ToF 25
4.2 Tabella dei risultati d'identificazione Vitek 29
4.3 Analisi di casistiche particolari 31
4.4 Spettri di massa dell'identificazione MALDI-ToF 32
4.5 Profili biochimici dell'identificazione Vitek 36
5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONE 41
6. BIBLIOGRAFIA 46

ABSTRACT

All'interno di un laboratorio di microbiologia clinica, di fondamentale importanza sono le tecniche d'identificazione batterica, che permettono agli operatori di riconoscere il batterio presente all'interno di un determinato campione biologico, così da orientare il clinico nella migliore scelta terapeutica per salvaguardare la salute di un paziente.

Proprio per questo motivo è stato fondamentale rendere sempre più performanti queste tecniche d'identificazione, così da ottenere nel minor tempo possibile risultati specifici ed accurati.

In questo studio sono state confrontate due tecnologie d'identificazione, nonché le più utilizzate all'interno dei laboratori di microbiologia clinica: la tecnologia MALDI-ToF e l'identificazione biochimica rapida. La prima, si basa sulla spettrometria di massa MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight), che permette di ottenere uno spettro di massa delle proteine di superficie del batterio, specifico per le diverse specie batteriche.

Per quanto riguarda la tecnologia di identificazione fenotipica rapida, questa si basa sulle caratteristiche biochimiche e fenotipiche dei batteri, attraverso l'utilizzo di uno strumento denominato Vitek. Questo utilizza dei pannelli specifici, all'interno dei quali sono presenti test miniaturizzati contenenti diversi substrati che, una volta utilizzati dai batteri, permettono di ottenere un profilo biochimico utile all'identificazione.

Per confrontare queste due tecniche di identificazione sono stati utilizzati 26 ceppi di *Enterobacter*. Questi batteri Gram -, appartenenti alla famiglia Enterobacterales, sono spesso riscontrabili in campioni biologici, in quanto alcune specie appartenenti al genere *Enterobacter* sono patogeni opportunisti presenti nel microbiota intestinale umano. I ceppi di *Enterobacter* risultano particolarmente difficili da identificare a causa dell'elevata complessità di questo genere.

I ceppi di *Enterobacter* sono stati isolati da campioni biologici e seminati su terreni di Mac Conkey, e testati contemporaneamente con le due tecniche di identificazione a partire da colonie batteriche pure. Lo studio ci ha mostrato come i risultati ottenuti dalla tecnologia MALDI-ToF siano stati raggiunti in tempi nettamente minori, sia per quanto riguarda i tempi d'allestimento del sistema di identificazione, che come tempi d'analisi. Inoltre, i risultati hanno evidenziato specificità maggiore rispetto a quelli del Vitek.

1. INTRODUZIONE

1.1 *Enterobacter spp*

Il genere *Enterobacter* comprende batteri appartenenti alla famiglia Enterobacterales. Questi sono bacilli Gram-negativi di dimensioni approssimativamente attorno ai 2 μm, generalmente mobili per la presenza di flagelli peritrichi (tranne che per *Enterobacter asburiae* che risulta essere immobile), anaerobi facoltativi e capaci di crescere in condizioni ambientali differenti.

Questo genere è stato descritto per la prima volta nel 1960, ma da allora la sua classificazione è cambiata più volte nel corso del tempo in seguito alla scoperta di differenze nell'assetto fenotipico e genotipico dei vari batteri. La revisione della tassonomia si è resa necessaria quando specie inizialmente considerate appartenenti allo stesso gruppo si sono dimostrate differenti per caratteristiche non sempre evidenziabili mediante i caratteri biochimici. Un esempio rilevante è rappresentato da *Enterobacter sakazakii*, classificato ora come *Cronobacter sakazakii*.

Ad oggi sono state riconosciute appartenenti al genere *Enterobacter* 22 specie:

Enterobacter aerogenes, Enterobacter amnigenus, Enterobacter arachidis, Enterobacter asburiae, Enterobacter carcinogenus, Enterobacter cloacae, Enterobacter cowanii, Enterobacter dissolvans, Enterobacter gergoviae, Enterobacter helveticus, Enterobacter hormaechei, Enterobacter kobei, Enterobacter ludwigii, Enterobacter mori, Enterobacter nimipressuralis, Enterobacter oryzae, Enterobacter pulveris, Enterobacter pyrinus, Enterobacter radicincitans, Enterobacter soli, Enterobacter taylorae, Enterobacter turicensis.

L'appartenenza a questo gruppo deriva per l'appunto non solo dalla condivisione di caratteristiche fenotipiche, ma soprattutto dalla condivisione di caratteristiche genetiche. Tra le specie sopraelencate, sette sono state raggruppate e denominate *Enterobacter cloacae complex.* Sono appartenenti a questo gruppo: *E. cloacae, E. asburiae, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii, E. mori, E. nimipressuralis*.

Le specie appartenenti all'*Enterobacter cloacae complex* mostrano fra di loro una similarità del genoma non inferiore al 60%.

Dal punto di vista ambientale il genere *Enterobacter* presenta una distribuzione molto ampia tale da rinvenire questi microrganismi in numerosi ambienti naturali, tra i quali acqua, acque reflue, suolo, piante e feci animali.

Alcune specie sono in grado di vivere come endofiti all'interno di tessuti vegetali o associati alla rizosfera, quella porzione di suolo influenzata dalle radici. L'ampia distribuzione nell'ambiente suggerisce la capacità di questi microrganismi di resistere ad ambienti diversi e dunque condizioni di vita differenti. Specie diverse presentano differenti habitat preferenziali all'interno dei quali è possibile rinvenire questi specifici microrganismi. *E. amnigenus*, ad esempio, è stato isolato da acque potabili e da suoli naturali, mentre *E. asburiae* è stato rinvenuto in acqua, suolo, piante e alimenti, ma non solo, infatti, quest'ultima specie è stata anche rinvenuta in diversi ambienti sanitari, dispositivi ed attrezzature utilizzati dagli operatori sanitari. *E. cloacae* è stato, invece, rinvenuto in alimenti e preparazioni a base di componenti vegetali, verdure crude e radici, oltre che nell'acqua potabile. Anche *E. gergoviae* è stato spesso isolato da frutta, verdura, cosmetici e campioni sottoposti a prove di sterilità, anche se per quest'ultima specie non risulta definito con certezza il serbatoio naturale. Oltre ai serbatoi ambientali, è stato possibile valutare la presenza di *Enterobacter* a livello del microbiota intestinale di animali e uomo. In particolare, *E. cloacae* è riconosciuto come normale componente della flora microbica del tratto gastrointestinale umano. La presenza di questi batteri nel microbiota dell'uomo non indica necessariamente un comportamento patogeno. Il genere comprende sia specie commensali, sia specie con comportamenti di patogeni opportunisti. Quest'ultimi si presentano in determinate condizioni che coinvolgono l'interazione tra le caratteristiche del microrganismo, lo stato immunitario dell'ospite e la presenza di condizioni predisponenti. Questa distinzione tra specie commensali e patogeni opportunisti assume particolare rilevanza in ambito clinico dove alcune specie come *E. aerogenes, E. cloacae* ed *E. hormaechei* sono frequentemente associate ad infezioni in soggetti ospedalizzati. I soggetti particolarmente colpiti sono pazienti immunocompromessi, pazienti che presentano dispositivi sanitari invasivi, quali cateteri urinari o venosi, pazienti sottoposti a terapie antibiotiche ad ampio spettro.

La capacità di questo genere di adattarsi a diverse condizioni ambientali predispone *Enterobacter* ad acquisire meccanismi di resistenza ad antibiotici contribuendo ad aumentare la loro rilevanza in ambiente nosocomiale. (1)

1.2 Importanza dell'identificazione di *Enterobacter*

La rilevanza clinica di *Enterobacter* dipende strettamente dal comportamento patogeno opportunista di molte specie, in particolare appartenenti al complesso *Enterobacter cloacae complex*, considerati fra i principali responsabili di un'ampia varietà di infezioni associate all'assistenza sanitaria.

Per questa ragione *Enterobacter* è stato incluso all'interno del gruppo ESKAPE, acronimo che indica l'insieme dei batteri patogeni di rilevanza clinica, associati ad infezioni nosocomiali e problematiche di resistenza agli antibiotici. I batteri appartenenti al gruppo ESKAPE sono: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa*, ed i batteri appartenenti al genere *Enterobacter*.

La capacità di causare infezioni in un ospite dipende dall'interazione tra i fattori di virulenza batterica e le condizioni dell'ospite. Molti di questi fattori dipendono dalla capacità di colonizzare e aderire alle superficie biologiche e superficiali, di persistere nell'ospite e di causare danni cellulari. La gravità delle infezioni di questi patogeni opportunisti è ulteriormente complicata dalle peculiari caratteristiche intrinseche di antibiotico-resistenza e dalla capacità di acquisire nuovi determinanti di resistenza agli antibiotici. (1)

Un primo elemento rilevante per quanto riguarda i fattori di virulenza batterica di *Enterobacter* è la motilità, associata alla presenza di flagelli peritrichi. Questi non svolgono esclusivamente una funzione locomotoria, ma possono contribuire a diversi processi biologici quali l'adesione alle superfici e la formazione di biofilm, favorendo il raggiungimento di specifiche nicchie dell'ospite, partecipando alle fasi iniziali della colonizzazione. Un secondo elemento è costituito dalla capacità di adesione, dovuta alla presenza di strutture specifiche sulla superficie del batterio, tra le quali riconosciamo le fimbrie e le adesine. Entrambi i meccanismi di virulenza facilitano la formazione di biofilm, che assume estrema rilevanza nelle infezioni nosocomiali associate a dispositivi medici. (2)

Un altro meccanismo di virulenza è la capacità di alcune specie di *Enterobacter* di produrre endotossine, associate ad un danno cellulare nell'ospite. Alcuni ceppi sono in grado di produrre α-emolisine e citotossine simili alle tossine Shiga-like II, ovvero "citotossine formanti pori attivate dai tioli". (1)

Una caratteristica dei batteri appartenenti al genere *Enterobacter,* rilevante in ambito clinico, è la capacità di adattarsi ad ambienti differenti, che spesso sfocia nell'acquisizione di resistenze antibiotiche. Questo è uno dei motivi per cui il genere è stato incluso nel gruppo ESKAPE.

La capacità di acquisire o sviluppare resistenze non è di per se un meccanismo di virulenza, ma causa una più difficoltosa eliminazione del microrganismo mediante terapia antibiotica. Tra i principali meccanismi di resistenza conosciuti rientra la produzione di β-lattamasi, enzima capace di inattivare l'anello β-lattamico: oltre alla resistenza intrinseca mediata dalla β -lattamasi cromosomica AmpC, alcuni ceppi di *Enterobacter* sono produttori di carbapenemasi come VIM e NDM. È stato studiato come *Enterobacter* presenti ulteriori meccanismi che comprendono la modificazione della permeabilità della membrana esterna, alterazioni alle porine e l'aumento dei sistemi d'efflusso. Questi meccanismi portano alla riduzione della concentrazione intracellulare dei composti antibiotici, che associati a profili di multi-resistenza, possono causare gravi infezioni nosocomiali.

Le infezioni che sono maggiormente associate al genere *Enterobacter* comprendono:

- batteriemie e altre infezioni del torrente ematico, che sono le manifestazioni cliniche più rilevanti generalmente dovute a procedure invasive o dispositivi medici invasivi;
- polmoniti, associate a ventilazione meccanica e dunque alla presenza di dispositivi medici invasivi;
- infezioni delle vie urinarie, associate a cateteri urinari o condizioni che facilitano la colonizzazione delle vie urinarie;
- infezioni del sito chirurgico e infezioni correlate a dispositivi medici;
- più raramente infezioni intra-addominali o meningiti. (2)

La particolare rilevanza che i batteri appartenenti al genere *Enterobacter* assumono è anche dovuta dalla comparsa di focolai epidemici a livello ospedaliero. Outbreak sono spesso causati da *E.cloacae, E.hormaechei*, ed *E. ludwigii*, soprattutto nei reparti di terapia intensiva e unità neonatale. (1)

1.3 Storia dei metodi di identificazione batterica

Nel corso della storia della microbiologia clinica, i sistemi di identificazione batterica si sono evoluti, passando da tecniche basate sull'osservazione diretta delle caratteristiche morfologiche, a sistemi basati dapprima sulle proprietà biochimiche dei microrganismi e, successivamente, su tecniche più rapide, automatizzate e specifiche fondate sull'analisi delle componenti proteiche e del materiale genetico.

Antonie Van Leeuwenhoek fu tra i primi a descrivere i microrganismi mediante l'osservazione microscopica, proprio grazie allo sviluppo della microscopia, aprendo così la strada allo studio del mondo microbico e la caratterizzazione dei microrganismi in base alle caratteristiche morfologiche. (3)

Un passaggio fondamentale fu rappresentato dallo sviluppo delle tecniche di colorazione che permisero di ottenere informazioni sulla struttura dei microrganismi e la loro capacità tintoriale. Tra queste colorazioni spicca in assoluto la colorazione di Gram, che permise per la prima volta di suddividere i batteri in due grandi categorie: i batteri Gram + e i batteri Gram -, fornendo informazioni relative alla forma e disposizione dei microrganismi. (4)

In seguito, l'identificazione divenne più precisa con l'introduzione ed il perfezionamento delle tecniche di coltura. Infatti, la capacità di isolare un microrganismo e studiarne le caratteristiche in coltura pura fu essenziale per poter determinare delle peculiarità associabili ad una specifica identificazione.

La disponibilità di terreni solidi rese possibile lo sviluppo di terreni selettivi, differenziali e di arricchimento, capaci di favorire la crescita di determinati microrganismi e di evidenziare particolari caratteristiche di crescita microbica.

Questo permise di descrivere l'aspetto delle colonie, quali texture, bordi, consistenza, colore, le modalità di crescita microbica e le reazioni che avvengono sui terreni differenti.

Tra la fine del XIX secolo e l'inizio del XX secolo per eseguire una migliore identificazione batterica si iniziò a sfruttare le caratteristiche biochimiche dei batteri, dunque la capacità di quest'ultimi di utilizzare determinati substrati, produrre specifici metaboliti o possedere particolari corredi enzimatici. Per distinguere le varie specie vennero osservate le differenze dei microrganismi nel metabolismo dei carboidrati, delle proteine e dei lipidi. (3)

Le tecniche d'identificazione basate sulle differenze biochimiche dei vari microrganismi vennero sviluppate ulteriormente introducendo sistemi di maggiore complessità contenenti più substrati. Uno fra questi fu l'API system, che combinava l'utilizzo o meno di diversi substrati ad un approccio numerico per ottenere un'identificazione batterica. Inizialmente venne utilizzato per l'identificazione di tutti quei microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobacterales, ma successivamente venne esteso a numerose altre categorie di microrganismi. (4)

La sempre maggiore necessità di aumentare la produttività e ridurre i tempi di risposta portò, negli anni settanta, all'introduzione dei sistemi informatici all'interno di laboratori di microbiologia clinica. I sistemi automatizzati furono progettati per eseguire contemporaneamente numerose reazioni biochimiche, controllarne i fattori d'incubazione e interpretarne i risultati mediante sistemi computerizzati. L'identificazione poteva così essere ottenuta attraverso il confronto del profilo biochimico dell'isolato con database di profili biochimici precedentemente caratterizzati. Sviluppando questi sistemi automatizzati oltre a ridurre i tempi, vennero ampliati anche i database migliorando così anche gli algoritmi d'interpretazione. Nonostante questi progressi, i metodi convenzionali presentavano numerose limitazioni, tra le quali la necessaria crescita del microrganismo e l'esecuzione ed interpretazione di molteplici reazioni, e ciò comportava diversi giorni per ottenere un'identificazione completa. Alcuni microrganismi erano difficili da distinguere tramite il proprio profilo biochimico, in quanto molti di questi presentano caratteristiche metaboliche simili o poco evidenti. Per tali motivi la microbiologia clinica iniziò a sfruttare tecniche d'identificazione baste su principi differenti al profilo metabolico. Tra queste tecniche un ruolo centrale venne assunto dalla spettrometria di massa MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight). La spettrometria di massa era già utilizzata in ambito analitico per lo studio delle proteine, ma venne introdotta all'inizio degli anni duemila nei laboratori di microbiologia clinica come applicazione dell'identificazione microbica. L'introduzione di questa nuova tecnologia ha permesso di velocizzare i tempi di identificazione batteri. Il MALDI-ToF è in grado di ottenere in pochi minuti un profilo proteico del batterio analizzato, che viene confortato con dei database contenenti spettri di massa di microrganismi già caratterizzati.

Questa tecnologia ha cambiato profondamente la routine dei laboratori e la rapidità con cui è possibile identificare un microrganismo una volta ottenuta una colonia batterica.
Parallelamente allo sviluppo della spettrometria di massa, un'ulteriore tecnologia che ha permesso analisi veloci ed estremamente specifiche è la diagnostica molecolare.
Il principio su cui questa si basa è la ricerca di specifiche sequenze di acidi nucleici, sfruttando la PCR (Polymerase Chain Reaction) che amplifica tali sequenze e le rende rilevabili anche quando presenti in minime quantità. Il processo molecolare prevede prima di tutto l'estrazione degli acidi nucleici nel campione clinico, seguita dall'amplificazione della sequenza bersaglio. Durante la PCR, il DNA viene sottoposto a cicli successivi di denaturazione, appaiamento a primer ed estensione. Il ripetersi di questi cicli porta ad amplificazione di tipo esponenziale del materiale genetico bersaglio. L'evoluzione di questa tecnologia ha permesso l'introduzione di tecniche di quantificazione e tecniche multiplex, capaci di ricercare contemporaneamente più classi microbiche all'interno dello stesso test.
Le tecnologie molecolari hanno continuato ad evolversi incorporando anche approcci di sequenziamento estremamente avanzati, fino alle metodiche di Next Generation Sequencing (NGS), che permettono di analizzare contemporaneamente un numero elevato di frammenti genetici. Attraverso l'analisi bioinformatica delle sequenze ottenute è possibile il confronto con dei database e riuscire a identificare anche agenti eziologici difficili da individuare. Queste tecnologie offrono una capacità di rilevazione molto ampia, ma il loro impiego è attualmente limitato dai costi e dalle competenze bioinformatiche elevate. (3)
Nonostante, l'introduzione di queste tecniche estremamente avanzate, i metodi tradizionali sono frequentemente utilizzati all'interno di tutti i laboratori di microbiologia clinica, integrati dalle nuove tecnologie che permettono una migliore identificazione in minor tempo.

1.4 Tecnologia Vitek

La tecnologia VITEK rappresenta uno dei primi sistemi automatizzati introdotti nei laboratori di microbiologia clinica. La tecnologia VITEK sfrutta dei pannelli standardizzati nei quali si sviluppano reazioni biochimiche che altrimenti dovrebbero essere eseguite manualmente. Ciò permette di eseguire più reazioni contemporaneamente e la presenza di un sistema informatico interpreta i risultati in maniera autonoma. Questo sistema sfrutta l'identificazione mediante studio dell'aspetto fenotipico e biochimico.

Il microrganismo viene posto a contatto con una serie di substrati e durante l'incubazione vengono osservate le modificazioni determinate dalle capacità metaboliche del microrganismo. Essendo un sistema semi automatizzato, queste reazioni non avvengono ognuna in una singola provetta, bensì in card contenenti numerosi test miniaturizzai, la cui combinazione dei risultati produce un profilo biochimico, che al termine dell'incubazione, è confrontato dal sistema informatico con altri profili biochimici presenti su un database di batteri precedentemente caratterizzati. La scelta della card è strettamente legata al tipo di microrganismo che si sta analizzando perché gruppi microbici diversi richiedono diverse card con differenti pannelli metabolici.

Prima di procedere con l'analisi, e quindi con l'allestimento delle card d'identificazione, la procedura richiede che il microrganismo si trovi nelle condizioni ottimali per essere testato, ovvero è necessario avere una coltura pura e ben sviluppata del microrganismo da testare. Solo a questo punto il microrganismo può essere utilizzato per allestire una sospensione standardizzata che viene successivamente associata alla card appropriata.

La standardizzazione della sospensione è un passaggio cruciale per ottenere dei risultati che siano quanto più precisi ed accurati in quanto la quantità di microrganismi presenti può influenzare la velocità e l'intensità delle reazioni biochimiche.

Una volta che le card sono state inserite all'interno dello strumento, durante l'incubazione sono costantemente lette al fine di monitorare qualsiasi minimo cambiamento, che siano cambiamenti cromatici o altre variazioni misurabili otticamente, per poter così ottenere il profilo fenotipico dell'isolato.

Una volta completata l'acquisizione dei dati relativi alle singole reazioni, il sistema considera il profilo complessivo, confrontandolo con i dati già noti presenti nel sistema.

La presenza di una banca dati è di per sé sia un vantaggio che uno svantaggio:avere una banca dati permette di rendere l'identificazione affidabile, ma quest'ultime devono essere costantemente aggiornate, poiché non sarebbe possibile l'identificazione di microrganismi non inseriti nel database. I microrganismi strettamente correlati o caratterizzati da attività metaboliche poco differenziate possono risultare difficili da distinguere attraverso un approccio esclusivamente biochimico, come nel caso di *Enterobacter cloacae*.

Tra i vantaggi di questo sistema si riconosce l'automatizzazione e, dunque, la lettura delle card da parte di un sistema informatico, permettendo così di ridurre la soggettività della lettura, limitando errori legati all'interpretazione del risultato da parte dell'operatore. Un ulteriore vantaggio, oltre alla standardizzazione della procedura di allestimento del campione, riguarda la possibilità di analizzare e testare più campioni contemporaneamente. In aggiunta, oltre il 90% delle identificazioni dei cocchi Gram + e dei bacilli Gram- è ottenuto entro le sette ore di incubazione, evidenziando la relativa rapidità di questi sistemi automatizzati in confronto ai tradizionali test manuali. (3)

1.5 Tecnologia MALDI-ToF

La spettrometria di massa MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) è una delle principali innovazioni utilizzate nella microbiologia diagnostica per l'identificazione batterica. Questa tecnologia ha cambiato il modo di identificare i microrganismi: non si basa sull'osservazione dei caratteri fenotipici dei batteri, bensì sull'analisi del profilo proteico. Il risultato viene confrontato con gli spettri di massa presenti nella banca dati, permettendo di associare il profilo osservato a un determinato microrganismo. (3)

Il principio di funzionamento si basa sulla coniugazione di due processi: la ionizzazione mediante desorbimento laser assistito da matrice (MALDI) e la separazione degli ioni mediante l'analisi del loro tempo di volo (ToF). Per poter usufruire di questa tecnologia, il materiale microbico da identificare, dopo essere stato depositato in una piastrina metallica denominata target, viene ricoperto da una matrice costituita da una sostanza organica in grado di assorbire efficacemente l'energia del laser. Generalmente, la sostanza organica maggiormente utilizzata è l'acido α-ciano-4-idrossicinnamico (CHCA). Questa matrice una volta essiccata, forma dei cristalli all'interno dei quali rimangono inglobate le componenti del campione. L'energia del laser viene assorbita dalla matrice e trasferita alle molecole del campione, permettendo il processo di desorbizione e la ionizzazione. Nel caso dell'identificazione batterica, una frazione importante del segnale analizzato deriva dalle proteine cellulari maggiormente abbondanti e sufficientemente stabili da generare uno spettro. Gli ioni vengono poi sottoposti ad un campo elettrico che li accelera all'interno di una camera nella quale sono mantenute condizioni di vuoto. (6)

La seconda componente fondamentale è l'analizzatore ToF ossia "Time of Flight" che tradotto è letteralmente "Tempo di Volo". Gli ioni dopo essere stati accelerati, entrano all'interno di un tubo con una lunghezza prestabilita, al termine del quale è presente un rivelatore. Dato che gli ioni vengono sottoposti allo stesso potenziale d'accelerazione, la velocità di migrazione dipende esclusivamente dal rapporto tra la loro massa e la carica elettrica, indicato come m/z. Gli ioni con rapporto massa/carica diverso migrano in maniera differente e raggiungono il rivelatore in tempi differenti. Il rapporto massa carica è inversamente proporzionale alla velocità con cui gli ioni percorrono la distanza

prestabilita:ioni con rapporto massa/carica basso hanno una velocità di migrazione più alta, mentre ioni con un rapporto massa/carica maggiore migrano più lentamente. (5)
Il risultato dell'analisi è uno spettro di massa costituito da numerosi picchi.
Sull'asse delle ascisse è rappresentato il rapporto massa/carica, mentre sull'asse delle ordinate l'intensità del segnale. Questi spettri di massa costituiscono i vari profili proteici delle specie microbiche: non l'intero proteoma (insieme di tutte le proteine che una cellula possiede), ma solamente le proteine di superficie, comunque sufficienti a riconoscere numerose specie batteriche. (7)

Le moderne tecnologie MALDI-ToF sono in grado di riconosce all'incirca 1585 specie microbiche, tra i quali 16000 ceppi di batteri, muffe e lieviti, con una media di 12 ceppi per specie. (9)
L'introduzione di questa tecnologia nei laboratori di microbiologia clinica ha permesso di ottenere numerosi vantaggi, soprattutto in termini di rapidità di risposta, aspetto rilevante in ambito clinico per abbreviare i tempi necessari a dare indicazioni sulla gestione del paziente. (3)
Un ulteriore vantaggio è rappresentato dalla facilità con la quale avviene l'allestimento del sistema di identificazione, che permette di analizzare un numero molto elevato di campioni contemporaneamente. Un altro elemento positivo è l'estrema accuratezza dei risultati forniti dallo strumento, raggiungendo percentuali superiori al 90%. (7)

E' importante considerare i vantaggi economici, perché, nonostante l'acquisto iniziale dello strumento e la sua manutenzione risultano un investimento importante, i costi riguardanti le singole analisi sono molto contenuti, soprattutto per la limitata necessità di reagenti. Bisogna sempre considerare poi che questa tecnica permette di identificare un'ampia quantità di microrganismi, tra cui batteri, ma anche lieviti e funghi.
Nonostante i numerosi vantaggi, MALDI-ToF presenta alcune limitazioni. Prima fra tutte è il fatto che se lo spettro di un microrganismo non è adeguatamente rappresentato nella banca dati, il sistema non è in grado di fornire un'identificazione.
Questa limitazione, è particolarmente rilevante quando si ha la necessità di identificare specie più rare o microrganismi recentemente descritti. (6)

La buona riuscita di un'identificazione accurata è, inoltre, strettamente dipendente dal corretto svolgimento della fase pre-analitica.

Ciò rappresenta un secondo limite , tanto che se questa fase non viene svolta in maniera corretta influenza negativamente il risultato fornito dallo strumento. I microrganismi con pareti cellulari particolarmente resistenti possono richiedere passaggi ulteriori per liberare le proteine di superficie e creare uno spettro di massa interpretabile. (5)

Una limitazione strettamente legata alla fase pre-analitica, riguarda l'assoluta necessità di avere microrganismi in coltura. L'identificazione non può essere eseguita direttamente da campioni biologici, ma richiede che questo venga prima di tutto seminato ed incubato per ottenere delle colonie batteriche che verranno, solo in seguito, identificate. Questo limite è rilevante quando in un campione non è presente un numero sufficiente di microrganismi o il campione risulta insufficiente e dunque non si riesce ad ottenere uno spettro rappresentativo. Un'ulteriore limitazione è rappresentata dalla difficoltà di distinguere alcune specie filogeneticamente o fenotipicamente molto vicine tra loro:profili proteici simili producono spettri con differenze non sufficienti per discriminare due specie, tra queste è di interesse citare *Enterobacter cloacae.* (7)

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo di questa tesi è di determinare quale tecnologia d'identificazione può essere considerata la migliore da utilizzare in un laboratorio di microbiologia clinica, focalizzandosi su un genere di difficile identificazione quale *Enterobacter,* analizzando il tempo necessario nell'allestimento dei sistemi d'identificazione e il tempo d'analisi impiegato dalle due tecnologie prese in esame, dunque il tempo totale per fornire un'identificazione batterica. Sono state indagate anche la sensibilità, la specificità, l'accuratezza e la precisione del risultato fornito.

Le due metodiche prese in esame sono state la tecnologia MALDI-ToF e la tecnologia Vitek, entrambe utilizzate nel laboratorio di Microbiologia, presso la SOD Medicina di Laboratorio dell'A.O.U. delle Marche.

Per testare le due tecnologie sono stati utilizzati 26 ceppi di *Enterobacter spp,* identificati contemporaneamente con entrambe le tecnologie, partendo da colonie pure, precedentemente isolate da campioni di varia natura.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Allestimento delle colture batteriche di *Enterobacter*

La prima fase sperimentale dello studio prevede la preparazione di colture batteriche pure e fresche. Per coltura batterica pura si intende una popolazione di batteri di una singola specie e di un unico ceppo, che crescono in assenza di altre specie batteriche. Idealmente questa popolazione originerebbe da un singolo batterio, e dunque la coltura batterica dovrebbe avere lo stesso patrimonio genetico. (8)

Per questo studio sono stati utilizzati 26 ceppi di *Enterobacter,* isolati da differenti materiali biologici.

3.1.1 Materiali necessari nell'allestimento delle colture batteriche di Enterobacter

Per riuscire ad ottenere una coltura batterica pura è stato necessario l'utilizzo di diversi materiali la cui sterilità è una condizione fondamentale per evitare contaminazioni.

Per la semina sono state utilizzate anse di inoculazione sterili, monouso, in plastica da 1μL, fornite dalla ditta "CITOTEST".

La semina è stata effettuata sul terreno di coltura specifico per i batteri Gram negativi, Agar Mac Conkey (MC).

Questo terreno è definito selettivo e differenziale per la sua composizione:

- **Selettivo**: il terreno di coltura Agar Mac Conkey è selettivo per la presenza di due sostanze inibenti, i Sali biliari ed il Cristal Violetto. I Sali biliari inibiscono selettivamente la crescita dei batteri Gram +. Il Cristal Violetto inibisce, invece, la crescita di tutti quei batteri Gram + che non sono inibiti dai Sali biliari. In questo modo, si garantisce + che sul terreno Agar Mac Conkey possono crescere solo batteri Gram-.
- **Differenziale**: il terreno di coltura Agar Mac Conkey è differenziale per la presenza di due sostanze quali il lattosio, l'agente differenziale, ed il rosso neutro, l'indicatore di pH. Se un batterio Gram - è lattosio fermentante, la fermentazione dello zucchero porterà alla produzione di acido lattico, che acidificando il pH, produrrà colonie rosa/fucsia, grazie alla presenza del rosso neutro. In presenza di batteri Gram - non lattosio fermentanti le colonie appariranno incolori.

Uno strumento di fondamentale importanza è il termostato: questo permette di mantenere le condizioni d'incubazione costanti e controllate al fine di garantire un ambiente ideale per la crescita microbica. Questo strumento è stato prodotto dalla ditta "Angelantoni" ed è chiamato "MCT 1500/2". Questo tipo di termostato ha un range di temperatura che va da +10°C a +50°C.

È dotato di uno sportello che isola l'ambiente interno dall'ambiente esterno, e di sonde che danno indicazioni sulle condizioni interne, che devono essere periodicamente controllate.



Figura 1 - Termostato

3.1.2 Procedimento per l'allestimento delle colture batteriche di Enterobacter

I ceppi di *Enterobacter*, isolati da colture miste, sono stati nominati tramite una sigla definita in sede di lavoro, riportata sulla piastra di coltura. È stata utilizzata la sigla "Ent-" seguita da un numero progressivo. Per ogni ceppo è stato segnato anche il giorno ed il mese della semina ed il codice identificativo del campione madre da cui è stato eseguito l'isolamento. Dalle piastre in cui erano presenti colonie con caratteristiche riconducibili a quelle di *Enterobacter spp*, è stato eseguito un isolamento delle colonie d'interesse tramite l'utilizzo di anse da inoculo da 1 µL. L'isolamento è stato fatto in condizioni di sterilità su piastre di Agar Mac Conkey tramite semina "a tre settori".

Questa semina si compone di tre movimenti:

1. Il materiale appena depositato viene seminato nel primo quadrante con un movimento a zig-zag fitto, che va ad occupare circa un terzo della piastra. In questa sezione si avrà una crescita batterica molto concentrata.
2. Il secondo quadrante permetterà di diluire la crescita batterica del primo quadrante. Si ruota la piastra di circa 90° eseguendo lo stesso movimento fitto a zig-zag, riprendendo il primo quadrante in parte, per poi staccarsi e proseguire la semina fino a circa metà piastra. Il secondo quadrante occupa meno di un terzo della piastra, e risulterà avere una crescita batterica intermedia.
3. Il terzo quadrante è seminato ruotando nuovamente la piastra di 90°, e riprendendo il secondo quadrante in parte, per poi terminare staccandosi da quest'ultimo, e tracciando una "Z" che andrà ad occupare la restante parte della piastra.

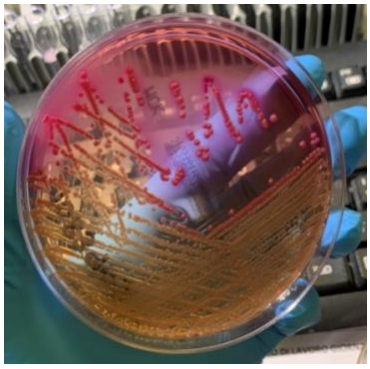


Figura 2 - Immagine di una semina di Enterobacter LAC +



Figura 3 - Immagine di una semina di Enterobacter LAC -

Al termine della fase di semina, le piastre sono state raccolte in un rack, per poi essere incubate overnight nel termostato.

Le condizioni di crescita, mantenute dal termostato sono:

- Temperatura: la temperatura ideale per la crescita microbica è 37°C;
- Aerobiosi: *Enterobacter* è un batterio anaerobio facoltativo, in questo studio il batterio è stato fatto crescere in aria ambientale;
- Umidità: la % di umidità generalmente è del 98%

Terminata l'incubazione overnight, è stata fatta una prima lettura a livello macroscopico, per valutare se l'isolamento dei ceppi di *Enterobacter* sia avvenuto correttamente. Se si sono riscontrate contaminazioni, è stato necessario ripetere l'isolamento. L'osservazione macroscopica si è basata su paramenti quali colore, forma, dimensione, texture e morfologia delle colonie.

3.2 Identificazione mediante MALDI-ToF

Uno dei due metodi d'identificazione valutati allo scopo della tesi è l'identificazione mediante tecnologia MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight)

3.2.1 Materiali per l'allestimento di una piastrina d'identificazione MALDI-ToF

In laboratorio l'identificazione batterica mediante tecnologia MALDI-ToF è eseguita andando ad utilizzare lo strumento Vitek MS Prime fornito dalla ditta Biomerieux.

La tecnologia MALDI-ToF prevede la preparazione di una piastrina d'identificazione, sulla quale vengono deposte le colonie batteriche da identificare. La piastrina è costituita da 3 quadranti, ognuno dei quali presenta 16 spot d'identificazione ed uno spot centrale per il controllo interno. La piastrina è costituita da 4 colonne, numerate progressivamente da 1 a 4, e 12 righe, nominate con lettere dell'alfabeto da A ad L. Inoltre, ogni piastrina è identificata da un codice QR univoco. Il controllo è fondamentale per l'allestimento e la buona riuscita dell'identificazione: il controllo è costituito da un ceppo batterico proveniente da una collezione standardizzata denominata ATCC (American Type Colture Collection). In particolare, il ceppo utilizzato nella metodica è l'*Escherichia coli* ATCC 25922.

Il controllo è fornito dalla ditta produttrice in forma liofilizzata: una volta ricostituito, il ceppo ATCC viene seminato su piastre di Agar Sangue, si tratta di un terreno solido e di arricchimento, al cui interno sono presenti emazie intere, per favorire la crescita anche dei microrganismi più esigenti.

Si preparano due piastre di Agar Sangue identificate come Madre 1 e Madre 2.

In un primo momento le piastre sono incubate a 37°C overnight. Dal giorno successivo entrambe le piastre sono conservate a +4 °C per rallentare la crescita batteria. La piastra Madre 1 verrà utilizzata per eseguire ogni giorno gli isolamenti di ATCC su piastre di Agar Sangue, per una settimana. Ciò permette di avere a disposizione ogni mattina colonie fresche di ATCC. Dopo una settimana, si passa all'utilizzo di Madre 2.

Dopo due settimane, verrà ricostituito un nuovo ceppo liofilo di ATCC.

Per l'allestimento della piastrina di identificazione MALDI-ToF è fondamentale la matrice. La matrice è fornita direttamente dalla ditta produttrice Biomerieux.

Si tratta di boccette il cui contenuto di matrice (MS-CHCA, Acido α-ciano-4-idrossicinnamico) è di 0.5 mL, pronta all'uso.

La matrice permette di ionizzare il microrganismo trasferendo l'energia prodotta dal laser dello strumento al microrganismo. (10)

La preparazione degli spot di identificazione batterica presenti sulla piastrina è avvenuta tramite l'utilizzo di anse di inoculazione sterili, monouso, in plastica da 1µL, fornite dalla ditta "CITOTEST".

La micropipetta con una sensibilità strumentale da 0.5 a 10 µL, e i rispettivi puntali da 10 µL, sono stati invece utilizzati per dispensare la quantità idonea di matrice, pari a 1µL, sullo spot di identificazione.

3.2.2 Procedimento per l'allestimento di una piastrina d'identificazione MALDI-ToF

Dopo una prima analisi a livello macroscopico, in cui non si sono riscontrate contaminazioni degli isolamenti eseguiti il giorno precedente, si è potuto procedere con la preparazione della piastrina di identificazione per il MALDI-ToF.

Il primo passaggio della preparazione della piastrina è stato dunque quello di scannerizzare il QR code univoco presente: il sistema informatico di preparazione riconosce la piastrina e apre la schermata di configurazione sulla quale è possibile inserire i dati di ogni campione che verrà analizzato.

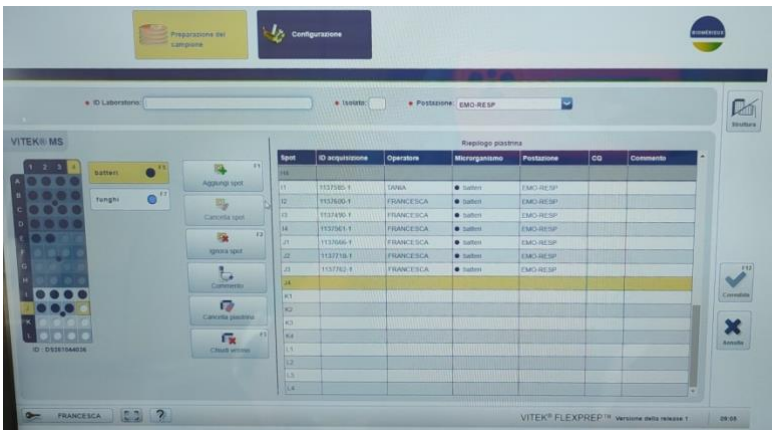


Figura 4 - Schermata video del sistema informatico di MALDI-ToF

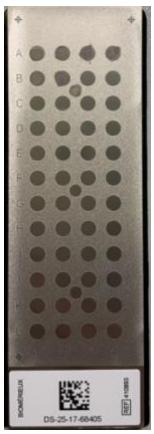


Figura 5 – Piastrina d'identificazione MALDI-ToF

Il primo spot preparato è stato quello di controllo, lo spot centrale di ogni quadrante da 16 spot, dei 3 presenti sulla piastrina. La preparazione di questo è importante, in quanto determina la qualità dell'identificazione di tutti gli spot del quadrante di riferimento. Nel caso in cui l'identificazione dello spot di controllo non dovesse avvenire, non è eseguita automaticamente l'analisi degli spot del quadrante di riferimento.

La colonia utilizzata per la preparazione dello spot di controllo deriva dalla piastra di ATCC, preparata il giorno prima. Tramite l'utilizzo di un'ansa da 1 µL, si preleva una minima quantità di colonia e tramite movimenti circolari è depositata al centro dello spot. Successivamente, si aggiunge 1µL di matrice. Quando si preleva la matrice dalla sua boccetta bisogna porre particolare attenzione con il puntale, evitando si prelevare il materiale dal fondo. Nel fondo della boccetta sono presenti dei sali, che se depositati sullo spot, potrebbero inficiare negativamente l'analisi.

Preparato lo spot di controllo, si è passato all'allestimento degli spot dei ceppi di *Enterobacter* isolati. La preparazione degli spot batterici avviene in maniera analoga alla preparazione dello spot di controllo. Completata la preparazione della piastrina di identificazione, sul programma Vitek Flex Prep, si è cliccato sulla voce "Chiudi vetrino". Questa è una operazione fondamentale in quanto consente di inviare le informazioni di ciò che è stato preparato allo strumento Vitek MS Prime. Ciò consente di associare in fase di lavorazione il ceppo identificato dallo strumento all'ID campione inserito in fase di preparazione. Prima di caricare la piastrina sullo strumento, è importante far asciugare completamente la matrice depositata. Solo in seguito, si può procedere con l'analisi strumentale.



Figura 6 - Strumento MALDI-ToF

(https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/industry-products/vitek-ms-prime-mass-spectrometry-system.html)

Il Vitek MS Prime ha un alloggio centrale con un'apertura, che permette l'inserimento della piastrina. La prima operazione eseguita dallo strumento è la lettura le QR Code della piastrina. Questo permette di comunicare con il programma Myla e consente allo strumento di avere tutte le informazioni per procedere con l'analisi degli spot preparati.
Lo strumento restituisce un'interfaccia video che consente di seguire in tempo reale le fasi di identificazione. Se l'analisi va a buon fine compare in corrispondenza dello spot una spunta verde, viceversa si ha una croce rossa.
La mancata identificazione dello spot può essere dovuta a diversi fattori: qualità della colonia in termini di consistenza troppo mucosa, colore troppo intenso, quantità di materiale depositato sullo spot. Lavorando su ceppi di *Enterobacter* è capitato di aver a che fare con colonie lattosio-fermentanti dalla colorazione intensa o con colonie dalla consistenza mucosa. Ne è derivato che la preparazione dello spot ha previsto una maggiore precisione, al fine di garantire una buona identificazione.
L'interfaccia video, per ogni spot, propone anche il numero di profili analizzati e lo spettro di analisi prodotto dallo strumento. Il tempo che impiega il Vitek MS Prime per l'identificazione è di 15 secondi per ogni spot. Ogni spot è ripetuto fino ad un massimo di 3 volte, per un tempo totale di identificazione dello spot di 45 secondi.

3.3 Identificazione tramite Vitek

Dopo aver eseguito l'identificazione tramite Vitek MS Prime, si è passati ad un secondo metodo di identificazione: card di identificazione con lo strumento Vitek 2.

3.3.1 Materiali necessari per l'allestimento di una card d'identificazione Vitek

L'esecuzione dell'identificazione batterica tramite Vitek 2 prevede l'utilizzo di specifiche card. Le card contengono al loro interno diversi substrati metabolici di reazione che possono essere utilizzati dal metabolismo del batterio.

Attraverso il profilo biochimico di utilizzo di questi substrati, un software identifica la specie microbica in esame. Sono disponibili più card VITEK che hanno diversi substrati che permettono l'identificazione di gruppi di microrganismi (11):

- GP → card per l'identificazione di batteri Gram +, permette di riconoscere 135 specie microbiche.
- GN → card per l'identificazione di batteri Gram -, permette di riconoscere 201 specie microbiche.
- YST → card per l'identificazione di lieviti, permette di riconoscere 63 specie microbiche.
- NH → card per l'identificazione di batteri appartenenti al genere *Neisseria* ed *Haemophilus*, permette di riconoscere 36 specie microbiche.
- ANC → card per l'identificazione di batteri anaerobi e appartenenti al genere *Corynebacterium*, permette di riconoscere 104 specie microbiche.

Per l'identificazione dei ceppi di *Enterobacter* tramite Vitek 2 sono state utilizzate le card GN. La sospensione batterica è stata eseguita all'interno di provette in plastica monouso da 5 mL, con dimensione di 12,0 mm di diametro esterno e 75,0 mm di altezza.

La fisiologica è il mezzo nel quale i batteri sono stati sospesi. Si tratta di una soluzione salina con una concentrazione di NaCl di 0,45% ed un pH compreso tra il 4.5 e 7.0 , fornita dalla ditta BioMérieux.

Per la preparazione della sospensione batterica sono stati utilizzati tamponi sterili monouso forniti dalla ditta "CITOTEST", con un corpo in legno ed una testa in cotone.

Per verificare la concertazione della sospensione batterica è stato utilizzato un lettore ottico chiamato "DENSICHECK" fornito dalla ditta BioMérieux.

Questo presenta un alloggio per la provetta, e permette di leggere in maniera automatica la densità ottica della sospensione batterica andando a restituire un valore espresso in McFarland. Per l'identificazione dei ceppi di *Enterobacter*, la sospensione batterica deve avere una densità compresa fra 0,5 e 0,63 McFarland.

3.3.2 Procedimento per l'allestimento di una card d'identificazione Vitek

In un primo momento si è eseguito l'accesso al software Myla, tramite icona Firefox e si è cliccato su "Flex Prep", per poi selezionare la sezione riguardante il Vitek 2 tramite l'icona "Struttura". Il primo passaggio richiesto è stato quello di nominare la "cassetta". Si tratta di un supporto in plastica, che presenta 15 alloggiamenti per le card di identificazione e per le provette contenenti le sospensioni batteriche. Le cassette sono state nominate con la data del giorno di preparazione.

Nominata la cassetta, si è aperta la schermata di allestimento delle sospensioni batteriche. Dapprima, nella voce "ID campione" è stata inserita la sigla definita per ogni ceppo di *Enterobacter*. Nella voce "tipo di card" si è scannerizzato il barcode della card GN utilizzata. In questo modo si crea un'associazione univoca tra il ceppo di *Enterobacter* e la card di riferimento. Il software riconosce automaticamente la tipologia di card utilizzata, così da definirne la concentrazione della sospensione batterica necessaria per l'identificazione.

La card di identificazione è stata poi alloggiata nella posizione che il software indica nella cassetta di riferimento.



Figura 7 - Cassetta delle card GN da inserire nello strumento Vitek



Figura 8 - Card GN (https://eshop.biomerieux.com/s/product/gn-test-kit-vtk2-20cards-21341/01t24000003cG4PAAU?language=en_US)

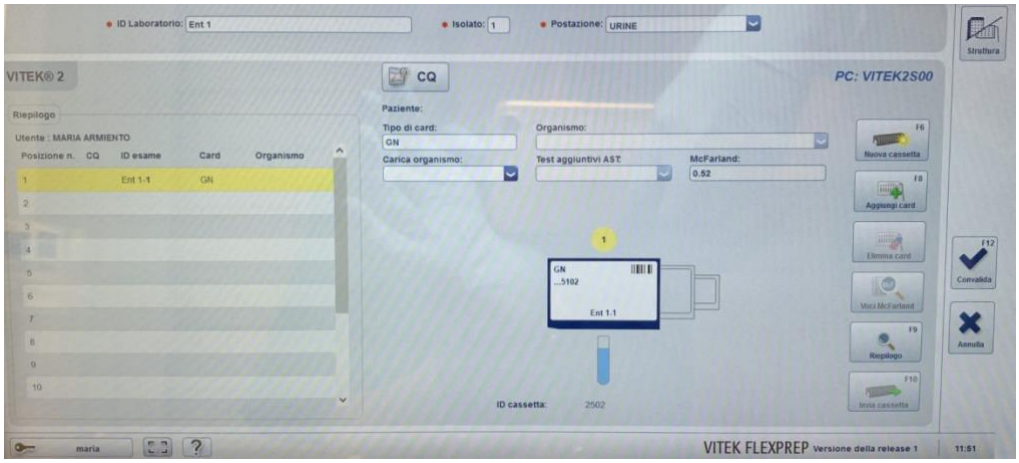


Figura 9 - Schermata video del sistema informatico di Vitek

Le sospensioni batteriche sono state allestite in provette di plastica contenenti 3 mL di soluzione fisiologica sterile, preparate prima dell'inizio dell'intera lavorazione

La sospensione batterica è stata preparata partendo dalla coltura pura del ceppo di *Enterobacter*. Tramite un tampone sterile, sono state prelevante colonie del batterio e successivamente stemperate in una provetta di plastica contenente 3 mL di soluzione fisiologica sterile. La concentrazione della sospensione batterica è stata misurata tramite il "DENSICHECK" che ha dato un valore di misurazione nell'interfaccia video.

La concentrazione della sospensione batterica per l'utilizzo della card di identificazione GN deve essere in un range tra 0,5 e 0,63 McFarland. Raggiunto il valore ideale della sospensione, tale valore è stato salvato per il ceppo in lavorazione tramite un tasto alloggiato dietro al DENSICHECK. A questo punto, la provetta con la sospensione batterica è stata alloggiata nella cassetta in corrispondenza della card di identificazione precedentemente scansionata.



Figura 10 - Strumento Vitek 2

(https://www.biomerieux.com/corp/en/our-offer/clinical-products/vitek-2.html)

Terminata la preparazione della cassetta, è stato cliccato il tasto “invia cassetta”. Questo rappresenta un passaggio essenziale e fondamentale da fare poiché permette allo strumento Vitek 2 di avere a disposizione tutte le informazioni necessarie per associare le identificazioni eseguite al ceppo di riferimento.

Il tempo massimo per l’esecuzione dell’analisi è di 18 ore. Ne deriva che i risultati ottenuti sono stati analizzati il giorno seguente alla lavorazione manuale.

4. RISULTATI

4.1 Tabella dei risultati d'identificazione MALDI-ToF

CEPPO	LAC	1° ID MALDI-ToF (%C)	2° ID MALDI-ToF (%C)	3° ID MALDI-ToF (%C)
Ent-1	+	Nessuna identificazione	Nessuna identificazione	- *Enterobacter hormaechei ssp hormaechei* (50%) - *Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (50%)
Ent-2	-	*Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (99%)	\	\
Ent-3	-	- *Enterobacter hormaechei ssp oharae/xiangfangensis* (50%) - *Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (50%)	\	\
Ent-4	-	- *Enterobacter hormaechei ssp hoffmannii* (50%) - *Enterobacter hormaechei ssp oharae/xiangfangensis* (50%)	\	\

Ent-5	+	Nessuna identificazione	*Enterobacter hormaechei ssp hormaechei* (99,1%)	\
Ent-6	-	*Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (99,9%)	\	\
Ent-7	+	*Enterobacter hormaechei ssp hoffmannii* (99,9%)	\	\
Ent-8	-	*Enterobacter roggenkampii* (99,9%)	\	\
Ent-9	-	*Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (99,9%)	\	\
Ent-10	+	Nessuna identificazione	- *Enterobacter hormaechei ssp hormaechei* (50%) - *Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (50%)	\
Ent-11	-	*Enterobacter ludwigii* (99,9%)	\	\
Ent-12	+	Nessuna identificazione	- *Enterobacter hormaechei ssp hoffmannii* (48,6%) - *Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (51,3%)	\
Ent-13	-	*Enterobacter ludwigii* (99,9%)	\	\

Ent-14	-	Nessuna identificazione	*Klebsiella pneumoniae* (99,9%)	*Enterobacter roggenkampii* (99,9%)
Ent-15	-	*Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (99,9%)	\	\
Ent-16	-	*- Enterobacter hormaechei ssp hormaechei* (48,6%) *- Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (51,4%)	\	\
Ent-17	-	*Enterobacter ludwigii* (99,9%)	\	\
Ent-18	-	*Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (99,9%)	\	\
Ent-19	-	*Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (99,9%)	*- Enterobacter hormaechei ssp oharae/xiangfangensis* (50,0%) *- Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (50,0%)	\
Ent-20	-	*- Salmonella enterica* (47,4%) *- Leclercia adecarboxylata* (52,6%)	*Enterobacter cancerogenus* (99,9%)	\

Ent-21	-	*- Enterobacter hormaechei ssp oharae/xiangfangensis* (49,3%) *- Enterobacter hormaechei ssp hoffmannii* (50,7%)	\	\
Ent-22	-	*Enterobacter osburiae* (99,9%)	\	\
Ent-23	-	*Enterobacter hormaechei ssp hoffmannii* (99,9%)	\	\
Ent-24	-	*- Enterobacter hormaechei ssp hormaechei* (50,0%) *- Enterobacter hormaechei ssp hoffmannii* (50,0%)	\	\
Ent-25	-	*- Enterobacter hormaechei ssp hormaechei* (50,0%) *- Enterobacter hormaechei ssp steigerwaltii* (50,0%)	\	\
Ent-26	-	*Enterobacter roggenkampi* (99,9%)	\	\

Tabella 1 - Risultati d'identificazione MALDI-ToF

4.2 Tabella dei risultati d'identificazione Vitek

Ceppo	Mc Farland	ID VITEK (%C)	Affidabilità VITEK	Tempo analisi VITEK
Ent-1	0.52	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,78 ore
Ent-2	0.58	*Enterobacter cloacae complex* (95%)	Identificazione molto buona	4,78 ore
Ent-3	0.57	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,77 ore
Ent-4	0.57	*Enterobacter cloacae complex* (96%)	Identificazione eccellente	4,77 ore
Ent-5	0.52	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,77 ore
Ent-6	0.57	*Enterobacter cloacae complex* (95%)	Identificazione molto buona	4,77 ore
Ent-7	0.55	*Enterobacter cloacae complex* (97%)	Identificazione eccellente	4,78 ore
Ent-8	0.63	*Enterobacter cloacae complex* (96%)	Identificazione eccellente	5,77 ore
Ent-9	0.53	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,82 ore
Ent-10	0.51	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,77 ore
Ent-11	0.51	*Enterobacter cloacae complex* (99%)	Identificazione eccellente	6,00 ore
Ent-12	0.58	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,77 ore
Ent-13	0.52	*Enterobacter cloacae complex* (95%)	Identificazione molto buona	5,07 ore
Ent-14	0.53	*Enterobacter cloacae complex* (99%)	Identificazione eccellente	5,78 ore
Ent-15	0.54	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,83 ore

Ent-16	0.53	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,82 ore
Ent-17	0.53	*Enterobacter cloacae complex* (96%)	Identificazione eccellente	4,80 ore
Ent-18	0.53	*Enterobacter cloacae complex* (95%)	Identificazione molto buona	4,82 ore
Ent-19	0.52	*Enterobacter cloacae complex* (98%)	Identificazione eccellente	4,78 ore
Ent-20	0.60	*Pantoea spp* (99%)	Identificazione eccellente	5,78 ore
Ent-21	0.51	*Enterobacter cloacae complex* (99%)	Identificazione eccellente	4,80 ore
Ent-22	0.55	Low Discrimination	Discriminazione insufficiente	9,92 ore
Ent-23	0.63	*Enterobacter cloacae complex* (99%)	Identificazione eccellente	4,80 ore
Ent-24	0.59	*Enterobacter cloacae complex* (96%)	Identificazione eccellente	4,80 ore
Ent-25	0.52	*Enterobacter cloacae complex* (95%)	Identificazione molto buona	4,78 ore
Ent-26	0.59	*Enterobacter cloacae complex* (99%)	Identificazione eccellente	5,77 ore

Tabella 2 - Risultati d'identificazione Vitek

4.3 Analisi di casistiche particolari

Di seguito vengono analizzate casistiche particolari riscontrate durante il processo di identificazione.

- Nell'osservazione della piastra Ent-17 si è notata la presenza di due colonie morfologicamente ben distinte, nonostante fosse stato eseguito un processo di isolamento per ottenere una colonia pura. Per convenzione sono state nominate "Ent-17-1" ed "Ent-17-2" ed entrambe testate con l'identificazione MALDI-ToF. Ciò ci ha permesso di riconoscere due ceppi distinti di *Enterobacter spp*, dunque è stato necessario separare i due ceppi batterici eseguendo due isolamenti . "Ent-17-2" è stato rinominato "Ent-26" e inserito nell'analisi per lo scopo della tesi.
- Nell'osservazione della piastra Ent-19 si è notata la presenza di due colonie morfologicamente ben distinte, nonostante fosse stato eseguito un processo di isolamento per ottenere una colonia pura. Entrambe le colonie sono state testate preliminarmente con la tecnologia MALDI-ToF, al fine di riconoscere la colonia batterica appartenete al genere *Enterobacter*. Dopo aver eseguito un isolamento batterico di quest'ultima, si è proseguito all'analisi della coltura pura allo scopo della tesi.
- Nell'andare ad identificare per la prima voltanEnt-20 con tecnologia MALDI-ToF si è riscontrato un risultato aberrante ed incerto. Proprio per questo motivo, è stato necessario eseguire una seconda identificazione sulla stessa colonia analizzata in precedenza, per verificare l'attendibilità del risultato. Questa seconda identificazione ha restituito un risultato nettamente più attendibile, ma soprattutto con un alto livello di confidenza.

4.4 Spettri di massa dell'identificazione MALDI-ToF

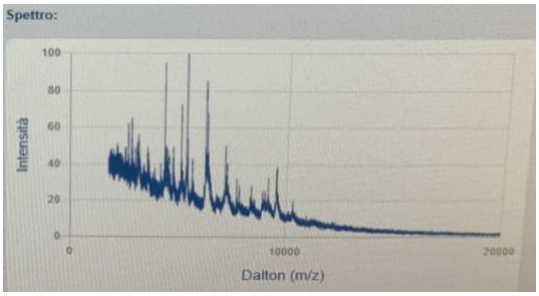


Figura 11 - Spettro di massa di Ent-1 alla prima identificazione

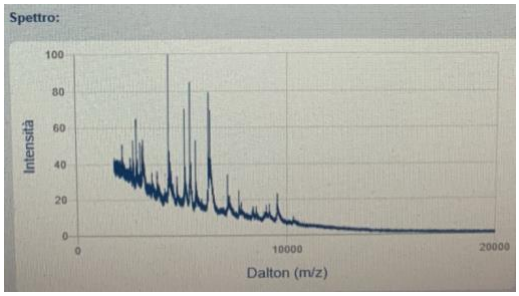


Figura 12 - Spettro di massa di Ent-1 alla seconda identificazione

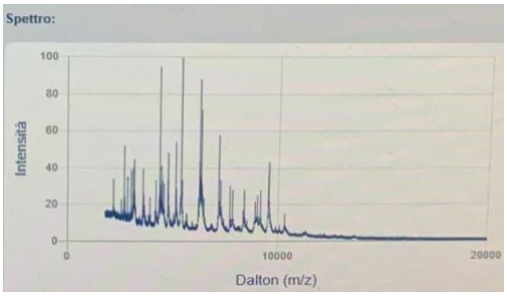


Figura 13 - Spettro di massa di Ent-1 alla terza identificazione

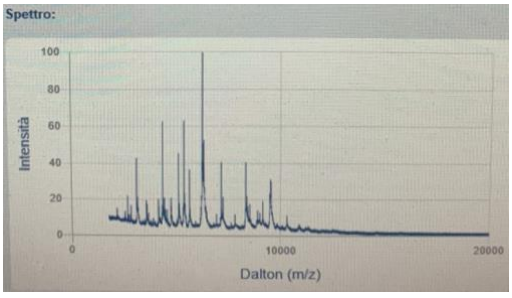


Figura 14 - Spettro di massa di Ent-2

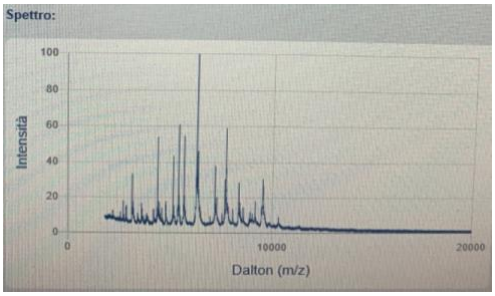


Figura 15 - Spettro di massa di Ent-3

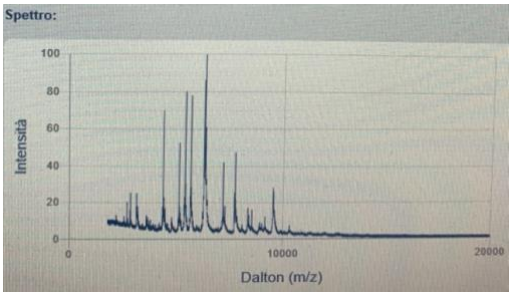


Figura 16 - Spettro di massa di Ent-4

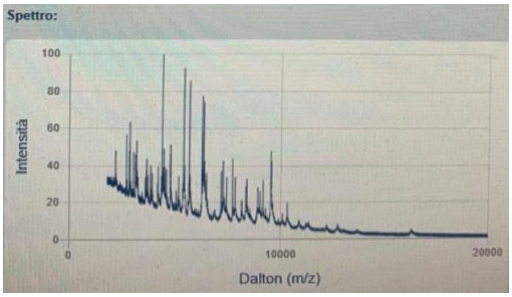


Figura 17 - Spettro di massa di Ent-5 alla prima identificazione

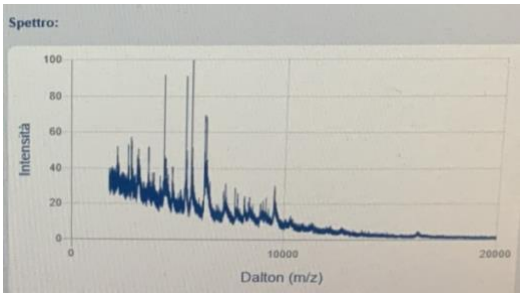


Figura 18 - Spettro di massa di Ent-5 alla seconda identificazione

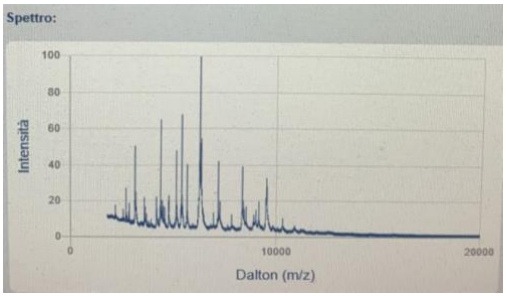


Figura 19 - Spettro di massa di Ent-6

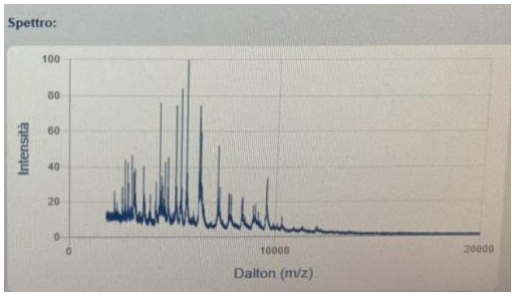


Figura 20 - Spettro di massa di Ent-7

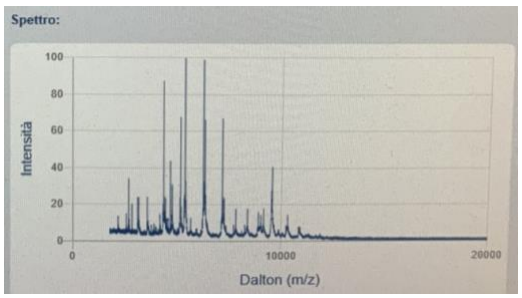


Figura 21 - Spettro di massa di Ent-8

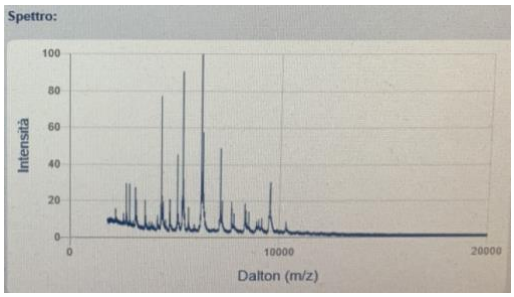


Figura 22 - Spettro di massa di Ent-9

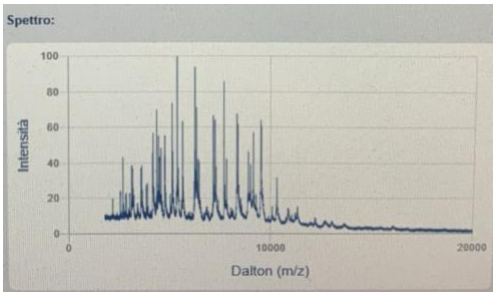


Figura 23 - Spettro di massa di Ent-10 alla prima identificazione

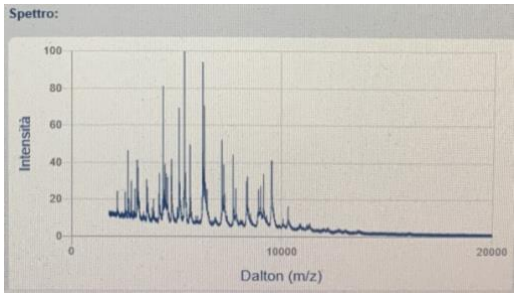


Figura 24 - Spettro di massa di Ent-10 alla seconda identificazione

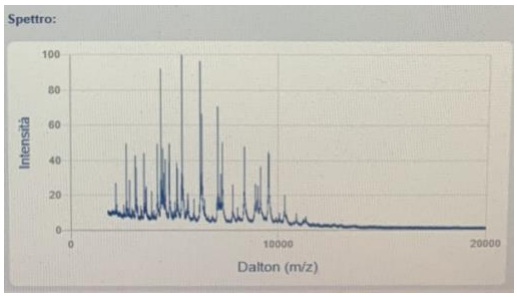


Figura 25- Spettro di massa di Ent-11

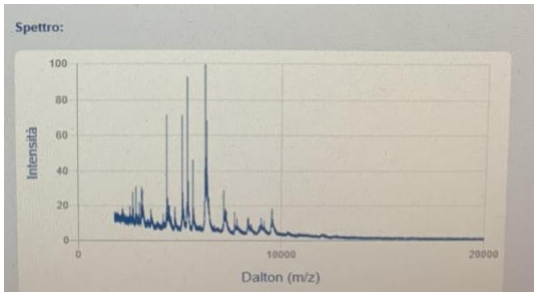


Figura 26- Spettro di massa di Ent-12 alla prima identificazione

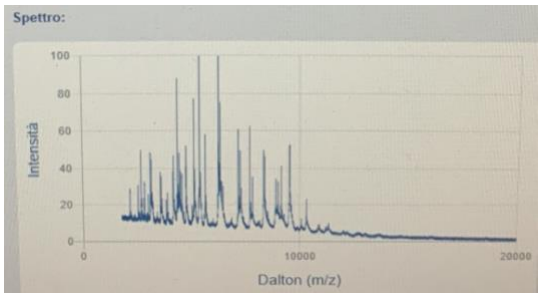


Figura 27- Spettro di massa di Ent-12 alla seconda identificazione

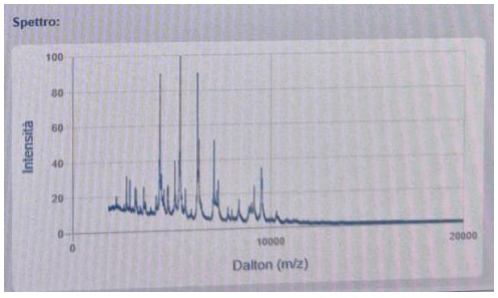


Figura 28 - Spettro di massa di Ent-13

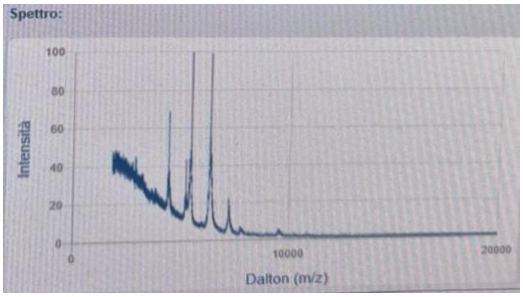


Figura 29 – Spettro di massa di Ent-14-1 alla prima identificazione del 21/05/26

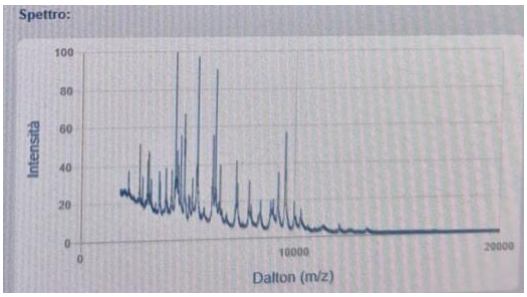


Figura 30 - Spettro di massa di Ent-14-2

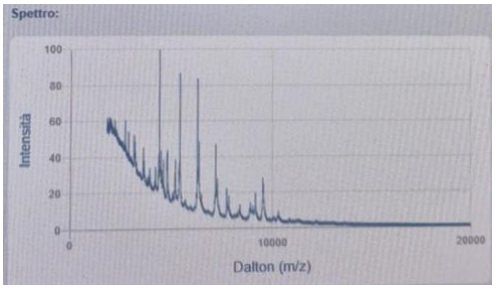


Figura 31 – Spettro di massa di Ent-14-1 alla seconda identificazione del 21/05/26

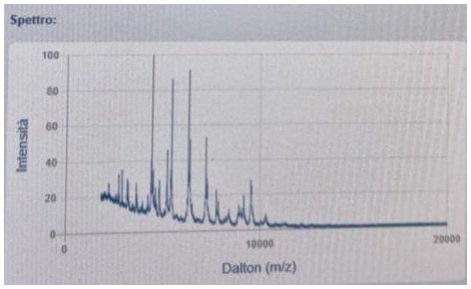


Figura 32 – Spettro di massa di Ent-14-1 nell'identificazione del 22/05/26

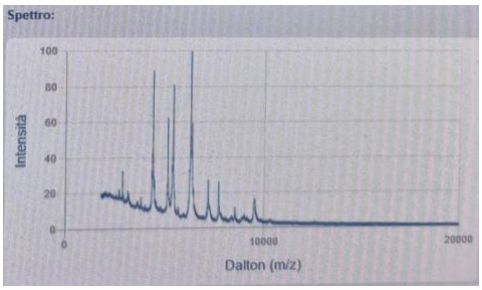


Figura 33 - Spettro di massa di Ent-15

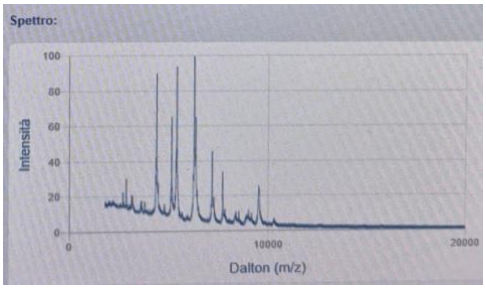


Figura 34 - Spettro di massa di Ent-16

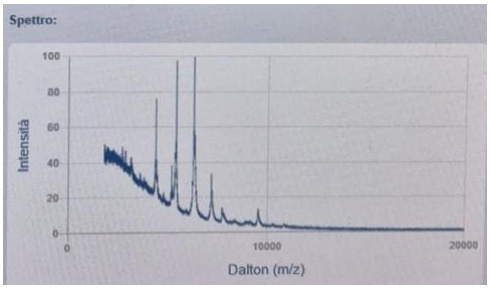


Figura 35 - Spettro di massa di Ent-17 alla prima identificazione il 21/05/2026

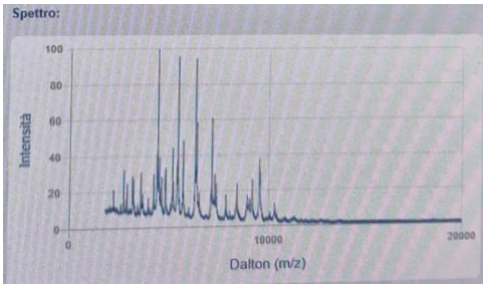


Figura 36 - Spettro di massa di Ent-17 alla seconda identificazione il 22/05/2026

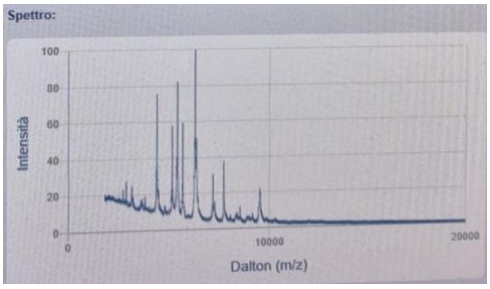


Figura 37 - Spettro di massa di Ent-18

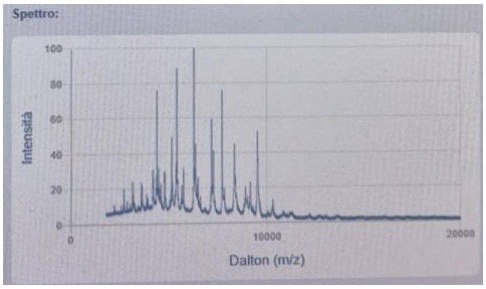


Figura 38 - Spettro di massa di Ent-19 alla prima identificazione il 21/05/2026

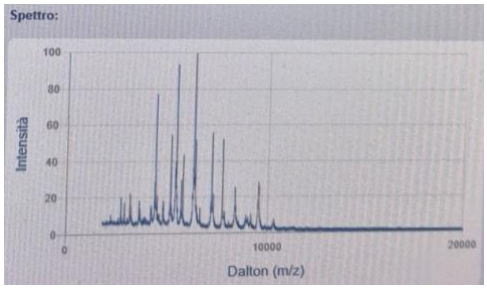


Figura 39 - Spettro di massa di Ent-19 alla seconda identificazione il 22/05/2026

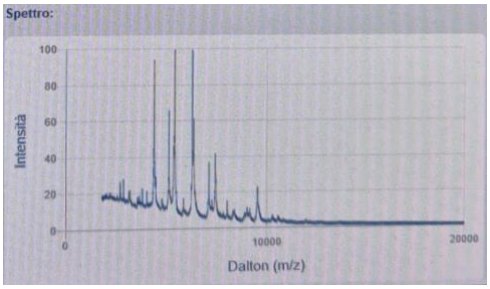


Figura 40 - Spettro di massa di Ent-20 alla prima identificazione

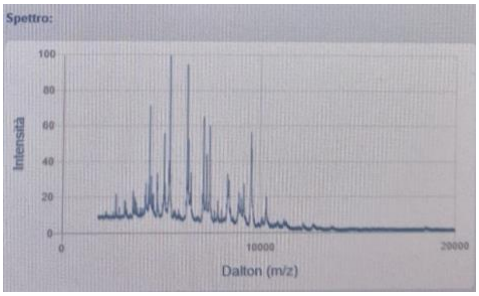


Figura 41 - Spettro di massa di Ent-20 alla seconda identificazione

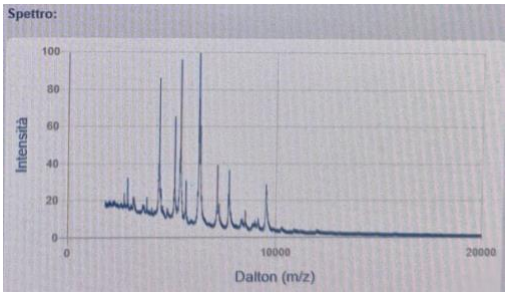


Figura 42 - Spettro di massa di Ent-21

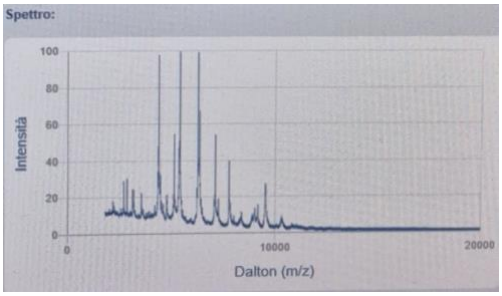


Figura 43 - Spettro di massa di Ent-22

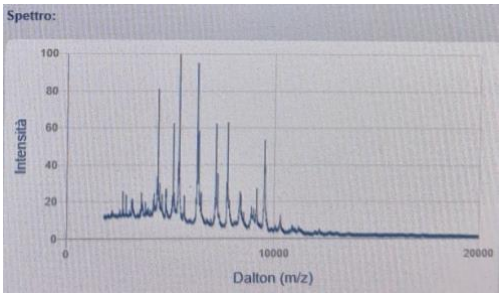


Figura 44 - Spettro di massa di Ent-23

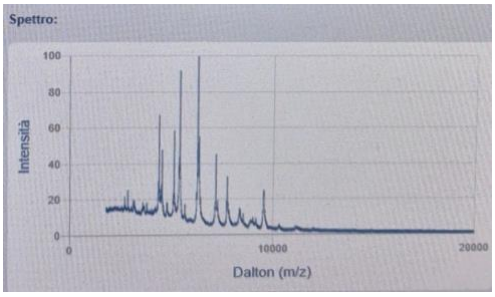


Figura 45 - Spettro di massa di Ent-24

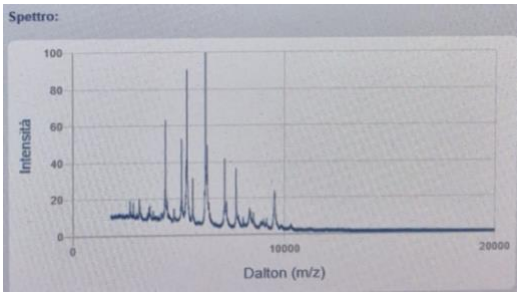


Figura 46 - Spettro di massa di Ent-25

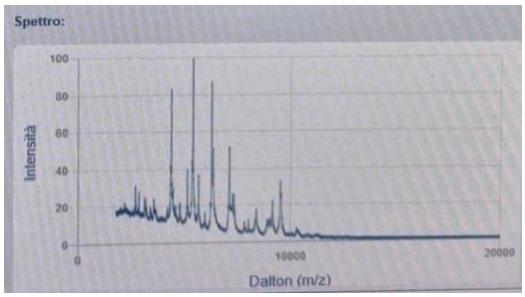


Figura 47 - Spettro di massa di Ent-26 alla prima identificazione il 21/05/2026

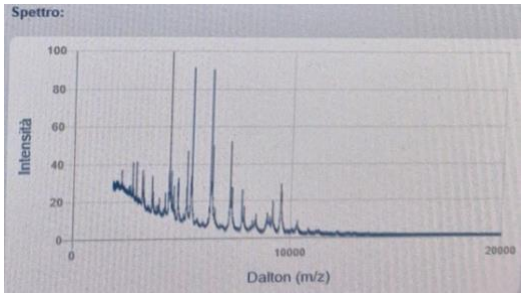


Figura 48 - Spettro di massa di Ent-26 alla seconda identificazione il 22/05/2026

4.5 Profili biochimici dell'identificazione Vitek

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 49 - Profilo biochimico Ent-1

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 50 - Profilo biochimico Ent-2

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 51 - Profilo biochimico Ent-3

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 52 - Profilo biochimico Ent-4

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 53 - Profilo biochimico Ent-5

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 54 - Profilo biochimico Ent-6

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 55 - Profilo biochimico Ent-7

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 56 - Profilo biochimico Ent-8

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 57 - Profilo biochimico Ent-9

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 58 - Profilo biochimico Ent-10

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	(+)
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 59 - Profilo biochimico Ent-11

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 60 - Profilo biochimico Ent-12

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 61 - Profilo biochimico Ent-13

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 62 - Profilo biochimico Ent-14

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 63 - Profilo biochimico Ent-15

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 64 - Profilo biochimico Ent-16

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	(-)
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 65 - Profilo biochimico Ent-17

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	(+)	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 66 - Profilo biochimico Ent-18

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 67 - Profilo biochimico Ent-19

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	-	45	PHOS	(-)
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 68 - Profilo biochimico Ent-20

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	(-)	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 69 - Profilo biochimico Ent-21

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	+	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 70 - Profilo biochimico Ent-22

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	(+)	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 71 - Profilo biochimico Ent-23

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	-	39	5KG	-
40	lLATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 72 - Profilo biochimico Ent-24

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	+	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	-
46	GlyA	+	47	ODC	-	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 73 - Profilo biochimico Ent-25

Dettagli biochimici																
2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	lARL	-	7	dCEL	+	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	+	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	+
17	BGLU	+	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	+	22	BAlap	-
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	+	29	TyrA	+	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	+	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	lLATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	+	44	AGAL	+	45	PHOS	+
46	GlyA	-	47	ODC	+	48	LDC	-	53	lHISa	-	56	CMT	-	57	BGUR	-
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	lMLTa	-	62	ELLM	-	64	lLATa	-			

Figura 74 - Profilo biochimico Ent-26

5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI E CONCLUSIONE

Analizzando i risultati ottenuti dall'identificazione mediante tecnologia MALDI-ToF, si può notare come questi siano molto specifici. Nella maggior parte dei casi lo strumento ha fornito in maniera dettagliata l'identificazione di specie del batterio che si stava analizzando, senza necessità di ripetere il test.

Molti dei risultati che lo strumento ha fornito, hanno una confidenza superiore al 99%, il che indica una alta affidabilità del dato ottenuto, nonché un'ottima identificazione.

Sebbene l'identificazione di specie si è dimostrata estremamente solida, l'analisi delle sottospecie è stata invece più difficile. Numerose identificazioni della sottospecie, si sono mostrate "incerte", con una confidenza che si aggira attorno al 50% per ogni possibile alternativa. Tuttavia, questa incertezza può essere definita superflua.

Lo strumento in questi casi analizzati ha riscontato difficoltà nel definire con certezza la sottospecie microbica, restituendo però informazioni certe sul genere e la specie dei batteri testati.

Nello specifico, nel ceppo "Ent-17" lo strumento è stato in grado di distinguere la presenza di due differenti specie microbiche appartenenti allo stesso genere permettendo di isolare il ceppo "Ent-26", così come ha permesso di verificare la presenza di batteri contaminanti anche quando macroscopicamente non è stato possibile distinguere la presenza di due colonie differenti.

Nei casi in cui l'identificazione non è avvenuta è stato necessario e sufficiente ripetere l'allestimento dello spot per avere in breve tempo un'identificazione specifica della colonia selezionata da testare. Nonostante ciò, questa tecnologia non sempre è perfetta, e come tutti i test può fornire dei risultati erronei e non attenibili (come per esempio Ent-20), perciò è sempre buona norma verificare il risultato ottenuto quando non si è certi della correttezza di questo.

Analizzando, invece, i risultati ottenuti dall'identificazione Vitek, si possono notare come gli esiti che sono stati restituiti siano molto più generali dei precedenti. In particolare, ciò che lo strumento ha eseguito in autonomia è stato incubare le card ed analizzare il profilo biochimico ottenuto, per poi associarlo al microrganismo con il quale ha riscontrato una maggiore compatibilità. Nel caso in esame, nella maggior parte dei test eseguiti, il profilo biochimico con maggiore compatibilità rispetto a quanto

ottenuto è stato quello di *Enterobacter cloacae complex*, che non indica un'unica specie ma un gruppo di specie geneticamente molto vicine tra loro.

Il sistema informatico ha richiesto all'operatore di eseguire ulteriori test manuali per riuscire a distinguere tra le varie specie individuate tra i possibili risultati d'identificazione. In particolare, per tutte le card, tranne per il ceppo Ent-20 ed il ceppo Ent-22, sono stati richiesti dal sistema i seguenti test manuali aggiuntivi per poter riuscire a discriminare le varie specie:

- *Enterobacter kobei*: fermentazione di lattosio e sorbitolo, test di Voges-Proskauer, mobilità del batterio;
- *Enterobacter hormaechei*: fermentazione del sorbitolo, mobilità del batterio;
- *Enterobacter cloacae ssp cloacae*: fermentazione di lattosio e sorbitolo, test di Voges-Proskauer, mobilità del batterio;
- *Enterobacter cloacae dissolvens*: fermentazione del sorbitolo, test di Voges-Proskauer, mobilità del batterio;
- *Enterobacter ludwigii*: fermentazione di lattosio e sorbitolo, mobilità del batterio.

Per il ceppo Ent-20 non sono stati richiesti ulteriori test manuali aggiuntivi.

Per il ceppo Ent-22, la cui identificazione non è andata a buon fine, oltre ai test elencati in precedenza, è stato richiesto anche:

- *Enterobacter asburiae*: test di Voges-Proskauer, mobilità del batterio.

In questo caso, il sistema biochimico né stato in grado di fornirci l'identificazione della sottospecie, né tantomeno è riuscito a distinguere nello specifico quale fosse la specie a cui appartiene il microrganismo testato. Nonostante ciò, l'identificazione della maggior parte delle card è stata "eccellente" o "molto buona".

Ciò indica un'alta affidabilità del dato ottenuto, e quindi quasi sicuramente il microrganismo testato appartiene al gruppo *Enterobacter cloacae complex*.

Per lo scopo della tesi sono state confrontate le due metodologie d'identificazione al fine di decretare quale sia la più efficiente nell'identificazione batterica, analizzandone le procedure d'allestimento, i tempi d'analisi e i risultati ottenuti.

In prima istanza è necessario prendere in considerazione le procedure d'allestimento dei due metodi d'identificazione. Sono state allestite delle colture pure di *Enterobacter spp*, in modo da analizzare in contemporanea con le due metodologie ceppi differenti.

L'isolamento, non sempre è andato a buon fine e in alcuni casi (come per esempio "Ent-17" ed "Ent-19") sono state riscontrate delle colture cellulari miste causate da contaminazioni batteriche.

È importante tenere in considerazione l'accaduto in quanto si può osservare che è stato possibile eseguire l'identificazione batterica anche su colture miste solo mediante identificazione MALDI-ToF. Ciò è stato possibile in quanto la quantità di materiale necessario all'allestimento dello spot d'identificazione è nettamente inferiore rispetto al materiale necessario ad allestire una sospensione batterica con una concentrazione compresa tra 0,5 e 0,63 McFarland. E' importante considerare che quando si ha una coltura mista non è possibile eseguire immediatamente un'identificazione Vitek, ma è indispensabile ricorrere prima ad un isolamento batterico per favorire la crescita batterica ed aumentare così la quantità di materiale a disposizione. Questo passaggio è, invece, superfluo per l'identificazione MALDI-ToF.

Prendendo in esame i tempi di allestimento dei sistemi d'identificazione, si può affermare che la preparazione di una piastrina MALDI-ToF è molto più immediata rispetto all'allestimento di una card Vitek. L'esecuzione di una sospensione batterica è un processo alquanto dispendioso in termini tempistici, in quanto è facile sbagliare ed ottenere una sospensione con una concentrazione troppo elevata o insufficiente, e ciò richiede più tentativi prima di riuscire ad ottenere il valore richiesto dall'esame.

Parlando dei tempi di 'analisi si può notare immediatamente la discrepanza tra i tempi necessari per l'identificazione MALDI-ToF e quelli necessari per l'identificazione Vitek. La prima metodica impiega circa 10-15 minuti di analisi dal momento in cui la piastrina viene caricata,. Questa tempistica dipende da vari fattori, come la presenza di altre piastrine in fase di analisi e dalla quantità di spot allestiti. Generalmente per ogni spot lo strumento impiega circa 15 secondi per una singola identificazione, fino ad un massimo di tre ripetizioni nel caso invece di mancata identificazione, per un totale massimo di 45 secondi. L'identificazione Vitek necessita, al contrario, tra le 4 e le 18 ore di lavorazione. Ciò dipende dal fatto che questa metodica richiede un'incubazione precedente all'analisi dei profili biochimici dei batteri in esame, così da poter fornire un risultato; mentre l'identificazione MALDI-ToF analizza caratteristiche intrinseche nella composizione del microrganismo, ossia il profilo proteico batterico.

Nello specifico si può notare come il risultato dell'identificazione Vitek per il ceppo "Ent-22" abbia impiegato 10 ore per avere un riscontro negativo, in quanto il sistema non è stato in grado di discriminare il microrganismo. Se si fosse proceduto con una ripetizione dell'analisi, i tempi di attesa dell'identificazione sarebbero stati di almeno 5 ore. Utilizzando l'identificazione MALDI-ToF, nell'arco circa di 30 minuti, si riesce ad ottenere dallo strumento un risultato negativo d'identificazione, allestire nuovamente un nuovo spot d'identificazione ed eseguire nuovamente l'analisi ed ottenere un nuovo risultato. Se si confrontano i risultati ottenuti dalle due identificazioni, si può notare una forte discrepanza tra i dati ottenuti dall'identificazione MALDI-ToF e i dati ottenuti dall'identificazione Vitek.

Nel primo caso, i risultati sono precisi ed accurati, il genere e la specie sono sempre forniti con estrema precisione L'unica incertezza dello strumento che si è rilevata è legata alla sottospecie, che spesso non riesce a distinguere approfonditamente.

I risultati forniti dallo strumento Vitek, nonostante siano estremamente affidabili, si presentano anche molto generici. Lo strumento Vitek, in quasi tutti i casi presi in esame, ha fornito il genere del microrganismo, ma non è stato in grado di discriminare la specie fra un gruppo di specie geneticamente simili tra loro.

Pur osservando la limitazione nella precisione dell'identificazione tramite Vitek, è doveroso segnalare che dal punto di vista clinico la differenziazione di specie non è una discriminante terapeutica: la scelta dell'antibiotico da somministrare non viene modificata a seconda della specie di *Enterobacter* riscontrata, ma si basa piuttosto sulle caratteristiche degli antibiogrammi. Dal punto di vista epidemiologico, invece, la possibilità di discriminare la specie precisa e, in larga parte, anche la sottospecie rappresenta un valido aiuto nella ricostruzione della prevalenza e dell'epidemiologia delle infezioni sostenute da questi germi.

Prendendo in esame tutte le considerazioni fatte fin ora sulle due metodologie d'identificazione, si può concludere affermando che l'identificazione MALDI-ToF è nettamente migliore rispetto all'identificazione Vitek, sia per il tempo impiegato nell'allestimento e nell'analisi, sia nei risultati forniti dalla metodologia.

Queste caratteristiche hanno decretato il successo della tecnologia MALDI-ToF, il cui successo è dimostrato dalla diffusione di questa tecnologia nei laboratori di microbiologia.

Ad oggi, il MALDI-ToF rappresenta il gold standard per l'identificazione microbica e la sua introduzione nella pratica clinica ha rappresentato un punto di svolta epocale nell'identificazione microbica e nella riduzione dei tempi di "turn around time" della fase analitica microbiologica.

6. BIBLIOGRAFIA

1- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pagès, J. M. (2019).
Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance.
Clinical microbiology reviews, 32(4), e00002-19.
https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19

2- Nimmana, B. K., & Tobin, E. H. (2025).
Enterobacter Infections. In StatPearls. StatPearls Publishing.

3- Arbefeville, S. S., Timbrook, T. T., & Garner, C. D. (2024).
Evolving strategies in microbe identification-a comprehensive review of biochemical, MALDI-TOF MS and molecular testing methods.
The Journal of antimicrobial chemotherapy, 79(12 Suppl 2), i2–i8.
https://doi.org/10.1093/jac/dkae275

4- Isenberg H. D. (2003).
Clinical microbiology: past, present, and future.
Journal of clinical microbiology, 41(3), 917–918.
https://doi.org/10.1128/JCM.41.3.917-918.2003

5- Clark, A. E., Kaleta, E. J., Arora, A., & Wolk, D. M. (2013).
Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology.
Clinical microbiology reviews, 26(3), 547–603.
https://doi.org/10.1128/CMR.00072-12

6- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., & Virdi, J. S. (2015).
MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis.
Frontiers in microbiology, 6, 791.
https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00791

7- Chen, X. F., Hou, X., Xiao, M., Zhang, L., Cheng, J. W., Zhou, M. L., Huang, J. J., Zhang, J. J., Xu, Y. C., & Hsueh, P. R. (2021).
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Analysis for the Identification of Pathogenic Microorganisms: A Review.
Microorganisms, 9(7), 1536.
https://doi.org/10.3390/microorganisms9071536

8- Shrestha, P. M., Nevin, K. P., Shrestha, M., & Lovley, D. R. (2013).
When is a microbial culture "pure"? Persistent cryptic contaminant escapes detection even with deep genome sequencing.
mBio, 4(2), e00591-12.
https://doi.org/10.1128/mBio.00591-12

9- https://www.biomerieux.com/corp/en/education/resource-hub/pharma-quality-control/scientific-library/mass-spectrometry-maldi-tof-species-level-identification.html

10- https://www.biomerieux.com/us/en/our-offer/clinical-products/vitek-ms-reagents-accessories.html

11- https://www.biomerieux.com/content/dam/biomerieux-com/03----our-offer/clinical/in-hospital--in-lab/products/vitek-2/documents/VITEK2-ID-AST-Cards.pdf