



**UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**INFECTION CONTROL E ANTIMICROBIAL
STEWARDSHIP:
UTILITÀ E LIMITI DEGLI SCREENING PER
GERMI MULTIRESISTENTI**

**INFECTION CONTROL AND
ANTIMICROBIAL STEWARDSHIP:
BENEFITS AND LIMITS OF SCREENING
TESTS FOR MULTIDRUG-RESISTANT
GERMS**

Tesi di:
Alessia Galeazzi

Relatore:
Dott.ssa Barbara Pieretti

Anno accademico 2021/2022

INDICE

1. Introduzione.....	pag. 3
2. Scopo della tesi.....	pag. 4
3. Le infezioni correlate all'assistenza.....	pag. 5
3.1. I patogeni implicati.....	pag. 10
3.2. La sorveglianza.....	pag. 15
4. Il ruolo del laboratorio nella gestione delle infezioni correlate all'assistenza.....	pag. 20
5. Gli Screening dei microrganismi multiresistenti.....	pag. 22
5.1. Linee guida nazionali e internazionali.....	pag. 25
5.2. Tipologia di prelievo e sedi di prelievo raccomandate.....	pag. 28
5.3. Caratteristiche carbapenemasi.....	pag. 31
6. Epidemiologia dei batteri multi-resistenti nell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord.....	pag. 34
7. Materiali e Metodi.....	pag. 42
7.1. Modalità di esecuzione del prelievo.....	pag. 42
7.2. Caratteristiche dei terreni cromogeni e selettivi utilizzati.....	pag. 45
7.2.1. Chromatic CRE.....	pag. 45
7.2.2. Chromatic Detection.....	pag. 47
7.2.3. Chromatic MRSA.....	pag. 49
7.2.4. MacConkey Agar.....	pag. 50
7.2.5. Columbia CNA Agar.....	pag. 51
7.3. Modalità di trattamento e semina del campione.....	pag. 53
7.3.1. Test rapido per la classificazione delle carbapenemasi.....	pag. 53
7.3.2. Vitek 2.....	pag. 55
7.3.3. EUCAST breakpoints.....	pag. 56
8. Risultati.....	pag. 68
9. Discussione.....	pag. 77
10. Conclusioni.....	pag. 79
11. Bibliografia e link utili.....	pag. 81

1. Introduzione

Epidemiologia è definita come lo studio dei fattori determinanti eventi di malattie nella popolazione. È uno strumento indispensabile per caratterizzare le malattie infettive nelle istituzioni mediche, comunità, regioni, per determinare la relazione esposizione-malattia nelle persone e le modalità di acquisizione e diffusione di tutte quelle malattie difficili da trattare, contenere e prevenire.

Clinici, microbiologi e il personale coinvolto utilizzano metodi epidemiologici per la sorveglianza di infezioni, indagini di epidemie, identificare fattori di rischio per definire misure di controllo e prevenzione.^[1]

Infection control è un termine utilizzato per indicare quello che è il potenziale uso di metodi epidemiologici negli ospedali per lo studio e la sorveglianza di epidemie.

Tuttavia, attualmente, il Sistema Sanitario ha deciso di estendere i modelli di trattamento, sorveglianza e prevenzione anche a pazienti di cliniche, centri ambulatoristici, strutture a lunga degenza e ai domicili.^[1]

Come ci si può aspettare, le infezioni e le resistenze agli antibiotici fra i patogeni implicati si possono contrarre in qualsiasi tipo di assistenza.

Per questo motivo queste infezioni sono state denominate *Infezioni Correlate all'Assistenza*.

Un approccio indirizzato verso le infezioni correlate all'assistenza è l'*Antimicrobial Stewardship*, risultato della sinergia tra l'utilizzo degli antibiotici e il contrasto/diffusione alle infezioni ospedaliere causate da patogeni multi-resistenti.

È una strategia a livello nazionale/mondiale che ha lo scopo di contenere le resistenze agli antibiotici al fine di preservare la loro utilità ed efficacia in futuro, limitare i costi e contrastare la mortalità che esse provocano.

2. Scopo della tesi

Il presente studio è volto dimostrare che il fenomeno delle ICA (Infezioni Correlate all'Assistenza sanitaria, comprese quelle causate da alcuni *microrganismi alerts*) sebbene statisticamente possa risultare in linea con i dati riportati in letteratura, rappresenti per l'Azienda Ospedaliera Marche Nord un settore cruciale nelle politiche di gestione del rischio clinico.

Inoltre, i costi derivanti dalla sorveglianza e i test di screening scelti si sommano a quelli derivanti dal prolungamento dei tempi di degenza, dall'utilizzo di terapie antibiotiche di associazione e alla manodopera fornita dal personale infermieristico e tecnico.

Il lavoro di tesi si propone di valutare l'appropriatezza dell'utilizzo di test colturali di screening nella sorveglianza attiva al fine di contenere il fenomeno, attraverso un'analisi retrospettiva dei dati di laboratorio nei reparti ospedalieri dell'Azienda Ospedaliera Marche Nord all'interno di percorsi diagnostici condivisi.

L'*Infection Control* e l'*Antimicrobial Stewardship* sono strumenti importanti per limitare la diffusione delle infezioni e per il contenimento dei costi con lo scopo di migliorare la sicurezza nelle cure.

3. Le infezioni correlate all'assistenza

L'evoluzione dell'assistenza ospedaliera, volta a limitare quanto più possibile la degenza ai casi acuti ha portato allo sviluppo di forme di assistenza alternative quali Day Hospital, Day Surgery, e assistenza e interventi a livello ambulatoriale. Inoltre, c'è stato un grande sviluppo dell'assistenza a livello territoriale e molte procedure mediche ed infermieristiche oggi vengono effettuate a domicilio del paziente.

Queste “nuove forme di assistenza” possono rappresentare anch'esse una fonte di infezione per il paziente, per questo alla vecchia definizione di infezione ospedaliera si è sostituita quella di “health care-associated infection” (HAI) o “infezione correlate all'assistenza” (ICA), comprendendo peraltro anche le infezioni che possono essere contratte dagli operatori sanitari che lavorano a contatto con i pazienti.

La maggior parte delle infezioni correlate all'assistenza riguarda il tratto urinario (da sole rappresentano infatti il 35-45% del totale), cui seguono quelle del sito chirurgico, dell'apparato respiratorio e le infezioni sistemiche come sepsi e batteriemie; negli ultimi anni, tuttavia, si sta assistendo a un aumento di queste ultime e delle polmoniti.^[2]

Infezioni da contaminazione incrociata

Le infezioni da contaminazione crociata si verificano tra operatori sanitari e pazienti suscettibili alle infezioni comuni a causa della ridotta risposta immunitaria. Avviene un passaggio di patogeni tramite un contatto esterno che può essere il curante o un altro paziente e che può consistere dal semplice contatto con la cute contaminata o tramite presidi invasivi, e “auto inoculazione”, un tipo di trasmissione che prende in considerazione microrganismi che sono già presenti nel paziente ma in differenti regioni del corpo e dunque possono scaturire una problematica infettiva quando invadono regioni non di loro abitudine (un classico esempio è la contaminazione delle basse vie respiratorie che sono normalmente prive di considerevoli quantità di microrganismi con la flora abbondantemente presente a livello orofaringeo mediante un tubo endotracheale, di conseguenza non sono rare le polmoniti causate da *Streptococcus pneumoniae* presente nel nostro cavo orale). Quando si parla di suscettibilità si intende una situazione clinica di partenza che rende una persona particolarmente vulnerabile alle infezioni che possono essere trasmesse nelle strutture di cura e qui rientrano condizioni come diabete, insufficienza renale, età avanzata, presenza di patologie o condizioni congenite che

rendono le difese innate debilitate e la necessità di subire interventi chirurgici che possano abbassare le difese immunitarie.

Infezioni del flusso sanguigno associate a catetere centrale (CLABSI)

Ad esempio, infezioni del sito di inserzione del catetere, tromboflebite, sepsi ed *endocardite*; queste infezioni causano migliaia di complicanze e morti ogni anno, oltre che ingenti costi sanitari aggiuntivi. Il catetere venoso centrale è un dispositivo intravascolare che permette di avere un diretto accesso alla circolazione ematica in prossimità di vasi sanguigni di grosso calibro e il cuore; esso è un dispositivo ampiamente impiegato negli ambiti della chirurgia, terapia intensiva ed emodialisi.

In questi scenari l'infezione deriva dalla flora presente nel sito di inserzione del catetere, a livello cutaneo, che penetra all'interno del lume generando con facilità l'infezione.

I patogeni isolati con maggior frequenza dalle infezioni correlate ai dispositivi intravascolari comprendono in gran parte *Staphylococcus aureus* (di cui più del 50% risulta essere resistente all'antibiotico meticillina), enterococchi e candida.

Si sospetta una infezione di questo tipo quando principalmente si notano alterazioni nel sito di inserzione, come del rossore, sintomi di dolore e fastidio e altri segni come febbre in assenza di ulteriori possibili cause.

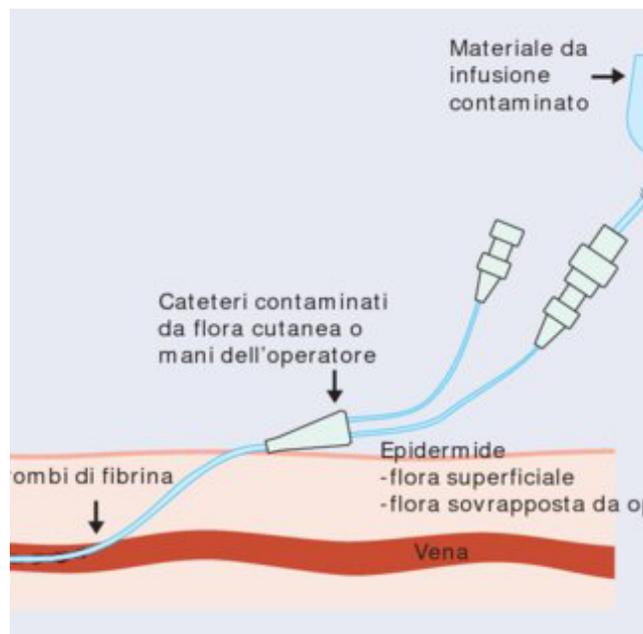


Figura 1. Cap. 3
<https://www.researchgate.net/publication/2593976>
64

La diagnosi viene confermata generalmente con il prelievo di sangue periferico da due zone distinte per colture microbiologiche, oltre che all'indagine microbiologica del catetere stesso che viene rimosso e analizzato. Il tipo di trattamento clinico previsto in caso di infezione dipende dal tipo di patogeno riscontrato mediante le analisi del sangue o dell'area infetta, ma prima di intervenire farmacologicamente è bene effettuare un elettrocardiogramma (ECG) per scongiurare un'eventuale presenza di endocardite, in quanto in circa un quarto dei pazienti con batteriemia da *S. aureus* correlata a dispositivi intravascolari si sono riscontrate, mediante ecocardiografia trans esofagea, evidenze di una endocardite. Tale esame diagnostico risulta dunque importante nel determinare il tipo e la durata del trattamento.

Infezioni del tratto urinario associate a catetere (CAUTI)

Si considera tale qualsiasi infezione a carico di una parte del sistema urinario, inclusi uretra, vescica, ureteri e reni. Queste sono il tipo più comune di infezioni correlate all'assistenza, con conseguenze significative per morbilità, mortalità e implicazioni finanziarie. I fattori di rischio più importanti per lo sviluppo di un'infezione del sito urinario associata a catetere possono essere l'uso dello stesso (prolungato e/o intervallato) e dal sito di inserzione del dispositivo (es. uretrale, sovrapubica o nefrostomica).^[1]

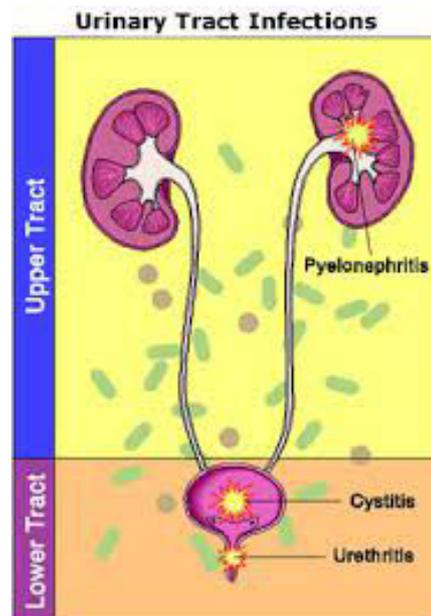


Figura 2. Cap. 3
Infezioni Del Tratto Urinario:
Diagnostica Microbiologica
Giovanni Di Bonaventura,
B.Sc., Ph.D. Università "G.
d'Annunzio", Chieti-Pescara

Le UTI si possono manifestare in situazioni endemiche e epidemiche, per questo motivo sono necessarie le giuste misure di sorveglianza e trattamenti antibiotici, in modo da evitare misure aggressive, per la loro prevenzione e identificazione.

La prevenzione delle UTI è una vera e propria sfida che diventa sempre più difficoltosa con il cambiamento dei pazienti ospedalizzati e ricoverati. Questi cambiamenti sono spesso elencati: l'aumento del numero di pazienti in età avanzata con malattie gravi e pregresse, l'emergenza di unità specializzate per la cura dei pazienti clinicamente malati, l'aumento dell'uso di numerosi dispositivi invasivi, l'aumento della popolazione immunocompromessa e immunosoppressa e sono in espansione gli interventi di trapianti d'organo.

Tutti questi fattori possono aver causato l'aumento di cateteri fissi e di conseguenza la suscettibilità del paziente cateterizzato a infezioni.

Al momento, anche in seguito all'utilizzo di strumenti di ultima generazione e all'avanguardia, i dispositivi risultano cronicamente infetti. Oltretutto, come risultato dell'uso esteso di agenti antimicrobici di largo spettro e di microrganismi patogeni multi-resistenti, pazienti affetti da UTI catetere-associate sono un perfetto *habitat* per questi ultimi.

I microrganismi maggiormente coinvolti provengono dalla flora endogena del paziente, specialmente dall'aera urogenitale e dal perineo, oppure tramite le mani del personale di cura durante l'inserimento del catetere o manipolazione nelle fasi successive.

I patogeni, per generare l'infezione, percorrono principalmente due vie per raggiungere la vescica e così scatenare l'infezione: si tratta della via extra luminale e quella intra luminale. Nel contesto extra luminale la contaminazione avviene durante l'applicazione o dalla flora presente già sulla cute circostante del paziente o dalle mani del personale curante che va a toccare la superficie esterna del presidio.

La via intra luminale è contaminata quando i microrganismi raggiungono la vescica tramite le sacche di raccolta contaminate a causa dell'impiego di materiale non adeguato, non ermeticamente accordato o quando si effettuano lavaggi del catetere tramite procedure noncuranti delle norme igieniche di base.

Nel caso fosse sospetta una infezione delle vie urinarie è opportuno eseguire delle indagini diagnostiche al fine di appurare l'eventuale presenza di patogeni, come l'analisi in laboratorio delle urine e la presenza di criteri sintomatologici come la febbre.

Il patogeno più comune che viene riscontrato è l'*Escherichia coli*, oltre che ad enterococchi e candida^[1].

L'utilizzo di farmaci antibiotici è un'opzione largamente diffusa nel contrastare queste infezioni ma l'aspetto che purtroppo nasce di conseguenza è anche una sorta di aiuto nella diffusione di batteri resistenti agli antibiotici.

Infezioni del sito chirurgico (SSI)

Le infezioni del sito chirurgico si verificano entro 30-90 giorni dopo un qualsiasi intervento chirurgico in cui ci sia stata incisione della cute. Le infezioni del sito chirurgico comportano una significativa morbilità, alti tassi di mortalità e costi assistenziali.

Il sito chirurgico è distinto in incisionale e organo/spazio. Per sito chirurgico incisionale superficiale si intende un'incisione che riguarda lo strato sottocutaneo della pelle e si rimargina in un massimo di 30 giorni dall'operazione.

Il sito chirurgico incisionale profondo, invece, va ad intaccare gli strati più intimi quale il tessuto muscolare.

Il sito chirurgico organo/spazio riguarda qualsiasi parte del corpo, escluse quelle precedentemente citate, che sia stata esposta e/o manipolata durante un'operazione.

Il rischio di sviluppare un'infezione del sito chirurgico è influenzato dal grado di contaminazione microbiologica del sito di intervento.

La classificazione accettata dal *National Research Council* è la seguente^[1]:

Clean sites (ferite pulite): sono tutti questi siti chirurgici privi di infiammazione.

Clean-contaminated sites (ferite pulite-contaminate): sono delle ferite operatorie che riguardano apparati specifici come il tratto biliare, l'appendice, la vagina e l'orofaringe, tutti siti nei quali è presente una flora batterica ma senza evidenze di infezione o contaminati da germi inusuali.

Contaminated sites (ferite contaminate): in questa categoria rientrano anche delle ferite accidentali e da trauma; in ogni caso questo tipo di ferite presentano un'infiammazione non purulenta. La contaminazione deriva da urine infette o bile infetta, addirittura da versamento peritoneale.

Dirty and infected sites (ferite sporche e infette): include le ferite da trauma, l'ingresso di corpi estranei o ferite con contaminazione fecale. Il sito chirurgico che rientra in questa categoria produce del pus e quindi è infetto.

I patogeni protagonisti delle SSI sono i medesimi da decenni: lo *Staphylococcus aureus* e gli stafilococchi coagulasi-negativi continuano ad essere i più assidui sebbene negli ultimi anni sono stati isolati anche numerosi gram-negativi (*E. coli*, *K. pneumoniae* resistente alla terza generazione di cefalosporine, *A. baumannii* resistente ai carbapenemi).

Polmonite associata a ventilatore

L'infezione polmonare si sviluppa nei soggetti ventilati artificialmente tramite il trasferimento degli agenti patogeni nei polmoni attraverso il tubo endotracheale. È la seconda infezione correlata all'assistenza più comune nelle unità di terapia intensiva.

I patogeni maggiormente responsabili alle infezioni delle vie respiratorie associate a ventilazione sono: *Staphylococcus aureus*, seguito da *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Acinetobacter baumannii complex* ed *Escherichia coli*.

È importante riconoscere che, molti di questi germi hanno origine endogena, significa che presumibilmente già colonizzavano il tratto respiratorio al momento dell'intubazione (*Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*).^[1]

3.1. I patogeni implicati

Nei laboratori di Microbiologia clinica si ricercano un'infinità di batteri, quelli elencati sotto rappresentano i principali responsabili delle ICA più difficili da contrastare a causa della loro capacità di sviluppare antibiotico-resistenze.

Tra quelli considerati una priorità critica abbiamo *Acinetobacter baumannii complex*, *Pseudomonas aeruginosa* e le *Enterobacteriaceae* spp., questi batteri sono quelli che sviluppano la resistenza ai carbapenemi, inoltre alcune *Enterobacteriaceae* sono resistenti alle cefalosporine di terza generazione.

I batteri considerati una priorità alta sono *Enterococcus faecium* vancomicina-resistente e *Staphylococcus aureus* meticillina e vancomicina-resistente.

Acinetobacter baumannii complex

Acinetobacter baumannii è un coccobacillo gram negativo, le cui caratteristiche biochimiche principali sono quelle di essere:

- Non fermentante
- Catalasi positivo

- Ossidasi negativo
- Strettamente aerobio

Batteri del genere *Acinetobacter complex* sono ubiquitari, ma gli isolati di specie *A. baumannii complex* sono quasi esclusivamente di origine ospedaliera. In questi ambienti, *A. baumannii complex*, può essere un patogeno opportunista e causare infezioni anche gravi in individui già immunocompromessi. Una delle caratteristiche principali che si ritiene essere in grado di favorire la colonizzazione di superfici da parte di *A. baumannii complex* è la sua più volte riportata capacità di resistenza in ambienti secchi e ostili.

In terreni solidi, la maggior parte dei ceppi di *A. baumannii complex*, presentano colonie piatte e opache. La dimensione delle colonie di questo batterio è in genere ridotta rispetto a quelle formate da ceppi di Enterobatteriaceae. Diversi ceppi possono anche produrre delle capsule, che rendono le colonie tipicamente più “mucose”. Su MacConkey Agar le colonie si presentano pallide e non lattosio-fermentanti.

Acinetobacter baumannii è responsabile di circa il 10% di tutte le infezioni correlate all’assistenza.

La problematica principale relativa a queste infezioni è l’elevato numero di isolati antibiotico-resistenti, caratteristica molto spiccata in questo patogeno. Le infezioni più gravi causate da *A. baumannii* in genere riguardano polmoniti e batteriemie in pazienti in terapia intensiva. Oltre a ciò, possono presentarsi endocarditi, meningiti, infezioni della pelle e del tratto urinario [3].

Pseudomonas aeruginosa

I membri del genere *Pseudomonas* sono microrganismi ubiquitari, che si trovano in diversi ambienti:

- Suolo
- Acqua
- Materia organica in decomposizione
- Vegetazione
- Cibo
- Lavandini
- Toilette
- Strofinacci del pavimento

P. aeruginosa è un batterio molto virulento, tuttavia generalmente non è in grado di portare a serie patologie nei soggetti con sistema immunitario sano. Questo batterio si presenta come un bacillo dritto o leggermente ricurvo, di dimensioni ridotte, circa 0.5 – 1.0 µm per 1.5 – 5 µm, ed inoltre è:

- Gram negativo
- Aerobio/anaerobio facoltativo
- Mobile (presenta fino a 3 flagelli unipolari)
- Asporigeno
- Presenta citocromo ossidasi
- Non fermentante
- Metabolismo ossidativo

P. aeruginosa tipicamente produce pigmenti idrosolubili che si diffondono attraverso il mezzo. I più noti sono la piocianina (blu-verde), la pioverdina (giallo-verde, fluorescente) e la piorubina (rosso-marrone, prodotto da una piccola percentuale di ceppi).

P. aeruginosa viene spesso identificata in via preliminare dal suo tipico odore dolciastro, simile a quello del mosto.

Sebbene sia necessaria un'atmosfera aerobica per una crescita ottimale, molti ceppi si moltiplicano in un ambiente anaerobico (anche se lentamente); è in grado di crescere a 42 °C.

P. aeruginosa è un agente patogeno opportunistico che infetta ustioni, ferite, incisioni chirurgiche e siti di cateterizzazione. È la causa più comune di infezioni da ustioni e infezioni dell'orecchio esterno (otite esterna).

P. aeruginosa può causare diverse sindromi cliniche, come infezioni polmonari, infezioni della cute ustionata, infezioni delle vie urinarie, batteriemia, etc.

Gli *Pseudomonas* hanno esigenze nutrizionali semplici, crescono facilmente in comuni terreni di coltura, come Agar sangue e Agar MacConkey. La morfologia delle colonie combinata con i risultati dei test biochimici porta ad una preliminare identificazione dei ceppi isolati. *P. aeruginosa* presenta le seguenti caratteristiche:

- Cresce rapidamente
- Le colonie appaiono piatte con brodo diffuso
- Presenza di beta-emolisi

- Pigmentazione verde, causata dalla produzione dei pigmenti
- Odore dolciastro, simile al mosto

Nonostante sia relativamente facile identificare *P. aeruginosa* può rendersi necessario compiere più test biochimici per una esatta identificazione [3].

Klebsiella pneumoniae

Klebsiella pneumoniae è un batterio Gram-negativo, presenta una forma bastoncellare ed è il membro più importante del genere *Klebsiella*, da un punto di vista clinico.

Dalla *Klebsiella pneumoniae* viene estratta una glicoproteina efficace nel favorire la resistenza alle infezioni, denominata klebsprotina.

Klebsiella pneumoniae presenta le seguenti caratteristiche di base:

- Gram-negativo
- Non mobile
- Non sporigeno
- Catalasi: positivo
- Ossidasi: negativo
- Anaerobio facoltativo

Il genere *Klebsiella* produce un'abbondante capsula polisaccaridica, la quale è responsabile del tipico aspetto mucoso delle colonie sui terreni di coltura e della virulenza del microrganismo in vivo.

La polmonite da *Klebsiella* spesso provoca necrosi degli spazi alveolari, formazione di cavità e produzione di escreato striato di sangue.

Klebsiella pneumoniae si trova naturalmente nel terreno e circa il 30% dei ceppi può fissare l'azoto in condizioni anaerobiche. In generale, le infezioni da *Klebsiella* tendono a manifestarsi in persone con un sistema immunitario indebolito. Molte di queste infezioni si ottengono quando una persona è in ospedale per qualche altra ragione (un'infezione nosocomiale).

L'infezione più comune causata da batteri *Klebsiella* fuori dall'ospedale è la polmonite. Nuovi ceppi di *K. pneumoniae* resistenti agli antibiotici stanno comparando e si trovano sempre più come infezione nosocomiale. *Klebsiella* è al secondo posto dopo *E. coli* per le infezioni del tratto urinario nelle persone anziane. È anche un agente patogeno opportunistico per i pazienti con malattia polmonare cronica, patogenicità enterica, atrofia

della mucosa nasale e rinoscleroma. Le feci sono la fonte più significativa di infezione del paziente, seguita dal contatto con strumenti contaminati [3].

Enterococcus faecium

Batterio gram-positivo, *Enterococcus faecium* ha notevoli capacità di sopravvivenza, adattandosi a svariate condizioni ambientali. *E. faecium* è facilmente isolato in campioni di feci umane, quindi abitualmente è presente nell'intestino umano. Tale microrganismo solitamente si presenta in forma commensale, ma può trasformarsi in patogeno. La caratteristica più evidente dei cocci di questo genere è la forte resistenza agli antibiotici. Anaerobi facoltativi, dopo 24 ore si presentano con colonie lisce e grigiaste da 1 a 2 mm, dal margine netto su Columbia Agar. La maggior parte dei ceppi sono α -emolitici. Le colonie coltivate su McConkey hanno un colore tendente al rosa.

Enterococcus faecium è un microrganismo noto come VRE (*Vancomycin-resistant Enterococcus*) coinvolto in infezioni nosocomiali. Tali microrganismi sono spesso causa di infezioni del tratto urinario, endocarditi subacute, setticemie e batteriemie.

Gli ambienti ospedalieri sono in genere i luoghi di maggior trasmissione di codesti cocci; infatti, sono classificati tra i patogeni più temuti. A favorire l'infezione è sicuramente l'immunodepressione e la lungodegenza.

I sintomi sono correlati al tratto interessato. Nel caso di endocardite si manifesta febbre alta, mal di testa e brividi, mentre per infezioni del tratto urinario, disuria, pollachiuria, stranguria, ematuria, urine maleodoranti e febbre. La terapia può risultare molto lunga a causa della forte resistenza agli antibiotici [3].

Staphylococcus aureus

Gli stafilococchi sono cocci gram-positivi e catalasi-positivi, generalmente disposti in aggregati irregolari, a grappoli. L'habitat naturale in cui normalmente vivono gli stafilococchi è costituito dalla cute dei mammiferi.

Gli stafilococchi si possono distinguere in due specie, caratterizzate da colonie aurate (*Staphylococcus aureus*) e una da colonie bianche o non pigmentate (*Staphylococcus albus*).

Gli stafilococchi sono tradizionalmente considerati parte della famiglia delle *Micrococcaceae*.

In generale:

1. La produzione di catalasi distingue gli stafilococchi da molti altri cocci gram-positivi (come streptococchi ed enterococchi);
2. La produzione di coagulasi differenzia lo *S. aureus* dalle altre specie stafilococciche umane (stafilococchi coagulasi-negativi, *CoNS*);
3. Gli stafilococchi sono aerobi-anaerobi facoltativi;
4. Sono tipicamente alofili, potendo svilupparsi senza problemi in presenza di elevate concentrazioni saline;
5. Oltre che fra i più comuni commensali (soprattutto a livello cutaneo), gli stafilococchi sono tra i più frequenti patogeni dell'uomo.

L'aspetto delle colonie su un normale terreno solido di coltura può indirizzare verso una diagnosi appropriata. Le colonie di stafilococchi appaiono generalmente pigmentate, spesso emolitiche. La pigmentazione è dovuta alla produzione, nella maggior parte dei ceppi di *S. aureus*, di un pigmento carotenoide di colore variabile dal giallo oro al giallo-arancio.

Staphylococcus aureus provoca malattia mediante produzione di tossine e invasione diretta e distruzione dei tessuti. Sono soprattutto le tossine che, nel loro insieme, contribuiscono in modo marcato all'aggressività di certi ceppi particolarmente virulenti. A queste va aggiunta la capacità di *S. aureus* di sviluppare antibiotico-resistenze (es. MRSA), la quale ha un ruolo cruciale nel renderlo un patogeno di successo^[3].

3.2. La sorveglianza

La sorveglianza è una componente essenziale di programmi mirati a promuovere la qualità dell'assistenza e a ridurre il rischio di infezioni per i pazienti e per gli operatori sanitari: sia in Italia che in altri paesi è stato dimostrato empiricamente che la partecipazione a sistemi di sorveglianza attiva delle infezioni correlate all'assistenza si associa nel tempo alla riduzione dell'incidenza di infezioni.

A differenza di altre malattie infettive acquisite in comunità, le infezioni correlate all'assistenza non possono essere rilevate attraverso sistemi di notifica "passiva", ossia

tramite la segnalazione spontanea da parte del medico curante; l'inaccuratezza della notifica è infatti sostenuta da numerose evidenze sperimentali.

I sistemi di sorveglianza delle ICA si basano sull'utilizzo di dati amministrativi e su sistemi di sorveglianza attiva, con la collaborazione di referenti dei reparti interessati e di personale addetto al controllo delle infezioni; attualmente i sistemi di sorveglianza delle infezioni correlate all'assistenza si caratterizzano per il fatto di utilizzare in modo combinato fonti informative correnti, quali il laboratorio, l'archivio della farmaceutica, le schede di dimissione ospedaliera, e sistemi di sorveglianza attiva mirati a pazienti a rischio o a problemi specifici.

Un altro elemento da tenere in considerazione nell'attivazione dei sistemi di sorveglianza è che sempre più frequentemente l'assistenza viene prestata anche in ambiti diversi dall'ospedale, quali le strutture residenziali per anziani o l'assistenza domiciliare. Questi ambiti hanno caratteristiche organizzative molto diverse dall'ospedale per acuti, per cui i sistemi di sorveglianza devono necessariamente considerare queste specificità.^[2]

L'impatto epidemiologico si riflette in un aumento della morbosità e della mortalità associate alle infezioni causate da patogeni resistenti rispetto a quelle causate da patogeni sensibili, che è stato ampiamente documentato per vari tipi di infezioni (ad es. polmoniti, infezioni batteriemiche) e per vari tipi di patogeni resistenti (ad es. *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina – MRSA, *Pseudomonas aeruginosa* multi-farmaco resistente - MDR). Inoltre, in seguito al fallimento terapeutico o al mancato isolamento dei portatori all'interno delle strutture assistenziali, i pazienti rimangono contagiosi per un tempo più lungo, aumentando il rischio di diffondere microrganismi resistenti. Trattandosi spesso di pazienti fragili e/o anziani, la contagiosità rappresenta un ulteriore e importante elemento di attenzione.

In Europa, secondo i più recenti dati resi disponibili dallo European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), l'AMR risulta complessivamente in aumento in molti Paesi, anche se vi sono importanti differenze nelle proporzioni dei vari patogeni resistenti e nei trend osservati nei vari Stati Membri.^[4]

In Italia, secondo quanto rilevato anche dalla sorveglianza dell'AMR curata dall'ISS (AR-ISS), la resistenza agli antibiotici si mantiene tra le più elevate d'Europa, quasi sempre al di sopra della media.^[2]

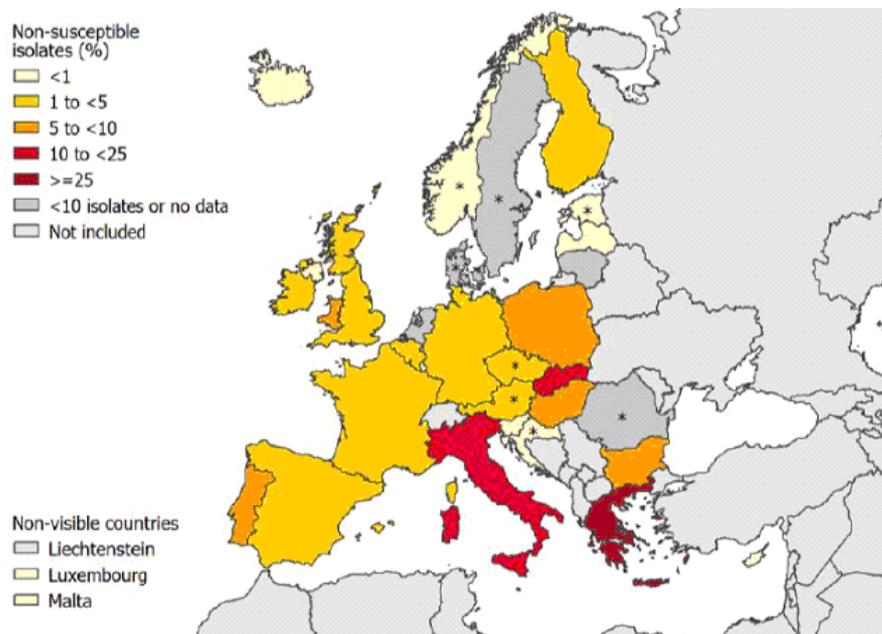


Figura 3. Cap.3

Gli antibiotici di ultima linea si stanno rivelando inefficaci: opzioni possibili per affrontare questa minaccia imminente per i pazienti e i sistemi sanitari – ECDC NOTA INFORMATIVA

La Tabella seguente riporta la frequenza e il trend nel tempo della resistenza a specifici antibiotici di alcuni microrganismi in Italia, rispetto alla media europea: il quadro che ne emerge sottolinea chiaramente l'entità del problema nel nostro Paese.

Tabella 1: Frequenza di resistenze in isolamenti da emocolture in Italia, dati EARS-net 2015 e trend 2006-2015

	Italia 2015 (%) (categoria) [§]	Media europea 2015 (%) (categoria) [§]	Trend 2012-15*
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
resistente a cefalosporine 3° generazione	55,9 (6)	30,3 (5)	>
resistente agli aminoglicosidi	34,0 (5)	22,5 (4)	
resistente ai carbapenemi	33,5 (5)	8,1 (3)	
MDR (R a cefalosporine di 3° generazione + aminoglicosidi + fluorochinoloni)	29,7 (5)	18,6 (4)	
<i>Escherichia coli</i>			
resistente a cefalosporine 3° generazione	30,1 (5)	13,1 (4)	>
resistente a fluorochinoloni	44,4 (5)	22,8 (4)	>
resistente agli aminoglicosidi	20,2 (4)	10,4 (4)	
MDR (R a cefalosporine di 3° generazione + aminoglicosidi + fluorochinoloni)	14,6 (4)	5,3 (3)	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
resistente a piperacillina-tazobactam	29,5 (5)	18,1 (4)	
resistente a ceftazidime	21,7 (4)	13,3 (4)	
resistente agli aminoglicosidi	17,2 (4)	13,3 (4)	<
resistente a carbapenemi	23,0 (4)	17,8 (4)	
<i>Acinetobacter spp.</i>			
resistente a carbapenemi	78,3 (7)	Non riportata	
<i>Staphylococcus aureus</i>			
resistente alla meticillina	34,1 (5)	16,8 (4)	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>			
NS alla penicillina	12,3 (4)	Non riportata	
NS ai macrolidi	24,5 (4)	Non riportata	<#
<i>Enterococcus faecium</i>			
resistente ai glicopeptidi (VRE)	11,2 (4)	8,3 (3)	>

Legenda

[§] Categoria 1: <1%; Categoria 2: 1% - <5%; Categoria 3: 5% - <10%; Categoria 4: 10% - <25%; Categoria 5: 25% - <50%; Categoria 6: 50% - <75%; Categoria 7: >= 75%

* > trend in aumento statisticamente significativo (# non statisticamente significativo se si considerano solo gli ospedali presenti da più tempo nel database); < trend in riduzione statisticamente significativo

NS: non sensibile

Figura 4. Cap. 3

Gli antibiotici di ultima linea si stanno rivelando inefficaci: opzioni possibili per affrontare questa minaccia imminente per i pazienti e i sistemi sanitari – ECDC NOTA INFORMATIVA

In particolare, è da evidenziare che:

- La proporzione di MRSA, anche se non in aumento, resta notevolmente elevata in Italia, che è ancora tra i pochi Paesi Europei con percentuali di MRSA superiori al 25%
- La proporzione di VRE, che si era ridotta in modo consistente negli anni precedenti, è tornata ad aumentare ed è nuovamente superiore alla media europea
- Estremamente elevata risulta la resistenza ai carbapenemi in *Acinetobacter complex*.
- Molto elevati sono i livelli di antibiotico-resistenza degli Enterobatteri (*K. pneumoniae* ed *E. coli*) ai principali farmaci di prima scelta per questi patogeni
- In *K. pneumoniae* si è osservato un drammatico aumento della resistenza ai carbapenemi, passata da meno dell'1% nel 2008 a oltre il 33% nel 2015.

La resistenza ai carbapenemi negli enterobatteri (principalmente *Klebsiella pneumoniae*, ma anche altre specie, quali *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.) è uno dei più gravi problemi, forse il più grave, di AMR emerso negli ultimi 10 anni. Gli enterobatteri resistenti ai carbapenemi (CRE) sono particolarmente problematici perché sono resistenti alla maggior parte degli antibiotici e hanno la capacità di diffondersi rapidamente nelle strutture sanitarie, grazie anche alla presenza di portatori che possono disseminare il patogeno pure in assenza di malattia^[4].

4. Il ruolo del laboratorio nella gestione delle infezioni correlate all'assistenza

Il laboratorio gioca un ruolo chiave per identificare *cluster* o infezioni sporadiche causate da microrganismi non comuni; il laboratorio deve conservare i microrganismi che hanno un significato epidemiologico potenziale e avere quindi un metodo strutturato di archiviazione dei ceppi qualora vi sia la necessità di rintracciarli velocemente.

Il Gruppo operativo Controllo delle infezioni (CO), insieme al laboratorio, dovrebbe decidere quali organismi conservare e per quanto tempo mantenerli in archivio.

Molti ospedali archiviano solo gli isolati provenienti da siti sterili (sangue e liquor).

Ogni laboratorio dovrebbe conservare i ceppi e rendere partecipi i dipartimenti clinici al fine di poter eseguire indagini epidemiologiche successive.

Gli ICI dovrebbero immediatamente segnalare al laboratorio un sospetto, un cluster o un *outbreak* e richiedere che tutti gli isolati rilevati siano conservati per eventuali ulteriori test.

Nel corso di indagini epidemiologiche vengono effettuati esami microbiologici sul personale o sull'ambiente per identificare una fonte comune o un serbatoio.

I Centers for Disease Control tradizionalmente scoraggiano questi esami a meno che, a priori, un'indagine epidemiologica non abbia fornito evidenze che una sorgente ambientale o il personale siano collegati all'*outbreak*.

Vi sono diversi motivi a supporto di ciò:

- I. può essere difficile, o impossibile, interpretare l'isolamento di microrganismi da superfici ambientali quali muri, pavimenti o rubinetti in quanto non esistono standard di riferimento sulla carica batterica e il tipo di microrganismi su queste superfici;
- II. le indagini di laboratorio (es. colture di sorveglianza estese) sono costose, consumano risorse di laboratorio e possono essere fuorvianti in assenza di studi epidemiologici attentamente condotti;
- III. il fatto che un lavoratore sia positivo per il microrganismo oggetto dello studio non necessariamente significa che il lavoratore sia la sorgente dell'epidemia. Il lavoratore potrebbe essersi colonizzato o infettato come risultato dell'epidemia e potrebbe non avere trasmesso il germe ad altre persone.

L'indagine epidemiologica dovrebbe portare alla formulazione di ipotesi sulla fonte e il serbatoio di infezione. Può essere utile effettuare colture di sorveglianza se l'epidemia è sostenuta da un patogeno inusuale, se la morbilità o mortalità associate sono significative, se le misure di controllo non sono efficaci a controllare l'epidemia, se si vogliono pubblicare i risultati. Se vengono effettuate le colture di sorveglianza, gli isolati devono essere tipizzati per determinare se i ceppi sono correlati tra di loro.

Quando si conduce un'indagine epidemiologica o si fanno colture di sorveglianza, si devono tenere in considerazione le competenze e le risorse del laboratorio.

Per quanto riguarda la raccolta dei campioni se si è deciso di eseguire colture di pazienti o dell'ambiente, il laboratorio deve aiutare nella scelta di appropriati

- campioni e terreni di coltura,
- siti da campionare,
- metodi di prelievo,
- metodi di trasporto e conservazione.

5. Gli Screening dei microrganismi multiresistenti

La diffusione degli stiptiti di batteri MDR potrebbe divenire esplosiva soprattutto a causa di un loro riconoscimento subottimale.

Dinanzi a un panorama così critico è imperativo mettere in atto da subito sette interventi, secondo le indicazioni gestionali approvate dal Simpios^[5]:

1. accurata diagnosi microbiologica:
 - corretta esecuzione dei test di sensibilità da parte del Laboratorio di Microbiologia;
 - refertazione “interpretata” dei risultati fenotipici
2. immediata notifica
 - immediata notifica dei casi di infezione da enterobatteri resistenti ai carbapenemi o portatori di geni di resistenza (di seguito, MDR-E) ai Reparti, alle strutture/professionisti dedicati al controllo delle infezioni nelle organizzazioni sanitarie e alla Direzione Sanitaria;
3. avvio di un programma di sorveglianza
 - sorveglianza basata sugli isolamenti da campioni clinici; non ci sono infatti per ora indicazioni per l’effettuazione di sorveglianze attive (ricerca dei colonizzati);
 - a fronte di casi di isolamento di MDR-E: indagini retrospettive nell’archivio microbiologico per verificare se nei 6-12 mesi precedenti si fossero verificati altri casi, sfuggiti all’attenzione degli operatori sanitari.
4. esecuzione delle indagini colturali per la ricerca dei colonizzati seminando su terreno solido o liquido;
5. corretta prescrizione di antibiotici
 - più in generale, nella pratica clinica, è opportuno promuovere e attuare a livello di ogni ospedale programmi di politica degli antibiotici (antimicrobial stewardship), che costituiscono una componente chiave per un approccio integrato alla prevenzione delle resistenze. Essa implica la corretta indicazione alla terapia antibiotica, la scelta della molecola e la prescrizione di dosi e modalità di somministrazione ottimali e durata appropriata, il che porta a minimizzare gli effetti tossici e le condizioni che favoriscono la selezione di ceppi resistenti. Riteniamo che, data

l'importanza della diffusione di questi germi multi-resistenti, sia imperativo che in ogni ospedale si organizzino programmi di *Antimicrobial Stewardship*;

6. adozione di misure di prevenzione nell'assistenza al malato/colonizzato, come da indicazioni per la sorveglianza e il controllo delle infezioni da enterobatteri MDR-E del documento proposto dai CDC statunitensi:
 - adozione delle precauzioni standard (l'igiene delle mani in particolare, ma non solo) per prevenire la trasmissione tra malati: tali misure sono da applicare nell'assistenza a tutti i malati, consapevoli che non è sempre possibile riconoscere i pazienti colonizzati da MDR-E anche in presenza di programmi di sorveglianza attiva;
 - implementazione delle precauzioni da contatto sino alla dimissione del paziente, anche nel caso di successivi controlli microbiologici negativi.

Tali precauzioni sono dirette ad impedire la trasmissione diretta o indiretta di batteri che possono essere trasmessi da malato a malato, direttamente o tramite le mani degli operatori o l'ambiente contaminato. Ne consegue l'importanza di ricoverare in camera singola i malati colonizzati o infetti da batteri resistenti ai carbapenemici, o in alternativa raggrupparli, affidandoli a personale dedicato (*cohorting*). Il personale e i visitatori dovranno indossare guanti e sovracamice ogni volta che entrano nella stanza e toglierli quando escono. Dovranno essere utilizzati dispositivi medici ed altri presidi monouso; quando non fosse possibile, lavarli e disinfettarli con soluzioni a medio/alto livello prima di utilizzarli su altri malati ricoverati. Assicurare la frequente (almeno tre volte al giorno) pulizia e disinfezione di superfici ed oggetti, in particolare in prossimità dell'ammalato.^[5]

Tutte queste misure sopraelencate devono essere attuate per assicurarsi una organizzazione sanitaria. È chiaro che, dove le risorse siano limitate, la scelta dello screening è rilevante. La ricerca del test di screening ottimale si basa principalmente su due fattori: l'efficienza clinica e i costi.

Il test di screening ottimale ha un'alta efficienza clinica e bassi costi, purtroppo ancora oggi i migliori test di rilevazione microbiologica hanno costi altissimi (test genotipici).

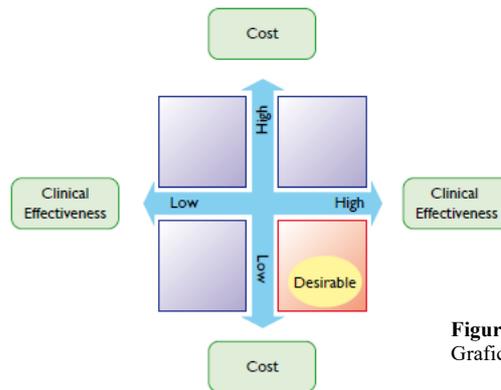


Figura 1. Cap. 5
Grafico costi e ricavi

Il compromesso scelto dalla maggior parte dei laboratori di Microbiologia Diagnostica è il test colturale, che è estremamente sensibile e ha dei costi bassi, ma il tempo di refertazione è tra i più lunghi.

5.1. Linee guida nazionali e internazionali

EUROPA

Nel corso del 2009 si è riunito a Lussemburgo il Consiglio Europeo con lo scopo di delineare una serie di raccomandazioni da dare ai paesi membri al fine di organizzare un buon sistema di controllo delle infezioni correlate all'assistenza. Secondo il Consiglio Europeo la prevenzione e il controllo delle ICA dovrebbero rappresentare una priorità in tema di sanità pubblica per tutte le istituzioni sanitarie dei Paesi Membri. Le principali raccomandazioni sono le seguenti^[6]:

- I. È necessario istituire dei sistemi di sorveglianza a livello regionale e nazionale
- II. È importante arrivare ad una standardizzazione dei dati con l'utilizzo di una comune terminologia e dei comuni indicatori
- III. È importante che ogni Paese adotti una strategia nazionale per l'uso corretto degli antimicrobici e che utilizzi dei sistemi informativi rapidi per la diffusione delle interazioni e delle allergie ai farmaci
- IV. È necessario incoraggiare la presenza all'interno delle strutture sanitarie di figure professionali specializzate nel controllo delle infezioni ed individuare i responsabili del piano di controllo
- V. È importante che vengano diffuse linee guida e protocolli di buona pratica tra gli operatori, e che questi vengano adeguatamente formati e aggiornati
- VI. È importante incoraggiare gli operatori a contribuire attivamente ai report di eventi avversi e al sistema di sorveglianza
- VII. È fondamentale coinvolgere sempre il paziente e i familiari nelle misure di controllo, informandoli dei comportamenti da tenere per limitare la diffusione delle infezioni.

ITALIA

In Italia l'organizzazione a livello nazionale si sviluppa principalmente sotto forma di leggi e decreti. Le prime direttive sulla gestione delle infezioni ospedaliere sono contenute nella circolare ministeriale 52 del 1985: "Lotta alle infezioni ospedaliere". In tale circolare viene raccomandato l'avvio di un programma di controllo delle infezioni in

ciascun presidio ospedaliero, che includa la costituzione di un Comitato multidisciplinare (il CIO), l'istituzione di un gruppo operativo e di personale infermieristico dedicato. Viene inoltre affidato alle Regioni il compito di coordinare le attività e di rinforzare i programmi di formazione professionale.^[7] Con la circolare ministeriale 8 del 1988: "Lotta alle infezioni ospedaliere: la sorveglianza" vengono definiti i criteri standardizzati per la definizione e la diagnosi dei diversi siti di infezione ospedaliera ed i metodi di sorveglianza, basati non solo sui dati del laboratorio, ma anche su sistemi di sorveglianza "attiva".^[8]

Il DPR 13 settembre 1988: "Determinazione degli standard del personale ospedaliero" Viene menzionato il Comitato di controllo delle infezioni ospedaliere, "al fine di accertare la qualità dell'assistenza sanitaria, per conferire maggiore professionalità agli atti tecnici essenziali".^[10] Nel DM 24 luglio 1995: "Contenuti e modalità degli indicatori di efficienza nel Servizio sanitario nazionale". GU. N. 263, 10 novembre 1995. Il ministero della Salute inserisce tra gli indicatori attraverso i quali viene misurata l'efficienza e la qualità delle cure erogate, il numero di casi di infezioni ospedaliere per mille dimissioni.^[9] L'altro capitolo importante che ha contribuito allo sviluppo della prevenzione delle ICA è l'Accreditamento. In Italia, infatti, il controllo delle ICA rientra tra i requisiti indispensabili per l'Accreditamento delle strutture.

Gli spunti per la realizzazione del Manuale per l'accreditamento sono stati tratti da vari documenti analoghi americani, australiani e canadesi, dal DPR 14 gennaio 1997 sui requisiti minimi per l'autorizzazione/accreditamento delle organizzazioni sanitarie ed infine dai vari resoconti delle migliori esperienze italiane nel campo delle ICA opportunamente discussi, dibattuti ed infine condivisi da un apposito gruppo di lavoro. Le prime leggi che introducono il termine di Accreditamento e di qualità in sanità sono la legge 502 del 1992 e la 517 del 1993. Successivamente il DPR 14 gennaio 1997 sancisce il problema dell'accreditamento, inteso di tipo autorizzativo e definisce i requisiti minimi assistenziali. La legge n. 419 del 30 novembre 1998 ribadisce la necessità di definire un modello di accreditamento rispondente agli indirizzi del Piano Sanitario Nazionale 1998- 2000, cioè che riduca le ICA del 25%. In questo PSN si fa espresso riferimento alle ICA delle vie urinarie, della ferita chirurgica, alle polmoniti postoperatorie o associate a ventilazione meccanica e alle infezioni associate a cateteri intravascolari. L'obiettivo di riduzione del 25% delle ICA doveva essere raggiunto con

l'avvio di un programma di sorveglianza, prevenzione e controllo delle ICA in ogni presidio ospedaliero, che focalizzasse l'azione sia sui pazienti che sugli operatori sanitari. Anche nelle "Linee di indirizzo regionali per la stesura del piano di Risk Management: gestione del rischio clinico e delle infezioni correlate all'assistenza" l'obiettivo primario è un programma di sorveglianza che deve concretizzarsi nella riduzione del rischio assoluto e relativo di acquisizione delle infezioni in ambito nosocomiale, attraverso interventi – rivisti dal Piano Annuale di Risk Management del 2018 – di:

- A. Sorveglianza epidemiologica delle ICA
- B. Sorveglianza ICA in Rianimazione
- C. Sorveglianza germi Alert
- D. Monitoraggio del consumo degli antibiotici e miglioramento dell'appropriatezza prescrittiva
- E. Revisione procedure
- F. Formazione degli operatori e Informazione alla utenza

Linee di indirizzo per la sorveglianza dei batteri multi-resistenti nelle Long-Term Care Facilities (LTCFs) italiane, proposte dal Gruppo di Lavoro per lo Studio delle Infezioni nelle Residenze Sanitarie Assistenziali e Strutture assimilabili (GLISTer) dell'Associazione Microbiologi Clinici Italiani (AMCLI).

La raccomandazione del Consiglio Europeo del 9 giugno 2009 sulla sicurezza dei pazienti, comprese la prevenzione e il controllo delle infezioni associate all'assistenza sanitaria, prevede quanto segue:

- a) esecuzione di indagini di prevalenza a intervalli regolari a livello non solo nazionale ma anche regionale,
- b) rilevazione, oltre che di dati di esito, anche di dati di processo e struttura per indirizzare le azioni di miglioramento,
- c) identificazione tempestiva di *alert organisms* e *cluster epidemici* a livello nazionale e loro segnalazione a livello europeo.

5.2. Tipologia di prelievo e sedi di prelievo raccomandate

Per un programma efficace di screening e sorveglianza è importante avere una visione sulla distribuzione dei siti di colonizzazione dei germi multiresistenti.

La letteratura riguardante questo argomento, purtroppo, è molto scarsa come gli studi che sono stati intrapresi.

Uno studio condotto in Olanda^[11] ha contestato l'eventualità di affidarsi al retto come unico sito di colonizzazione per ottenere colture per Gram-negativi produttori di ESBL.

Il risultato ottenuto è stato sorprendente, poiché hanno evidenziato che il 40% dei pazienti colonizzati risultava negativo al tampone rettale di follow-up. Questo potrebbe essere dovuto dalla perdita di colonizzazione o da un errore di campionamento.

È necessario monitorare la colonizzazione su altre sedi di campionamento quali l'apparato respiratorio (espettorato o broncoaspirato) e il tratto urinario (urinocoltura), infine per determinare la negativizzazione del paziente è sufficiente avere due colture negative del medesimo esame consecutive.

Avere un protocollo ben preciso e delineato è molto importante per monitorare e contenere l'andamento della colonizzazione e infezione da parte di germi multiresistenti. Durante un'*outbreak*, quando si eseguono colture speciali, è importante aumentare quanto più possibile la probabilità di isolare i microrganismi. I siti di prelievo dei campioni variano a seconda dei microrganismi di interesse.

- *S. aureus* (incluso MRSA): coltura di narici anteriori, ferite chirurgiche, decubiti e mani, emocolture;
- *Enterococcus* spp. (incluso VRE): coltura di tamponi rettali o coprocoltura;
- *E. coli* (incluso ESBL): urinocoltura o catetere urinario, broncoaspirato o ferita chirurgica;
- *Streptococcus pyogenes* (gruppo A Streptococchi): coltura di orofaringe o tamponi rettali;
- *S. pneumoniae*: lavaggio broncoalveolare o broncoaspirato, ricerca di antigeni solubili su urine;
- *Streptococcus agalactiae* (gruppo B Streptococchi): colture vaginali o rettali;
- *Clostridium difficile*: coprocoltura o coltura di tamponi rettali per l'isolamento del microrganismo; ricerca delle tossine A e B;
- *Morganella morganii*: lavaggio broncoalveolare^[11]

Alcuni metodi raccomandati per la raccolta dei campioni sono:

- coltura dalle narici anteriori: usare un tampone pre-umidificato con soluzione fisiologica sterile, inserire per 2 cm dentro le narici, ruotare il tampone contro la mucosa nasale;
- coltura rettale: inserire con molta attenzione il tampone per circa 2,5 cm dentro lo sfintere anale, ruotarlo delicatamente per campionare la cripta anale.
- coltura delle mani: prelievo per mezzo di piastre RODAC contact (replicate organism direct agar contact) contenente un mezzo colturale agarizzato idoneo allo sviluppo del microrganismo da ricercare.

Le modalità di esecuzione del prelievo devono essere rispettate alla lettera per evitare di tralasciare la zona colonizzata e raccogliere la maggior quantità di materiale possibile, utile per una corretta diagnosi.

Dopo aver isolato il/i microrganismo/i, il passo successivo è determinare se gli isolati appartengono allo stesso ceppo (ovvero se sono correlati geneticamente e quindi se possono provenire dalla stessa fonte).

Esistono due principali metodi di tipizzazione:

- il metodo fenotipico: usa caratteri espressi dal microrganismo;
- il metodo genotipico: esamina la struttura genetica di un organismo.

Metodi di fenotipizzazione:

- Biotipizzazione (profilo biochimico).
- Antibiogramma (pattern di resistenza).
- Sierotipizzazione (caratteri antigenici).
- Fagotipizzazione (sensibilità ai batteriofagi).
- Multilocus Enzyme Electrophoresis (varianti di enzimi metabolici).

Ampiamente usati per quanto riguarda biotipo, antibiotipo e sierotipo, di semplice esecuzione, poco dispendiosi, alla portata di tutti i laboratori, danno risposte immediate e forniscono informazioni preliminari; tuttavia, sono poco discriminanti e di solito insufficienti a documentare un'epidemia, anche perché batteri dello stesso ceppo mutano facilmente in seguito alla necessità di adattarsi a un ambiente e a causa della pressione selettiva degli antibiotici. Pertanto, si dovrebbe utilizzare il metodo genotipico che ha migliore potere discriminante rispetto al fenotipico.

Esistono metodi di genotipizzazione o metodi molecolari:

Metodi che non prevedono PCR:

- analisi del DNA plasmidico,
- analisi di restrizione de DNA cromosomico (REA),
- Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE),
- Ribotyping.

Metodi che prevedono PCR:

- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP),
- Arbitrarily Prymed PCR (AP-PCR),
- Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD),
- Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC).
- Sequenziamento dell'acido nucleico.

Tutte queste indagini molecolari servono per correlare come appartenenti o derivanti dallo stesso clone o per discriminare isolati della stessa specie, non distinguibili con metodi fenotipici. I metodi molecolari hanno una capacità discriminante in genere elevata, richiedono notevole esperienza di esecuzione, comportano costi elevati, strumentazioni specifiche, esecuzione laboriosa, tempi non immediati di risposta; in alcuni casi sono di difficile standardizzazione e talora di non semplice interpretazione. L'applicabilità di questi metodi risulta diversa a seconda del tipo di microrganismo.

5.3. Caratteristiche delle carbapenemasi

Le infezioni causate da organismi produttori di carbapenemasi (CPO) sono associate ad un rischio allarmante di mortalità. I geni codificanti per le carbapenemasi offrono una resistenza stabile e trasferibile, che rende possibile la diffusione per via clonale, ma anche per trasferimento orizzontale a batteri.

Sono enzimi in grado di idrolizzare l'anello penicillinico e rendere quindi l'antibiotico inefficace.

Le carbapenemasi oltrepassano ogni barriera geografica, attuare la prevenzione per CPO è un interesse significativo per la salute pubblica e per questo motivo richiede dei piani di coordinamento internazionali per il loro contenimento.

Distinguere i CPO dai Gram-negativi resistenti ai carbapenemi non per via di meccanismi mediati da carbapenemasi è cruciale perché i CPO di disseminano tra i pazienti più rapidamente dei non-CPO e assicura l'implemento di misure più intensive di *Infection Control* che potrebbero essere impiegate in assenza di produzione di carbapenemasi.^[12]

L'ECDC raccomanda ai laboratori clinici di considerare attivamente gli isolati da screening produttori di carbapenemasi e avvalersi dell'ECDC *surveillance* definita per le *Enterobacteriaceae* carbapenemi-resistenti.

Attualmente, la caratterizzazione del meccanismo di resistenza ai carbapenemi non viene svolta dalla maggior parte dei laboratori clinici di microbiologia al momento dell'assegnazione della terapia.

D'altro canto, capire se un organismo è produttore di carbapenemasi e, se lo fosse, la classe di carbapenemasi che produce ha delle implicazioni sulla terapia da intraprendere. Anche se, solo i risultati dei test di sensibilità agli antimicrobici sono per lo più sufficienti per la selezione di una terapia, la disponibilità di antibiotici, come la ceftazidima-avibactam o meropenem-vaborbactam, la cui attività è volta contro le carbapenemasi (es. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases [KPC]), ma non per altre (es. metallo- β -lattamasi [MBL], come il New Delhi metallo- β -lattamasi [NDM]),^[13] rende importante l'identificazione del meccanismo della carbapenemasi, nello specifico perché i test di sensibilità per nuovi agenti sono limitati.

Sfortunatamente, non esiste ancora un test di sensibilità che distingue i produttori i CPO dai non-CPO.

Le carbapenemasi sono comunemente caratterizzate usando la classificazione di Ambler.

Amber Class	A	B	C	D
Sito Attivo	Serina	Metalli (ponte zinco)	Serina	Serina
Enzima	TEM, SHV, CTX-M, KPC	NMD-1, IMP, VIM	AmpC, CMY	OXA
Organismi implicati	Fermentanti il lattosio e non-fermentanti	<i>Enterobacteriaceae</i> e non-fermentanti	<i>Enterobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> e non-fermentanti
Substrati	Ampicillina, cefamicina, penicillina, cefalosporine di 3° gen., cefalosporine a spettro esteso, carbapenemi	Tutte le β -lattamasi	Cefamicina, cefalosporine di 3° gen.	Cloxacillina, cefalosporine a spettro esteso, carbapenemi

KPC sono le carbapenemasi più comuni identificate in Europa e fanno parte della classe A delle carbapenemasi. Anche se sono solitamente presenti nelle *Enterobacteriaceae*, non sono esclusive in queste ultime ma possono essere occasionalmente identificate anche nella *Pseudomonas aeruginosa* o nell'*Acinetobacter baumannii complex*.

La classe B β -lattamasi (MBL) sono caratterizzate dalla necessità di ioni zinco nel loro sito attivo, che può essere d'aiuto durante la diagnosi, essendo chelante, come l'EDTA o il DPA inibisce l'attività dell'MBL legando lo zinco.

Tra le carbapenemasi più comuni di classe D c'è l'OXA-48, enzimi prodotti solitamente dalle *Enterobacteriaceae*, mentre OXA-23, OXA-40, OXA-58 e OXA-143 sono enzimi prodotti più di frequente da *A. baumannii complex*.

Altre carbapenemasi che appartengono a diverse varietà di classi molecolari (es. *Serratia marcescens* enzymes [SME] e Guiana β -lattamasi a spettro esteso [GES]) sono riportate sporadicamente.

Queste sono in generale specie-specifiche, probabilmente perché i loro geni corrispondenti sono cromosomici oppure plasmidici, limitando una disseminazione su larga scala.

Il range diverso di enzimi carbapenemasi contribuisce alla difficoltà della loro detenzione. I metodi utilizzati per riconoscere la classe di enzimi carbapenemasi sono numerosi, il primo tra questi è il test immunocromatografico, utilizzato maggiormente nel laboratorio di Microbiologia del presidio ospedaliero di Fano per una questione di praticità e costo ridotto.

È un test molto intuitivo con il quale è possibile differenziare gli enzimi partendo semplicemente da una colonia.

Altri metodi per individuare la presenza, e l'eventuale classe molecolare, delle carbapenemasi sono il Test di Hodge modificato, coltura su terreno cromogeno CRE e il Test di idrolisi.

6. Epidemiologia dei batteri multiresistenti nell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord

L'attività di sorveglianza epidemiologica svolta dal laboratorio di Microbiologia ha assunto una valenza sempre più significativa in ragione della diffusione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza e riveste oggi un ruolo fondamentale all'interno dei programmi di *Antimicrobial Stewardship*. L'Organizzazione Mondiale della Sanità, nel documento sulla prevenzione delle infezioni correlate all'assistenza, indica specificamente tra le responsabilità istituzionali del microbiologo l'elaborazione periodica di report finalizzati alla valutazione dei trend di sensibilità agli antibiotici^[14].

La valutazione periodica dei microrganismi isolati dalla coltura dei campioni biologici e del loro profilo di sensibilità agli antimicrobici rappresenta uno strumento fondamentale per monitorare il trend delle resistenze, fornendo così un supporto sia ai clinici, per la scelta ragionata dell'antibiotico-terapia empirica, sia a tutti i professionisti coinvolti nel controllo delle infezioni e delle antibiotico-resistenze, per l'individuazione delle azioni da adottare e per la valutazione della loro efficacia.

Il monitoraggio del trend delle resistenze nei principali microrganismi patogeni viene usualmente effettuato mediante rielaborazioni annuali secondo quanto dettagliato dal Clinical and Laboratory Standard Institute in uno specifico documento che contiene dettagliate indicazioni su come raccogliere, analizzare e presentare i dati^[15]. Indicazioni dettagliate in merito alla corretta elaborazione dei dati secondo il CLSI sono state riassunte dal gruppo di lavoro dell'Associazione Microbiologi Clinici in un manoscritto pubblicato nel 2015^[16] in cui sono riportate le seguenti e indicazioni:

1. preparare e diffondere la reportistica almeno una volta all'anno,
2. escludere dalle rielaborazioni gli isolati da coltura di sorveglianza,
3. includere unicamente specie con almeno 20-30 isolati,
4. indicare la strategia di calcolo adottata per l'eliminazione dei dati ripetuti,
5. elaborare i dati solo per gli antibiotici utilizzabili nei confronti della specie microbica considerata,
6. evitare *bias* generati dalle procedure di refertazione selettiva o mascheramento, dell'antibiogramma, o, quando questo non sia possibile, segnalarli chiaramente nel report,

7. a seconda delle necessità cliniche della realtà assistenziale, fornire dati stratificati o aggregati,
8. valutare la significatività statistica delle variazioni nelle percentuali di sensibilità e i relativi intervalli di confidenza,
9. diffondere i dati attraverso modalità informative efficaci (es. guide tascabili, pubblicazione online, ecc.),
10. organizzare incontri per presentare i dati ai professionisti maggiormente coinvolti (infettivologi, farmacologi, addetti al controllo delle infezioni).

Nel caso dell'Azienda Marche Nord i report vengono effettuati semestralmente e discussi una volta all'anno con i singoli dipartimenti e i professionisti coinvolti nelle strategie di *Antimicrobial Stewardship* in corsi specifici che coinvolgono tutti gli operatori sanitari.

In particolare, i dati vengono elaborati considerando:

- il numero di esami colturali risultati positivi sul totale degli esami richiesti, screening esclusi,
- la frequenza dei germi isolati espressa in numero assoluto e percentuale,
- la frequenza dei microrganismi suddivisi per reparto,
- la frequenza dei microrganismi suddivisi per sede di isolamento (es. urine, cateteri, emocolture, materiali respiratori, pus/ferite),
- la frequenza di enterobatteri produttori di ESBL o resistenti ai carbapenemi suddivisi per reparto,
- la frequenza di *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA distinti per sede di isolamento e reparto, sul totale degli stafilococchi isolati,
- la frequenza di *Staphylococcus spp* coagulasi negativi oxacillino resistenti e glicopeptidi resistenti distinti per sede di isolamento e reparto, su totale degli stafilococchi isolati,
- la frequenza di *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* resistenti ai glicopeptidi distinti per sede di isolamento e reparto,
- la frequenza di *Pseudomonas aeruginosa* MDR distinti per sede di isolamento e reparto, sul totale degli *Pseudomonas aeruginosa* isolati,
- i profili di antibiotico sensibilità per le specie più frequentemente isolate (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus spp* coagulasi negativi, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*

complex, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) relativamente alle molecole di rilevanza clinica con valutazione dello scostamento dei valori di MIC.

Di seguito si riportano alcuni esempi di reportistica epidemiologica.

Frequenza dei germi – numero assoluto e % anno 2020

	P.O FANO				P.O PESARO			
	I° semestre		II° semestre		I° semestre		II° semestre	
Germi	N	%	N	%	N	%	N	%
<i>Escherichia coli</i>	250	21,2	312	20,7	134	10,7	159	12,0
<i>Candida spp</i>	213	18,1	238	15,8	236	18,9	299	22,6
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	143	12,1	155	10,3	104	8,3	108	8,2
<i>Staphylococchi coagulasi negativi</i>	120	10,2	173	11,5	217	17,4	216	16,3
<i>Enterococcus faecalis</i>	78	6,6	86	5,7	64	5,1	64	4,8
<i>Staphylococcus aureus</i>	76	6,4	102	6,8	88	7,1	83	6,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50	4,2	139	9,2	61	4,9	93	7,0
<i>Proteus spp</i>	45	3,8	40	2,6			38	2,9
<i>Enterococcus faecium</i>	29	2,5	48	3,2	25	2,0	34	2,6
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>			63	4,2	172	13,8	39	2,9
<i>Enterobacter spp</i>					25	2,0	62	4,7
<i>Citrobacter spp</i>							30	2,3
Frequenza di isolamento <2%	175	14,8	154	10,2	122	9,8	98	7,4
Totale	1179	100	1510	100	1248	100	1323	100

Frekuensi mikroorganismi suddivisi per reparto anno 2020

P.O FANO					P.O PESARO				
	I° sem		II° sem			I° sem		II° sem	
Reparto	N	%	N	%	Reparto	N	%	N	%
Rianimazione	312	26,5	365	24,2	Rianimazione	502	40,2	577	43,6
Medicina Uomini	152	12,9	150	9,9	Medicina	179	14,3	207	15,6
Pronto Soccorso	119	10,1	227	15,0	Malattie Infettive	149	11,9	91	6,9
Dialisi	81	6,9	102	6,8	Ematologia Trapianti	62	5,0	71	5,4
Cardiologia	66	5,6	68	4,5	Medicina Urgenza	58	4,6	71	5,4
Lungodegenza	61	5,2			Chirurgia	55	4,4	112	8,5
Medicina 3	57	4,8	79	5,2	Pronto soccorso	54	4,3	2	0,2
Pneumologia Fano	52	4,4	52	2,9	Urologia	36	2,9	59	4,5
Gastroenterologia	53	4,5	85	5,6	Dialisi	26	2,1	17	1,3
Geriatrics	44	3,7	105	7,0	UTIC	25	2,0	27	2,0
Medicina Urgenza	38	3,2	48	3,2	Ortopedia	21	1,7	26	2,0
Ostetricia/Ginecologia	32	2,7			Neurologia	21	1,7	29	2,2
Intensita' di Cura	26	2,2	103	6,8	Neurochirurgia	16	1,3	14	1,1
Stroke	23	2,0	19	1,3	Ematologia	11	0,9	5	0,4
Oncologia	18	1,5	15	1,0	Oncologia	10	0,8	13	1,0
Medicina Donne	13	1,1	38	2,5	Ginecologia/Ostetricia	9	0,7		
Pediatria	10	0,8	20	1,3	Cardiologia	7	0,6	2	0,2
Nido	6	0,5	3	0,2	Pediatria	4	0,3		
Oculistica	5	0,4	12	0,8	Nido	3	0,2		
O.R.L.	4	0,3	5	0,3					
Psichiatria	3	0,3	4	0,3					
Utic Fano	3	0,3							
Scompenso	1	0,1							
Totale	1179	100	1510	100	Totale	1248	100	1323	100

Frequenza di microrganismi suddivisi per sede di isolamento anno 2020

P.O. FANO					
Sede di isolamento	Germe	I° semestre		II° semestre	
		N	%	N	%
RESPIRATORI I° sem = 234 isolati II° sem = 230 isolati	<i>Candida spp</i>	90	38,5	72	31,3
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	32	13,7	13	5,7
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25	10,7	12	5,2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23	9,8	58	25,2
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	18	7,7	36	15,7
	<i>Stenotrophomonas maltophil</i>	9	3,8	9	3,9
	<i>Escherichia coli</i>	6	2,6	5	2,2
	<i>Proteus mirabilis</i>	6	2,6	8	3,5
	<i>Citrobacter spp</i>	5	2,1		
	<i>Enterobacter cloacae</i>	5	2,1		
	<i>Serratia marcescens</i>			6	2,6
	Frequenza isolamento <2%	15	6,4	11	4,8
	URINE I° sem = 477 isolati II° sem = 671 isolati	<i>Escherichia coli</i>	180	37,7	231
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		72	15,1	88	13,1
<i>Candida spp</i>		68	14,3	100	14,9
<i>Enterococcus faecalis</i>		40	8,4	56	8,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		25	5,2	50	7,5
<i>Proteus spp</i>		24	5,0	24	3,6
<i>Enterococcus faecium</i>		20	4,2	26	3,9
<i>Enterobacter cloacae</i>		10	2,1		
<i>Morganella morganii</i>		10	2,1		
<i>Stafilococchi coagulasi negativi</i>				16	2,4
Frequenza isolamento <2%		28	5,9		
EMOCOLTURE I° sem = 320 isolati II° sem = 465 isolati		<i>Stafilococchi coagulasi negativi</i>	102	31,9	142
	<i>Escherichia coli</i>	40	12,5	57	12,3
	<i>Candida spp</i>	39	12,2	51	11,0
	<i>Enterococcus faecalis</i>	29	9,1	20	4,3
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	29	9,1	47	10,1
	<i>Staphylococcus aureus</i>	25	7,8	55	11,8
	<i>Proteus mirabilis</i>	9	2,8		
	<i>Streptococchi viridanti</i>	9	2,8	11	2,4
	<i>Enterococcus faecium</i>			20	4,3
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			19	4,1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>			11	2,4
	Frequenza isolamento <2%	38	11,9	32	6,9
	PUS/FERITE I° sem = 29 isolati II° sem = 43 isolati	<i>Stafilococchi coagulasi negativi</i>	10	34,5	4
<i>Escherichia coli</i>		6	20,7	3	7,0
<i>Streptococchi viridanti</i>		3	10,3	5	11,6
<i>Candida spp</i>		2	6,9		
<i>Enterococcus faecalis</i>		2	6,9	5	11,6
<i>Stenotrophomonas maltophia</i>		2	6,9		
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>		1	3,4		
<i>Enterococcus avium</i>		1	3,4		
<i>Klebsiella pneumoniae ssp</i>		1	3,4	2	4,7
<i>Proteus mirabilis</i>		1	3,4		
<i>Staphylococcus aureus</i>				14	32,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				5	11,6
<i>Enterobacter spp</i>				4	9,3
<i>Acinetobacter baumannii</i>				1	2,3

Frequenza degli enterobatteri ESBL + totali e frequenza delle specie principali anno 2020

P.O. FANO												
Reparti	I° semestre						II° semestre					
	N	%	ESBL	%	KPC	%	N	%	ESBL	%	KPC	%
Rianimazione	117	25,6	8	1,8	14	3,1	183	18,4	5	0,5	3	0,3
Pronto Soccorso	59	12,9	9	2,0			180	18,1	33	3,3	2	0,2
Dialisi Interni	45	9,8			1	0,2	103	10,4	1	0,1	1	0,1
Medicina Uomini	29	6,3	5	1,1			83	8,4	11	1,1	4	0,4
Medicina 3	26	5,7	3	0,7	1	0,2	36	3,6	3	0,3	2	0,2
Cardiologia	22	4,8	2	0,4			46	4,6	2	0,2		
Lungodegenza	21	4,6			3	0,7	22	2,2				
Gastroenterologia	20	4,4					51	5,1	5	0,5		
Medicina Urgenza	19	4,2	3	0,7			45	4,5	5	0,5		
Geriatrics	18	3,9	6	1,3	1	0,2	58	5,8	8	0,8	2	0,2
Ostetricia	14	3,1					33	3,3				
Pneumologia	14	3,1	1	0,2	2	0,4	23	2,3	1	0,1		
Oncologia	13	2,8					22	2,2				
Stroke	13	2,8	1	0,2			19	1,9	2	0,2		
Intensita' di Cura	11	2,4					47	4,7	7	0,7	2	0,2
Pediatria	9	2,0					21	2,1	1	0,1		
Psichiatria	3	0,7					5	0,5				
Otorino	2	0,4					2	0,2				
Medicina Donne	1	0,2					7	0,7	1	0,1	2	0,2
Scompenso	1	0,2					3	0,3				
Oculistica							3	0,3				
Totale	457	100	38	8,3	22	4,8	992	100	85	8,6	18	1,8

Germe	I° semestre				II° semestre			
	N	%	ESBL	%	N	%	ESBL	%
<i>Escherichia coli</i>	229	50,1	24	63,2	562	56,7	50	58,8
<i>Klebsiella pneumoniae ssp</i>	135	29,5	7	18,4	195	19,7	21	24,7
<i>Proteus mirabilis</i>	43	9,4	4	10,5	85	8,6	10	11,8
<i>Enterobacter cloacae</i>	17	3,7			33	3,3	2	2,4
<i>Morganella morganii ssp s</i>	11	2,4	2	5,3	22	2,2		
<i>Citrobacter spp</i>	9	2,0	1	2,6	35	3,5		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6	1,3			15	1,5		
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	0,9			17	1,7		
<i>Serratia marcescens</i>	3	0,7						
<i>Providencia stuartii</i>					6	0,6	1	1,2
<i>Hafnia alvei</i>					4	0,4	1	1,2
totale	457	100	38	100	992	100	85	100

Frequenza degli STAFILOCOCCI anno 2020

	P.O. FANO				P.O. PESARO			
	I° semestre		II° semestre		I° semestre		II° semestre	
	N	%	N	%	N	%	N	%
Stafilococchi oxacillino resistenti	74	37,7	104	37,8	150	49,1	186	62,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	18	24,3	18	17,3	20	13,3	27	14,5
Stafilococchi coagulasi negativi	56	75,7	86	82,7	130	86,7	159	85,4

Frequenza MRSA	P.O. FANO				Reparti	P.O. PESARO			
	I° semestre		II° semestre			I° semestre		II° semestre	
Reparti	N	%	N	%	Reparti	N	%	N	%
Rianimazione	6	33,3	4	22,2	Malattie Infettive Muraglia	4	20,0	2	7,4
Geriatria	3	16,7			Chirurgia Pesaro	1	5,0	3	11,1
Medicina uomini	2	11,1	3	16,7	Medicina Pesaro	1	5,0	4	14,8
Medicina urgenza	2	11,1			Urologia Pesaro	2	10,0	1	3,7
Cardiologia	1	5,6			Pronto Soccorso	1	5,0	2	7,4
Pneumologia	1	5,6	1	5,6	Neurochirurgia			1	3,7
Pronto soccorso	1	5,6	2	11,1	Medicina urgenza	3	15,0	3	11,1
Stroke	1	5,6			Ortopedia				
O.R.L.	1	5,6			Rianimazione	4	20,0	8	29,6
Medicina 3			2	11,1	Neurologia	2	10,0		
Ostetricia			1	5,6	Ematologia	1	5,0		
Pediatria			1	5,6	Emat. Trapianti	1	5,0	3	11,1
Scompenso			4	22,2					
Totale	18	100	18	100	Totale	20	100	27	100

**Profilo di antibiotico sensibilità per le specie più frequentemente isolate P.O. Fano
anno 2020**

Escherichia coli	I° semestre			II° semestre		
Antibiotici	N*	% Resistenza	MIC	N*	% Resistenza	MIC
Ciprofloxacina	235	50.90	0,25-4	286	36.02	0,06-4
Trimetop/sulfam	235	28.81	32- 256	286	33.33	32->256
Amox/clavulanico	235	31.08	2-32	286	31.33	2-32
Cefotaxime	235	36.22	1-64	286	26.43	0,25-64
Pipera/tazobactam	235	3.76	4-128	286	11.82	4-128
Ceftazidime	235	36.22	1-64	286	18.63	0,125-64
Gentamicina	235	21.51	1-16	286	20.59	1-16
Amikacina	235	1.08	2-32	286	2.94	1-32
Fosfomicina	235	0.64	16-256	286	0.98	16-256
Tigeciclina	235	0.56	0,5-8	286	0.00	0,5
Ertapenem	235	1.08	0,5-8	286	0.00	0,125-0.5
Meropenem	235	0.54	0,25-16	286	0.00	0,25-0.5

N*= numero antibiotici testati

7. Materiali e metodi

7.1. Modalità di esecuzione del prelievo

L'esecuzione del prelievo è detta fase preanalitica. In questa fase vengono ricomprese le attività (preliminari alla fase strettamente diagnostica) che riguardano, sostanzialmente, l'acquisizione del campione.

Il campione, sia che si tratti di liquidi biologici, tessuti o cellule è il punto di partenza di tutto l'iter diagnostico; va ricordato che dietro alla "produzione" o al ricevimento del campione è sempre prevista una richiesta clinica esplicitata formalmente.

La fase preanalitica consiste nel:

- A. verificare e raccogliere dei campioni biologici
- B. smistamento dei campioni
- C. eventuale trattamento e conservazione dei campioni biologici
- D. trasporto dei campioni biologici
- E. inserirli nel sistema gestionale

Questo processo può rappresentare il 50% dell'attività di laboratorio; è come se fosse un collo di bottiglia nell'attività di laboratorio, in quanto poco automatizzabile; rappresenta la fonte maggiore degli errori di laboratorio, è la maggior fonte dei rischi per il personale e per il paziente ed è una fase costosa perché viene eseguita manualmente.

Il prelievo costituisce uno dei momenti importanti della fase preanalitica; modalità non corrette di prelievo influiscono sullo stato del campione con il rischio di alterazione qualitativa dei germi da ricercare.

La fase di trasferimento del campione prelevato nei contenitori di raccolta (provette, barattolini ... altro) deve essere fatta in modo scrupoloso, osservando le corrette modalità ed impiegando i contenitori idonei; errori in questa fase possono rendere il campione inadatto alla successiva processazione analitica.

Assolutamente fondamentale la corretta ed univoca identificazione dei contenitori relativamente alle generalità dell'utente.

Altro passaggio fondamentale è la conservazione del campione in attesa che venga analizzato. A seconda del tipo di indagine da svolgere può essere necessario una temperatura diversa, così come può risultare necessaria l'aggiunta di sostanze conservanti o terreni di trasporto.

Anche il momento del trasporto dei campioni può prevedere criticità e quindi deve essere effettuato con la massima accortezza rispettando le indicazioni previste che variano in funzione del tipo di campione e delle indagini diagnostiche da svolgere.

Il momento dello smistamento dei campioni dal punto di arrivo alle singole unità/sezioni operative di laboratorio, che può essere più o meno automatizzato, deve risultare corretto: disguidi di consegna possono portare da ritardi dell'analisi fino all'inutilizzazione del campione.

La fase di inserimento dei dati del campione nel sistema gestionale del laboratorio è un momento delicato, errate informazioni fornite al sistema possono portare ad errori (anche molto gravi) di attribuzione dati all'utente o rendere impossibile svolgere l'analisi.

Ogni campione deve rispettare le modalità di prelievo come già elencate nei capitoli precedenti; pertanto, anche i campioni dedicati allo screening e alla sorveglianza devono rispettare dei requisiti per fornire la diagnosi più attendibile.

I test di screening che devono essere eseguiti negli ospedali per acuti e nelle altre forme di assistenza secondo l'ESCMID ^[17] sono:

- Tampone Nasale
- Tampone Rettale
- Urinocoltura
- Broncoaspirato
- Coprocoltura
- Tamponi Ferita
- Catetere.

Il tampone nasale è un test di screening che richiede una particolare attenzione: il personale deve essere adeguatamente formato poiché una esecuzione non corretta può alterare i risultati della diagnosi; infatti, è stato dimostrato sperimentalmente che le colture provenienti da tampone nasale risultavano differenti da parte della stessa équipe, su medesimi pazienti, prima e dopo un'accurata formazione.

- 1) Usare un solo tampone per entrambe le narici.
- 2) Il tampone va inserito nel vestibolo nasale, non nella parte più profonda, infatti, solo la parte cotonata del tampone deve essere a contatto con la mucosa nasale.
- 3) Applicare una gentile pressione. Il tampone si deve piegare leggermente.

- 4) Ruotare il tampone in senso circolare nel vestibolo nasale per 5 secondi circa. Ripetere il passaggio anche nell'altra narice.

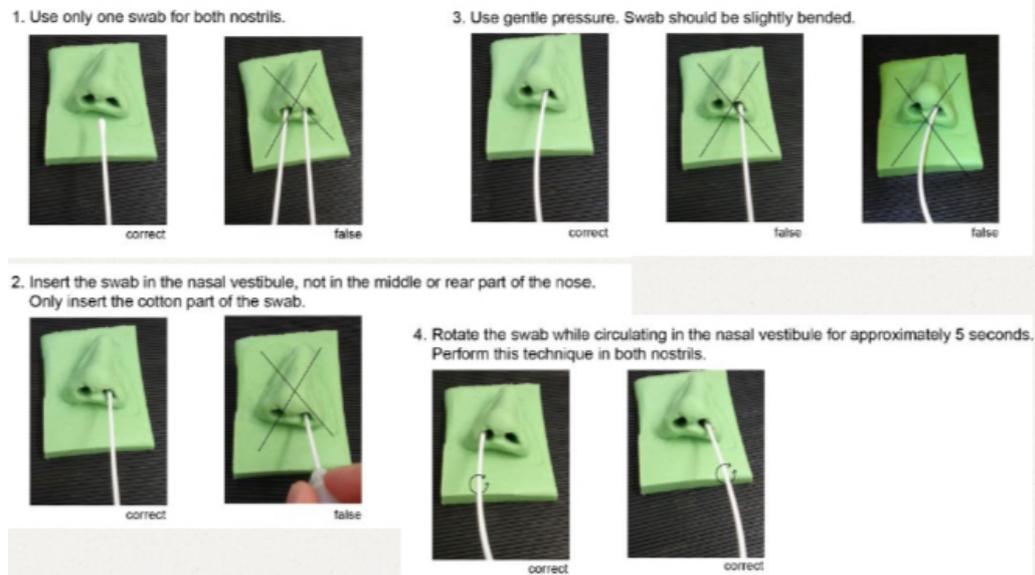
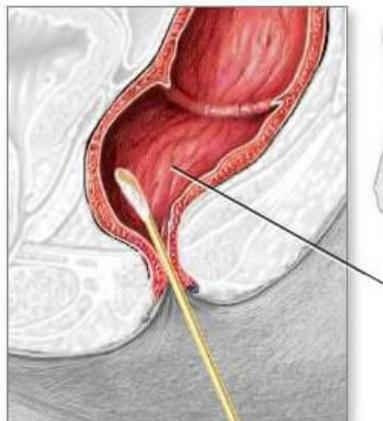


Figura 1. Cap. 7
February 2014 | Volume 9 | Issue 2 | e89667

Il tampone viene poi reinserto nell'apposito contenitore dove vi è già presente il gel di trasporto.

Il tampone rettale deve essere analogamente eseguito secondo la procedura corretta ovvero introducendo il tampone per la profondità di 2 cm circa nel retto attraverso lo sfintere anale e ruotare per raccogliere materiale fecale; successivamente posizionarlo nell'apposito terreno di trasporto.



Retto **Figura 2. Cap. 7**
Tampone rettale

Per quanto riguarda l'esame colturale delle urine e delle feci (urinocoltura e coprocoltura) è necessario che il materiale biologico venga direttamente prodotto all'interno del contenitore sterile dedicato per evitare contaminazioni. A differenza dell'esame chimico-fisico e morfologico delle urine, l'uricoltura non necessita la prima minzione del mattino. La raccolta dell'espettorato deve essere effettuata utilizzando l'apposito contenitore sterile con tappo a vite. Può essere richiesto di sciacquare la bocca con acqua prima di effettuare la raccolta e di non mangiare nelle 1-2 ore precedenti la raccolta.

7.2. Caratteristiche dei terreni cromogeni e selettivi utilizzati

7.2.1. Chromatic CRE

Chromatic CRE è un terreno cromogenico selettivo e differenziale utilizzato per la rilevazione qualitativa e presuntiva di *Enterobacteriaceae* (CRE) resistenti ai carbapenemi direttamente da campioni clinici.

Questo terreno è inteso come aiuto nella rilevazione dei seguenti batteri:

Escherichia coli e KES (*Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae complex* e *Serratia marcescens*) non sensibili ai carbapenemi.

Chromatic CRE non ha lo scopo di diagnosticare infezioni o guidare la terapia. I risultati possono essere interpretati dopo l'incubazione per 24 ore. La subcoltura su un terreno non selettivo è necessaria per confermare l'identificazione, e per effettuare i test di sensibilità antimicrobica o la tipizzazione epidemiologica.

Senza la necessità di passaggi preliminari di arricchimento, Chromatic CRE consente la diagnosi precoce della colonizzazione da parte di *Enterobacteriaceae* produttori di carbapenemasi (CPE), che è essenziale per il controllo delle infezioni da CPE e per prevenire la diffusione delle resistenze.

FORMULA TIPICA*	(g/litro)
<i>Peptoni 30.0</i>	30.0
<i>Mix Selettivo 11.0</i>	11.0
<i>Mix Cromogenico 1.0</i>	1.0
<i>Agar 15.0</i>	15.0
<i>pH Finale</i>	7.0 ± 0.2 a 25°

*Adattata e/o integrata per soddisfare le specifiche di performance richieste.

PRINCIPIO DEL METODO

I peptoni forniscono aminoacidi, azoto, minerali, vitamine e fattori nutritivi per la crescita dei microrganismi. Il mix cromogenico e selettivo facilitano l'identificazione dei batteri in base al colore e alla morfologia della colonia, inibendo la maggior parte delle non Enterobacteriaceae. L'agar è l'agente solidificante.

PROCEDURA DEL TEST

Inoculare il campione sul terreno con un tampone o un'ansa e strisciare per l'isolamento, usando un'ansa. Incubare le piastre in posizione capovolta (terreno rivolto verso l'alto) in aerobiosi a $35 \pm 2^\circ \text{C}$ per 24-48 ore.

Note:

Una mancanza di crescita o l'assenza di colonie di colore da rosa a rosso o da blu-viola a blu-verde su Chromatic CRE non preclude la presenza di *Escherichia coli* e KES non sensibili ai carbapenemi.

Devono essere eseguiti appropriati test di sensibilità, metodi molecolari o metodi fenotipici per confermare la presenza di isolati CPE.

LIMITAZIONI

Chromatic CRE è considerato come terreno di screening e non per l'identificazione finale dei batteri produttori di carbapenemasi [18].



Figura 3. Cap.7
www.liofilchem.com/chromaticcre

7.2.2. Chromatic Detection

Chromatic™ Detection è un terreno cromogenico utilizzato per il conteggio e l'identificazione dei microrganismi direttamente da campioni clinici e non clinici.

Il terreno permette di eseguire il test dell'indolo per la conferma di *Escherichia coli*.

FORMULA TIPICA	(g/l)
Peptone	14.0
Triptone	6.0
Estratto di lievito	3.0
Sodio Cloruro	5.0
Miscela Cromogenica	13.1
Agar	15.0
pH Finale	7.2 ± 0.2 a 25

PRINCIPIO DEL METODO

Peptone e triptone forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita degli organismi. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il sodio cloruro mantiene il bilancio osmotico del terreno. La miscela cromogenica permette di identificare i microrganismi sulla base del colore e della morfologia delle colonie. L'agar è l'agente solidificante.

PROCEDURA DEL TEST

Inoculare il terreno direttamente per striscio o spatolamento. Incubare a 35 ± 2°C per 18-24 ore in atmosfera aerobica.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione osservare il colore delle colonie ed interpretare i risultati come indicato nella tabella sotto^[18].

MICROORGANISMO	COLORE DELLE COLONIE TIPICHE
<i>E. coli</i>	Rosa-rossastro-malva
<i>Klebsiella spp, Enterobacter spp, Serratia spp</i>	Verde-blu
<i>Proteus spp</i>	Marrone
<i>Pseudomonas spp</i>	Giallastro-verde
<i>S. aureus</i>	Crema
<i>E. faecalis</i>	Verde-turchese
<i>S. saprophyticus</i>	Rosa chiaro

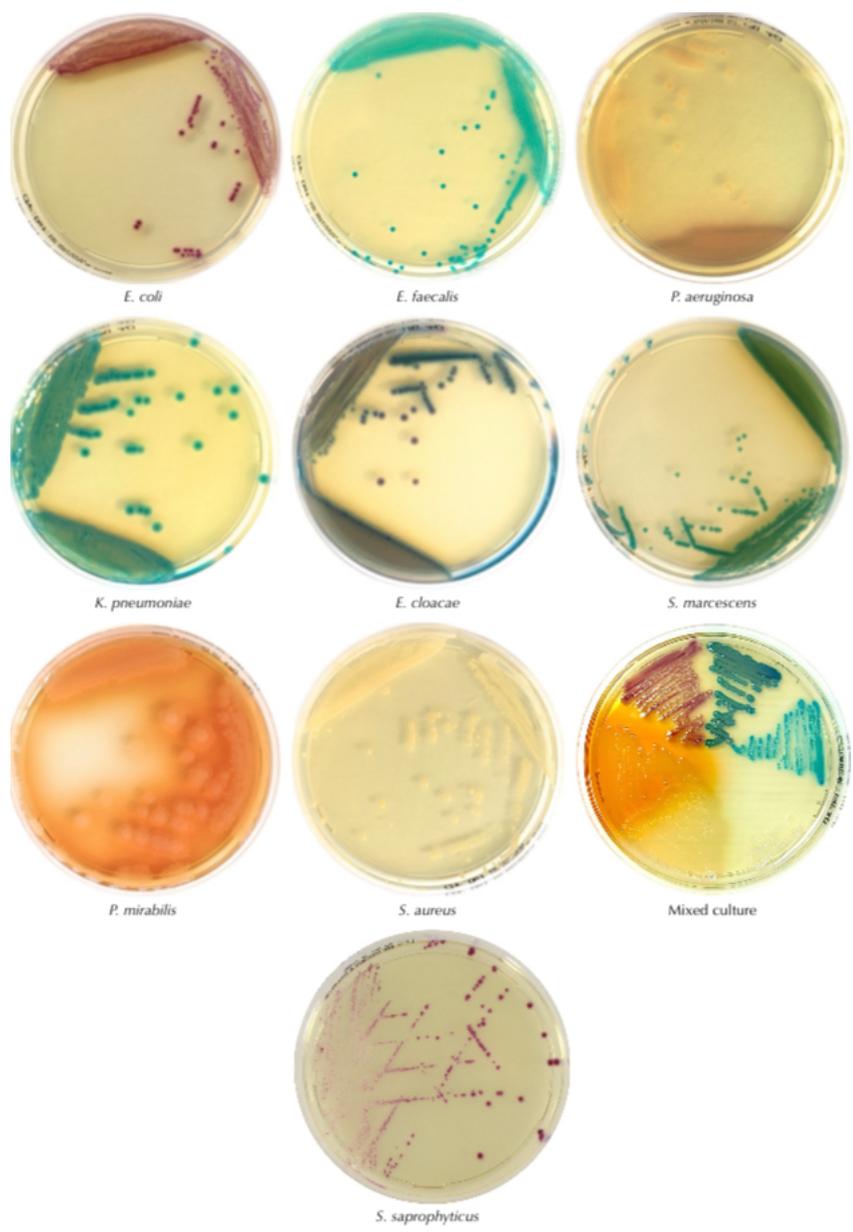


Figura 4. Cap. 7
www.liofilchem.com/chromaticdetection

7.2.3. Chromatic MRSA

ChromaticTM MRSA è un terreno cromogenico selettivo utilizzato per l'isolamento di *S. aureus* meticillina/oxacillina resistente. Le infezioni a carico di MRSA sono endemiche negli ospedali e nelle comunità in tutto il mondo. La mortalità nelle setticemie da MRSA è doppia rispetto alle infezioni causate da ceppi sensibili alla meticillina, dovuto al ritardo nell'intraprendere un trattamento adeguato e alla minor possibilità di scelta del regime terapeutico.

<i>FORMULA TIPICA</i>	<i>(g/l)</i>
<i>Peptone ed Estratto di Lievito</i>	30.0
<i>Sodio Cloruro</i>	10.0
<i>Sodio Fosfato Bibasico</i>	2.5
<i>Agenti Selettivi ed Opacizzanti</i>	16.5
<i>Miscela Cromogenica ed Antibiotica</i>	0.8
<i>Agar</i>	15.0
<i>pH Finale 6.9 ± 0.2 a 25°C</i>	

PRINCIPIO DEL METODO

Peptone ed estratto di lievito forniscono amino acidi, azoto, carbonio, minerali vitamine ed altri nutrienti che supportano la crescita del microrganismo. Il sodio cloruro ha un effetto positivo sulla crescita di *S. aureus*. Il sodio fosfato è il tampone. Gli agenti selettivi inibiscono la crescita dei lieviti e della maggior parte dei batteri Gram negativi e Gram positivi ad eccezione degli stafilococchi meticillina-resistenti. Gli agenti opacizzanti migliorano il contrasto delle colonie sul terreno. L'agar è l'agente solidificante. La miscela cromogenica ed antibiotica permette il recupero ottimale di MRSA e l'identificazione in base alla colorazione malva o arancio-malva delle colonie.

PROCEDURA DEL TEST

Inoculare le piastra strisciando direttamente il campione sulla superficie dell'agar. Incubare in atmosfera aerobica a 37°C per 18-24 ore.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione osservare il colore delle colonie ed interpretare i risultati come indicato nella tabella sotto^[18].

<i>Microrganismo</i>	<i>Colore tipico delle colonie</i>
<i>S. aureus</i> <i>meticillina/oxacillina</i> <i>resistente</i>	Malva o arancio-malva
<i>Altri batteri Gram positivi (se non inibiti)</i>	Bianco o blu



S. aureus (MRSA) ATCC® 43300

Figura 5. Cap. 7
www.liofilchem.com/chromaticmrsa

7.2.4. MacConkey Agar

MacConkey Agar è un terreno leggermente selettivo utilizzato per l'isolamento dei bacilli enterici Gram negativi dalle feci, urine, alimenti, acque di scarico ed altri materiali di importanza sanitaria e la differenziazione dei microrganismi che fermentano il lattosio dai non fermentanti.

<i>FORMULA TIPICA</i>	<i>(g/l)</i>
<i>Digerito Pancreatico di Gelatina</i>	17.0
<i>Peptone da Carne</i>	1.5
<i>Peptone da Caseina</i>	1.5
<i>Lattosio</i>	10.0
<i>Sodio Cloruro</i>	5.0
<i>Sali di Bile</i>	1.5
<i>Agar</i>	15.0
<i>Rosso Neutro</i>	0.03
<i>Cristal Violetto</i>	0.001
<i>pH Finale 7.1 ± 0.2 a 25°C</i>	

PRINCIPIO DEL METODO

Il digerito pancreatico di gelatina ed i peptoni da carne e caseina forniscono aminoacidi, azoto, carbonio, vitamine e minerali per la crescita dei microrganismi. Il lattosio è il carboidrato fermentabile. Il sodio cloruro mantiene il bilancio osmotico del terreno. I sali di bile ed il cristal violetto sono gli agenti selettivi che inibiscono i microrganismi Gram positivi e consentono la crescita dei batteri Gram negativi. L'agar è l'agente solidificante. Il rosso neutro è l'indicatore di pH.

PROCEDURA DEL TEST

Inoculare le piastre strisciando il campione clinico direttamente sulla superficie dell'agar o spatolare il materiale proveniente da una coltura di arricchimento. Incubare in atmosfera aerobica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I microrganismi che non fermentano il lattosio, come *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus* spp, formano colonie incolori o chiare. I microrganismi fermentanti il lattosio, come *E. coli* e *Klebsiella* spp, crescono come colonie di colore da rosa a rosso con o senza un alone di precipitati di bile. Enterococchi, Stafilococchi ed altri batteri Gram positivi risultano parzialmente o completamente inibiti^[18].



Figura 6. Cap.7
www.liofilchem.com/macconkeyagar

7.2.5. Columbia CNA Agar

Columbia CNA Agar (Sheep blood 5%) è utilizzato come terreno di crescita selettivo per l'isolamento e la differenziazione cocchi Gram-positivi da campioni clinici e non clinici contenenti una flora microbica mista.

FORMULA TIPICA	(g/l)
Peptospecial	23.0
Amido	1.0
Sodio Cloruro	5.0
Colistina Solfato	0.01
Acido Nalidixico	0.015
Agar	50 ml
pH Finale 7.3 ± 0.2	

PRINCIPIO

Il Peptospecial costituisce una fonte di azoto, carbonio, zolfo ed altri essenziali fattori di crescita. Il sodio cloruro mantiene il bilancio osmotico del terreno. La colistina e l'acido nalidixico costituiscono gli agenti

selettivi: in particolare la colistina distrugge le membrane cellulari dei batteri Gram-negativi mentre l'acido nalidixico inibisce la replicazione del DNA nei batteri Gram-negativi. Il sangue defibrinato di montone fornisce fattori di crescita aggiuntivi per microrganismi esigenti e permette di evidenziare le reazioni emolitiche. L'agar è l'agente solidificante.

TECNICA

Inoculare le piastre strisciando il campione sulla superficie del terreno utilizzando un'ansa sterile in modo da isolare singole colonie. Incubare a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-48 ore, in atmosfera aerobica, anaerobica o microaerofila.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Osservare la crescita e le reazioni emolitiche. Si possono distinguere quattro diversi tipi di emolisi:

- alfa emolisi: è la riduzione dell'emoglobina a metaemoglobina nel terreno che circonda la colonia e che determina una decolorazione verdastria del terreno;
- beta emolisi: è la lisi degli eritrociti che si evidenzia in una zona chiara intorno alla colonia;
- gamma emolisi: non si verifica nessuna distruzione di eritrociti e nessun cambiamento nel terreno;
- alfa-primo emolisi: si evidenzia una piccola zona di completa emolisi circondata da un'area di lisi parziale^[18].

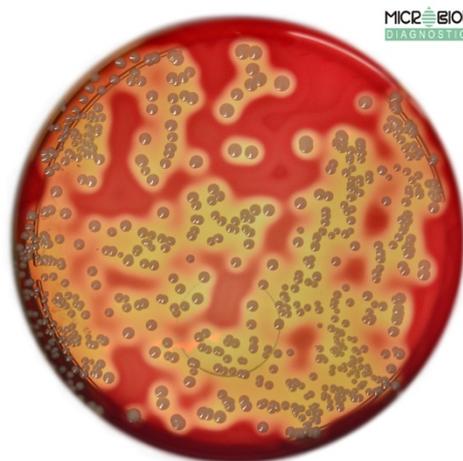


Figura 7. Cap. 7
www.microbioldiagnostic/columbianagaar

7.3. Modalità di trattamento e semina del campione

I campioni che derivano dal programma di screening come, per esempio, tamponi rettali vengono seminati sugli appositi terreni cromogeni e selettivi sopracitati in modo da facilitare la lettura e da ottenere delle colture più pure grazie all'aggiunta di antibiotici.

7.3.1. Test rapido per la classificazione delle carbapenemasi

Reagenti e materiali implicati forniti dalla ditta sono 20 sacchetti sigillati contenenti una card per test e un agente essiccante. Ogni card per test contiene una striscia sensibilizzata, flacone contenente il tampone LY-D: soluzione salina tamponata a pH 7,5 contenente TRIS, NaN₃ (<0,1%) e un detergente; provette di raccolta monouso e pipette di trasferimento monouso.

Le prestazioni previste con tipi di campioni diversi dalle colonie batteriche sono state definite per tamponi rettali e colture ematiche.

Con i tamponi rettali e le colture ematiche, la procedura di preparazione deve essere seguita come descritto nei rispettivi kit (S-1002, ReSCape e S-1001, RESIST-BC). Con le colonie batteriche, per prestazioni ottimali si consiglia l'uso di colture su agar fresche, procedendo come segue:

1. Preparare una provetta semirigida e aggiungervi 11 gocce di tampone LY-D.
2. Raccogliere i batteri prelevando 3 colonie con un'ansa batteriologica monouso e immergerla in fondo alla provetta che contiene il tampone.
3. Agitare bene prima di togliere l'ansa.
4. Miscelare con agitatore a vortice per omogeneizzare la preparazione.
5. Usare la pipetta di trasferimento fornita nel kit e aggiungere 100 µL di campione diluito nel pozzetto per campioni della cassetta etichettata OXA-48, KPC, NDM (il campione diluito deve raggiungere la linea nera indicata sulla pipetta di trasferimento per poter aspirare accuratamente 100 µL).
6. Attendere al massimo 15 minuti per consentire la reazione e leggere il risultato [19].

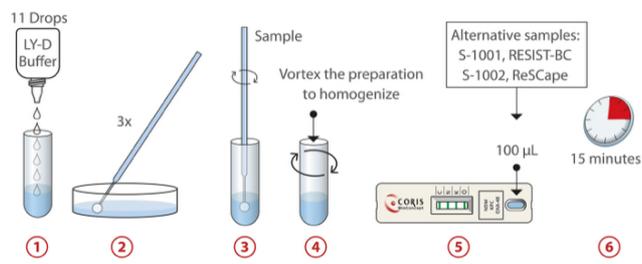


Figura 8. Cap. 7
www.corisbioconcept.com

I risultati positivi si mostrano così:



Figura 9. Cap.7
Test positivo per NDM-1



Figura 10. Cap. 7
Test positivo per KPC

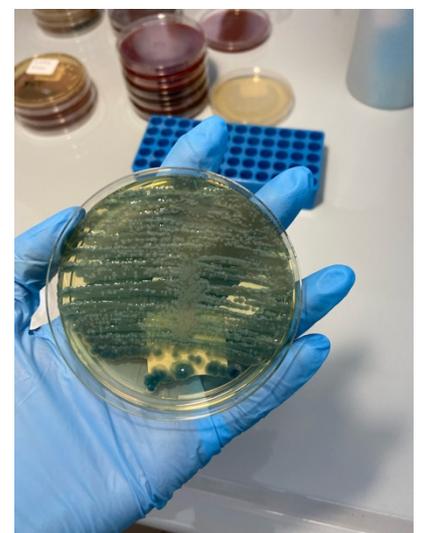


Figura 11. Cap. 7
Colonie di *Klebsiella pneumoniae* utilizzate per il test rappresentato nella figura 10

Come si può vedere la linea di controllo c'è e sta ad indicare che il test è valido, poi abbiamo due esempi diversi di positività: la prima immagine a sinistra segna la positività per le carbapenemasi NDM; invece, la seconda immagine segna la positività per KPC. Le colonie prese sono colonie di *Klebsiella* prese dalla coltura di destra.

Questo test, generalmente, è utilizzato come test di conferma dopo che è stato eseguito l'antibiogramma automatico.

7.3.2. Vitek 2

Vitek 2 è lo strumento utilizzato e dedicato all'antibiogramma automatico. Il sistema Vitek esegue le analisi di antibiogramma e identificazione monitorando continuamente la crescita e l'attività degli organismi all'interno dei pozzetti delle card di test. Questa funzione viene eseguita da due sistemi ottici differenti:

- ❖ Un sistema ottico a fluorescenza che rileva indirettamente la crescita e l'attività degli organismi utilizzando un sottoprodotto chimico della relativa crescita invece degli organismi stessi.
- ❖ Un sistema ottico a trasmittanza che utilizza la luce visibile per misurare direttamente la crescita dell'organismo. Questo sistema è basato su una lettura iniziale della luce di un pozzetto prima che abbia avuto inizio una crescita significativa. Il rilevamento a intervalli regolari della trasmittanza dello stesso pozzetto misura, ogni 15 minuti, la crescita dell'organismo in base alla quantità di luce cui viene impedito di passare attraverso il pozzetto. La taratura del sistema viene eseguita automaticamente^[20].

Questi pozzetti si trovano su delle card dedicate a identificazione o antibiogrammi. Ogni card ha uno spettro di antibiotici dedicata alla specie di organismi che si ricerca.

Quella che interessa allo studio, la card dedicata ai Gram negativi MDR è la card AST-376 e quella per lo *S. aureus* è la AST-658 dedicata ai gram positivi.

AST-N376	Intervallo MIC N376	AST-P658	Intervallo MIC P658
Amikacina	1.0-64.0; 2.0-64.0	Alto livello di resistenza alla gentamicina	0.5-32.0
Amoxicillina/acido clavulanico	2.0-32.0	Amoxicillina/acido clavulanico	0.03125-0.5
Cefapime	0.125-32.0	Ampicillina	NEG, POS
		Ampicillina/Sulbactam	0.0625-4.0
Cefotaxime	0.25-64.0	Chinupristina/Dalfopristina	0.125-4.0
Ceftazidime	4.0-64.0	Ciprofloxacina	0.125-8.0
Ciprofloxacina	0.125-64.0	Daptomicina	0.25-8.0
Colistina	0.5-16.0	Imipenem	0.5-16.0
Ertapenem	0.125-8.0	Kanamicina ad alto dosaggio (sinergia)	0.125-8.0
Fosfomicina	16.0-256.0	Levofloxacina	0.5-8.0
Gentamicina	1.0-16.0	Linezolid	1.0-512.0
Meropenem	0.25-16.0	Nitrofurantoina	0.25-4.0
Nitrofurantoina	16.0-512.0	Streptomina ad alto dosaggio (sinergia)	NEG, POS
Piperacillina/tazobactam	4.0-128.0	Teicoplanina	0.03125-4.0
Tigeciclina	0.5-8.0	Tigeciclina	0.5-32.0
Trimetoprim/Sulfametossazolo	20.0-320.0	Trimetoprim	1.0-16.0
		Trimetoprim/Sulfametossazol	0.125-2.0
		Vancomicina	10.0-320.0

7.3.3. EUCAST breakpoints

Per quanto riguarda gli antibiogrammi, le linee guide seguite dal Laboratorio di Microbiologia del Presidio Ospedaliero di Fano sono quelle dettate dall'EUCAST.

In seguito all'armonizzazione dei breakpoint europei delle MIC da parte del Comitato europeo per i test di suscettibilità antimicrobica (EUCAST), il comitato ha avviato lo sviluppo di un metodo standardizzato di diffusione su disco calibrato sui breakpoint armonizzati delle MIC. Come la maggior parte delle altre tecniche di diffusione su disco, il metodo EUCAST si basa sui principi definiti nel rapporto dell'International Collaborative Study of Antimicrobial Susceptibility Testing e sull'esperienza di gruppi di esperti in tutto il mondo.

Le opinioni espresse nel questionario sono fortemente a favore dello sviluppo di un metodo europeo di diffusione su disco, basato sul metodo Kirby-Bauer ampiamente utilizzato e calibrato sui breakpoint delle MIC cliniche EUCAST. È emerso inoltre che un terreno comune per gli organismi definiti fastidiosi, poiché particolarmente esigenti, invece di terreni separati per *Streptococcus* spp. e *Haemophilus influenzae*, avrebbe

facilitato il lavoro di laboratorio. In risposta a queste richieste, EUCAST, in collaborazione con la Società Europea di Microbiologia Clinica e Malattie Infettive (ESCMID) e con il suo finanziamento, ha sviluppato un metodo standardizzato di diffusione su disco basato su MH agar con una densità di inoculo equivalente allo standard McFarland 0,5 e con l'obiettivo specifico di sviluppare un terreno comune per gli organismi esigenti. Questi obiettivi sono stati raggiunti e sono stati stabiliti i breakpoint del diametro di zona calibrati sui breakpoint delle MIC cliniche EUCAST mediante l'analisi delle correlazioni tra MIC e diametro di zona, delle distribuzioni del diametro di zona di inibizione e delle distribuzioni delle MIC.

Nella basica preparazione abbiamo il terreno Müller-Hinton integrato con 5% di sangue di cavallo defibrinato meccanicamente per gli organismi esigenti (MH-F) per tutti gli altri organismi si utilizza il MH, definito talvolta “MH bianco”, riconoscibile ad occhio poiché differisce dal MH-F per l'assenza di emazie.

La sospensione di inoculo viene preparata selezionando diverse colonie morfologicamente simili (quando possibile) dalla crescita notturna (16-24 ore di incubazione) su un terreno non selettivo con un'ansa sterile o un tampone di cotone e sospendendo le colonie in soluzione fisiologica sterile (0,85% NaCl p/v in acqua) fino alla densità di uno standard McFarland 0,5, approssimativamente corrispondente a $1-2 \times 10^8$ CFU/mL per *Escherichia coli*. La densità della sospensione viene misurata preferibilmente con un dispositivo fotometrico calibrato con uno standard McFarland. La densità della sospensione viene regolata a McFarland 0,5 con l'aggiunta di soluzione fisiologica o di altri organismi. Lo *Streptococcus pneumoniae* viene preferibilmente sospeso dalle colonie su una piastra di agar sangue fino alla densità di uno standard McFarland 0,5. Quando *S. pneumoniae* viene sospeso da colonie su una piastra di agar cioccolato, l'inoculo deve essere equivalente a uno standard McFarland 1,0 per contenere un numero sufficiente di cellule vitali.

Un tampone di cotone sterile viene immerso nella sospensione di inoculo e il liquido in eccesso viene rimosso ruotando il tampone contro l'interno della provetta per evitare un'inoculazione eccessiva delle piastre, in particolare per gli organismi Gram-negativi. L'inoculo viene distribuito in modo uniforme su tutta la superficie della piastra di agar, passando il tampone in tre direzioni o utilizzando un rotatore automatico per piastre.

I dischi antimicrobici devono essere maneggiati e conservati secondo le istruzioni del produttore. È importante che i diametri delle zone possano essere misurati in modo affidabile e il numero massimo di dischi su una piastra dipende dalle dimensioni della piastra, dall'organismo e dagli agenti antimicrobici testati. Il numero di dischi su una piastra deve essere limitato in modo da evitare sovrapposizioni inaccettabili di zone. Su una piastra circolare da 90 mm possono essere collocati al massimo sei dischi.

Una volta applicati i dischetti di antibiotico sulle piastre, quest'ultimo vengono messe a incubare *overnight*, in atmosfera normale tutte le piastre MH, in CO₂ al 5% tutte le piastre MH-F.

Un inoculo corretto e piastre seminate in modo soddisfacente dovrebbero dare luogo a un prato di crescita uniforme e confluyente.

Dopo l'incubazione, le zone di inibizione vengono lette nel punto in cui non viene rilevata alcuna crescita evidente ad occhio nudo quando la piastra viene tenuta a circa 30 cm dall'occhio. I diametri delle zone di inibizione vengono misurati al millimetro con un righello, un calibro o un lettore automatico di zone. Le piastre di agar MH non arricchite vengono lette dal retro della piastra con luce riflessa su uno sfondo scuro, mentre le piastre di agar MH-F vengono lette dal davanti con il coperchio rimosso e con luce riflessa. Per gli streptococchi emolitici su piastre di agar MH-F, si deve leggere l'inibizione della crescita e non l'inibizione dell'emolisi. Se sono visibili zone doppie, si deve leggere la zona più interna, a meno che non sia indicato diversamente^[21].

Le istruzioni riportate dall'EUCAST sono elencate nelle tabelle sotto con alcune note di lettura per gli organismi che interessano questo studio, chiamate *breakpoints*. In seguito ad una ricca raccolta dati l'EUCAST ha stabilito un cut-off, un valore di soglia che determina se l'organismo è sensibile o resistente all'antibiotico; ma soprattutto hanno associato l'alone di inibizione alla concentrazione minima inibitoria in mg/L (MIC).

Pseudomonas aeruginosa

Carbapenems	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Doripenem	0.001	2		10	50	22	
Ertapenem	-	-		-	-	-	
Imipenem	0.001	4		10	50	20	
Imipenem-relebactam, <i>P. aeruginosa</i>	21	21		10-25	22	22	
Meropenem (indications other than meningitis), <i>P. aeruginosa</i>	2	8		10	20	14	
Meropenem (indications other than meningitis), <i>Pseudomonas</i> other than <i>P. aeruginosa</i>	2	8		10	24	18	
Meropenem (meningitis), <i>P. aeruginosa</i>	2	2		10	20	20	
Meropenem-vaborbactam, <i>P. aeruginosa</i>	82	82		20-10	14	14	

Figura 12. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

Cephalosporins	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Cefaclor	-	-		-	-	-	
Cefadroxil	-	-		-	-	-	
Cefalexin	-	-		-	-	-	
Cefazolin	-	-		-	-	-	
Cefepime	0.001	8		30	50	21	
Cefiderocol, <i>P. aeruginosa</i>	21	21		30	22	22	14-22
Cefixime	-	-		-	-	-	
Cefotaxime	-	-		-	-	-	
Cefoxitin	-	-		-	-	-	
Cefpodoxime	-	-		-	-	-	
Ceftaroline	-	-		-	-	-	
Ceftazidime	0.001	8		10	50	17	
Ceftazidime-avibactam, <i>P. aeruginosa</i>	82	82		10-4	17	17	16-17
Ceftibuten	-	-		-	-	-	
Ceftobiprole	IE	IE		-	IE	IE	
Ceftolozane-tazobactam3, <i>P. aeruginosa</i>	44	44		30-10	23	23	
Ceftriaxone	-	-		-	-	-	
Cefuroxime iv	-	-		-	-	-	
Cefuroxime oral	-	-		-	-	-	

Figura 13. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

Penicillins	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Benzylpenicillin	-	-		-	-	-	
Ampicillin	-	-		-	-	-	
Ampicillin-sulbactam	-	-		-	-	-	
Amoxicillin	-	-		-	-	-	
Amoxicillin-clavulanic acid	-	-		-	-	-	
Piperacillin	0.001	16		30	50	18	18-19
Piperacillin-tazobactam	0.0011	161		30-6	50	18	18-19
Ticarcillin	0.001	16		75	50	18	
Ticarcillin-clavulanic acid	0.0012	162		75-10	50	18	
Temocillin	-	-		-	-	-	
Phenoxymethylpenicillin	-	-		-	-	-	
Oxacillin	-	-		-	-	-	
Cloxacillin	-	-		-	-	-	
Dicloxacillin	-	-		-	-	-	
Flucloxacillin	-	-		-	-	-	
Mecillinam oral (plvmeccillinam) (uncomplicated UTI only)	-	-		-	-	-	

Figura 14. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

Acinetobacter baumannii

Carbapenems	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Doripenem	0.001	2		10	50	22	
Ertapenem	-	-			-	-	
Imipenem	2	4		10	24	21	
Imipenem-relebactam ²	21	21		10-25	24	24	
Meropenem (indications other than meningitis)	2	8		10	21	15	
Meropenem (meningitis)	2	2		10	21	21	
Meropenem-vaborbactam ²	Note2	Note2			NoteA	NoteA	

Figura 15. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

Enterococcus faecium

Penicillins ¹	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Benzympenicillin	-	-			-	-	
Ampicillin ¹	42	82		2	10A	8A	
Ampicillin-sulbactam ¹	42,3	82,3			NoteA	NoteA	
Amoxicillin ¹	42	82			NoteA	NoteA	
Amoxicillin-clavulanic acid ¹	42,4	82,4			NoteA	NoteA	
Piperacillin	Note2	Note2			NoteA	NoteA	
Piperacillin-tazobactam	Note2	Note2			NoteA	NoteA	
Ticarcillin	-	-			-	-	
Ticarcillin-clavulanic acid	-	-			-	-	
Temocillin	-	-			-	-	
Phenoxymethylpenicillin	-	-			-	-	
Oxacillin	-	-			-	-	
Cloxacillin	-	-			-	-	
Dicloxacillin	-	-			-	-	
Flucloxacillin	-	-			-	-	
Mecillinam oral (pivmecillinam) (uncomplicated UTI only)	-	-			-	-	

Figura 16. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01 (EUCAST materiali e metodi)

1. I breakpoint dell'aminopenicillina negli enterococchi si basano sulla somministrazione endovenosa. Per la somministrazione orale i breakpoint sono rilevanti solo per le infezioni del tratto urinario.

2/A. La suscettibilità all'ampicillina, all'amoxicillina e alla piperacillina (con e senza inibitore della beta-lattamasi) può essere dedotta dall'ampicillina.

ampicillina. La resistenza all'ampicillina è poco comune in *E. faecalis* (confermare con la MIC) ma comune in *E. faecium*.

3. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di sulbactam è fissata a 4 mg/L.

4. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di acido clavulánico è fissata a 2 mg/L^[22].

Klebsiella pneumoniae

Penicillins ¹	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Benzyloxyphenoxymethylpenicillin	-	-			-	-	
Ampicillin¹	8	8		10	14A	14A	
Ampicillin-sulbactam¹	82	82		10-10	14A	14A	
Amoxicillin¹	8	8		-	NoteB	NoteB	
Amoxicillin-clavulanic acid¹	83	83		20-10	19A	19A	19-20
Amoxicillin-clavulanic acid (uncomplicated UTI only)	323	323		20-10	16A	16A	
Piperacillin	8	8		30	20	20	
Piperacillin-tazobactam	84	84	16	30-6	20	20	19
Ticarcillin	8	16		75	23	20	
Ticarcillin-clavulanic acid	83	163		75-10	23	20	
Temocillin (infections originating from the urinary tract), <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella</i> spp. (except <i>K. aerogenes</i>) and <i>P. mirabilis</i>	0.001	16		30	50C	17C	
Phenoxymethylpenicillin	-	-			-	-	
Oxacillin	-	-			-	-	
Cloxacillin	-	-			-	-	
Dicloxacillin	-	-			-	-	
Flucloxacillin	-	-			-	-	
Mecillinam oral (pivmecillinam) (uncomplicated UTI only), <i>E. coli</i>, <i>Citrobacter</i> spp., <i>Klebsiella</i> spp., <i>Raoultella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. and <i>P. mirabilis</i>	85	85		10	15C	15C	

Figura 17. Cap. 7

EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

1. I breakpoint dell'aminopenicillina nelle Enterobacterales si basano sulla somministrazione endovenosa. Per la somministrazione orale i breakpoint sono rilevanti solo per le infezioni del tratto urinario. I breakpoint per altre infezioni sono in fase di revisione.
2. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di sulbactam è fissata a 4 mg/L.
3. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di acido clavulanico è fissata a 2 mg/l.
4. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di tazobactam è fissata a 4 mg/L.
5. La diluizione in agar è il metodo di riferimento per la determinazione della MIC del mecillinam.
 - A. Ignorare la crescita che può apparire come una sottile zona interna su alcuni lotti di agar Mueller-Hinton.
 - B. Suscettibilità dedotta dall'ampicillina.
 - C. Ignorare le colonie isolate all'interno della zona di inibizione [22].

Cephalosporins ¹	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Cefaclor	-	-			-	-	
Cefadroxil (uncomplicated UTI only)	16	16		30	12	12	
Cefalexin (uncomplicated UTI only)	16	16		30	14	14	
Cefazolin (infections originating from the urinary tract), <i>E. coli</i> , and <i>Klebsiella spp.</i> (except <i>K. aerogenes</i>)	0.0012	42		30	50A	20A	
Cefepime	1	4		30	27	24	
Cefiderocol	23	23		30	22	22	18-22
Cefixime (uncomplicated UTI only)	1	1		5	17	17	
Cefotaxime (indications other than meningitis)	1	2		5	20	17	
Cefotaxime (meningitis)	1	1		5	20	20	
Cefoxitin (screen only) ⁴	Note ⁴	Note ⁴		30	19	19	
Cefpodoxime (uncomplicated UTI only)	1	1		10	21	21	
Ceftaroline	0.5	0.5		5	23	23	22-23
Ceftazidime	1	4		10	22	19	
Ceftazidime-avibactam	85	85		10-4	13	13	
Ceftibuten (infections originating from the urinary tract)	1	1		30	23	23	
Ceftobiprole	0.25	0.25		5	23	23	
Ceftolozane-tazobactam ⁶	27	27		30-10	22	22	19-21
Ceftriaxone (indications other than meningitis)	1	2		30	25	22	
Ceftriaxone (meningitis)	1	1		30	25	25	
Cefuroxime iv, <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> (except <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella spp.</i> and <i>P. mirabilis</i>	0.001	8		30	50	19	
Cefuroxime oral (uncomplicated UTI only), <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> (except <i>K. aerogenes</i>), <i>Raoultella spp.</i> and <i>P. mirabilis</i>	8	8		30	19	19	

Figura 18. Cap. 7
 EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

1. I breakpoint delle cefalosporine per le *Enterobacterales* rileveranno tutti i meccanismi di resistenza clinicamente importanti (comprese le ESBL e le AmpC plasmidiche). (AmpC mediata da plasmidi). Alcuni isolati che producono beta-lattamasi sono sensibili alle cefalosporine di terza o quarta generazione con questi breakpoint e devono essere segnalati. Questi breakpoint e devono essere segnalati come testati, cioè la presenza o l'assenza di ESBL non influenza di per sé la categorizzazione della suscettibilità. categorizzazione della suscettibilità. La rilevazione e la caratterizzazione delle ESBL sono raccomandate per scopi di salute pubblica e di controllo delle infezioni.
- 2/A. Gli isolati sensibili al cefadroxil e/o alla cefalexina possono essere segnalati come "*suscettibili, maggiore esposizione* (I) alla cefazolina".
3. La determinazione della MIC per microdiluizione in brodo deve essere eseguita in brodo Mueller-Hinton impoverito di ferro e devono essere seguite le istruzioni di lettura specifiche.
 specifiche istruzioni di lettura.

4. L'ECOFF della cefoxitina (8 mg/L) ha un'elevata sensibilità ma una scarsa specificità per l'identificazione degli *Enterobacterales* produttori di AmpC, in quanto questo agente è influenzato anche dalla permeabilità del terreno.

agente è influenzato anche da alterazioni della permeabilità e da alcune carbapenemasi. I produttori classici di non-AmpC sono di tipo selvatico, mentre i produttori di AmpC plasmidici o di produttori di AmpC plasmidici o iperproduttori di AmpC cromosomici sono di tipo non selvatico.

5. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di avibactam è fissata a 4 mg/L.

6. Per il dosaggio per le diverse indicazioni, vedere la tabella dei dosaggi.

7. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di tazobactam è fissata a 4 mg/L [22].

Carbapenems1	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Doripenem	1	2		10	24	21	
Ertapenem	0.5	0.5		10	25	25	
Imipenem, <i>Enterobacterales</i> except <i>Morganellaceae</i>	2	4		10	22	19	
Imipenem2, <i>Morganellaceae</i>	0.001	4		10	50	19	
Imipenem-relebactam, <i>Enterobacterales</i> except <i>Morganellaceae</i>	23	23		10-25	22	22	
Meropenem (indications other than meningitis)	2	8		10	22	16	
Meropenem (meningitis)	2	2		10	22	22	
Meropenem-vaborbactam	84	84		20-10	20	20	15-19A

Figura 19. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

1. Alcuni isolati che producono carbapenemasi sono classificati come suscettibili con gli attuali breakpoint e devono essere riportati come I testati.

I testati, cioè la presenza o l'assenza di una carbapenemasi non influenza di per sé la categorizzazione della suscettibilità.

La rilevazione e la caratterizzazione delle carbapenemasi sono raccomandate per scopi di salute pubblica e di controllo delle infezioni. Per screening delle carbapenemasi si raccomanda un cut-off di meropenem >0,125 mg/L (diametro della zona <28 mm).

2. L'attività intrinsecamente bassa dell'imipenem contro *Morganella morganii*, *Proteus spp.* e *Providencia spp.* richiede un'elevata esposizione all'imipenem.

3. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di relebactam è fissata a 4 mg/L.

4. Ai fini dei test di suscettibilità, la concentrazione di vaborbactam è fissata a 8 mg/L.

A. Per gli isolati nell'ATU, se resistenti al meropenem segnalare la resistenza al meropenem-varbobactan. Se non resistenti a meropenem indagare ulteriormente [22].

Staphylococcus aureus

Penicillins1	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
Benzyloxacillin, <i>S. aureus</i>	0.1251	0.1251		1 unit	26A,B	26A,B	
Benzyloxacillin, <i>S. lugdunensis</i>	0.125	0.125		1 unit	26	26	
Benzyloxacillin, other staphylococci	Note2	Note2			NoteC	NoteC	
Ampicillin, <i>S. saprophyticus</i>	Note2,3	Note2,3		2	18C,D	18C,D	
Ampicillin-sulbactam	Note1,2,3	Note1,2,3			NoteA,C,D	NoteA,C,D	
Amoxicillin	Note1,2,3	Note1,2,3			NoteA,C,D	NoteA,C,D	
Amoxicillin-clavulanic acid	Note1,2,3	Note1,2,3			NoteA,C,D	NoteA,C,D	
Piperacillin	Note1,2,3	Note1,2,3			NoteA,C,D	NoteA,C,D	
Piperacillin-tazobactam	Note1,2,3	Note1,2,3			NoteA,C,D	NoteA,C,D	
Ticarcillin	Note1,2	Note1,2			NoteA,C	NoteA,C	
Ticarcillin-clavulanic acid	Note1,2	Note1,2			NoteA,C	NoteA,C	
Temocillin	-	-			-	-	
Phenoxymethylpenicillin, <i>S. aureus</i>	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Phenoxymethylpenicillin	-2	-2			NoteC	NoteC	
Coagulase-negative staphylococci							
Oxacillin (screen only), <i>S. pseudintermedius</i> , <i>S. schleiferi</i> and <i>S. coagulans</i>	NA	NA		1	20E	20E	
Oxacillin4, other staphylococci	Note1,4	Note1,4			NoteA	NoteA	
Cloxacillin	Note1,2	Note1,2			NoteA,C	NoteA,C	
Dicloxacillin	Note1,2	Note1,2			NoteA,C	NoteA,C	
Flucloxacillin	Note1,2	Note1,2			NoteA,C	NoteA,C	
Mecillinam oral (pivmecillinam) (uncomplicated UTI only)	-	-			-	-	

Figura 20. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

1/A. La maggior parte degli *S. aureus* sono produttori di penicillinasi e alcuni sono resistenti alla meticillina. Entrambi i meccanismi li rendono resistenti benzilpenicillina, fenossimetilpenicillina, ampicillina, amoxicillina, piperacillina e ticarcillina.

Se risultano sensibili alla benzapenicillina e alla cefoxitina possono essere dichiarati sensibili a tutte le penicilline. Gli isolati che risultano resistenti alla benzilpenicillina ma sensibili alla cefoxitina sono sensibili alle combinazioni di inibitori delle β-lattamasi, alle isossazolilpenicilline (oxacillina, cloxacillina) e alle penicilline.

(oxacillina, cloxacillina, dicloxacillina e flucloxacillina) e alla nafcillina. Per gli agenti somministrati per via orale, occorre prestare attenzione a raggiungere una sufficiente esposizione nel sito dell'infezione. Gli isolati che risultano resistenti alla cefoxitina sono resistenti a tutte le penicilline.

2/C. La maggior parte degli stafilococchi coagulasi-negativi sono produttori di penicillinasi e alcuni sono resistenti alla meticillina. Entrambi i meccanismi li rende

resistenti a benzilpenicillina, fenossimetilpenicillina, ampicillina, amoxicillina, piperacillina e ticarcillina.

Nessun metodo attualmente disponibile è in grado di rilevare in modo affidabile la produzione di penicillinasi in tutte le specie di stafilococchi ma la resistenza alla meticillina può essere rilevata con la cefoxitina come descritto.

3/D. Gli *S. saprophyticus* sensibili all'ampicillina sono mecA-negativi e sensibili all'ampicillina, all'amoxicillina e alla piperacillina (senza o con beta-lactamasi).

(senza o con un inibitore delle beta-lattamasi).

4. *S. aureus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* con valori di MIC dell'oxacillina >2 mg/L sono perlopiù resistenti alla meticillina a causa della presenza del gene mecA o mecC. Occasionalmente i valori di MIC dell'oxacillina sono elevati in *S. aureus* in assenza di resistenza mediata dal gene mec.

Questi isolati sono stati chiamati BORSA (borderline oxacillin resistant *S. aureus*). EUCAST non raccomanda screening sistematici per BORSA.

Per gli stafilococchi coagulasi-negativi diversi da *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis*, l'oxacillino-resistenza è stata valutata con il metodo dell'oxacillina.

Lugdunensis, la MIC dell'oxacillina negli isolati resistenti alla meticillina è >0,25 mg/L.

B. Per *S. aureus*, la diffusione su disco è più affidabile della determinazione della MIC per l'individuazione dei produttori di penicillinasi, a condizione che venga misurato il diametro della zona e il bordo della zona.

Esaminare il bordo della zona con luce trasmessa (piastra esposta alla luce). Se il diametro della zona è <26 mm, segnalare la resistenza. Se il diametro della zona è di 26 mm

E il bordo della zona è netto (nessuna riduzione della crescita verso il bordo della zona, come una "scogliera"), segnalare la resistenza. Se non è netto/(riduzione della crescita verso il bordo della zona, come una "spiaggia"), allora segnalare suscettibile e, se incerto, segnalare resistente.

I test cromogenici per le beta-lattamasi a base di cefalosporine non rilevano in modo affidabile la penicillinasi stafilococcica.

E. Per lo screening della resistenza alla meticillina in *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. coagulans*^[22].

Cephalosporins ¹	MIC breakpoints (mg/L)			Disk content (µg)	Zone diameter breakpoints (mm)		
	S ≤	R >	ATU		S ≥	R <	ATU
	Cefaclor ²	Note1	Note1				NoteA
Cefadroxil	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Cefalexin	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Cefazolin	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Cefepime	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Cefiderocol	-	-			-	-	
Cefixime	-	-			-	-	
Cefotaxime ²	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Cefoxitin (screen only), <i>S. aureus</i> and coagulase-negative staphylococci except <i>S. epidermidis</i> and <i>S. lugdunensis</i>	Note3,4	Note3,4		30	22A,B	22A,B	
Cefoxitin (screen only), <i>S. epidermidis</i> and <i>S. lugdunensis</i>	Note4	Note4		30	27A,B	27A,B 27	
Cefoxitin (screen only), <i>S. pseudintermedius</i> , <i>S. schleiferi</i> and <i>S. coagulans</i>	Note5	Note5			NoteC	NoteC	
Cefpodoxime	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Ceftaroline (indications other than pneumonia), <i>S. aureus</i>	16	26,7	1	5	20D	17D,E 19-20	
Ceftaroline (pneumonia), <i>S. aureus</i>	16	16	1	5	20D	20D 19-20	
Ceftazidime	-	-			-	-	
Ceftazidime-avibactam	-	-			-	-	
Ceftibuten	-	-			-	-	
Ceftobiprole, <i>S. aureus</i>	28	28	2	5	17F	17F 16-17	
Ceftolozane-tazobactam	-	-			-	-	
Ceftriaxone ²	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Cefuroxime iv	Note1	Note1			NoteA	NoteA	
Cefuroxime oral	Note1	Note1			NoteA	NoteA	

Figura 21. Cap. 7
EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01

1/A. La suscettibilità degli stafilococchi alle cefalosporine si deduce dalla suscettibilità alla cefoxitina, tranne che per la cefixima.

I ceftazidime, ceftazidime-avibactam, ceftibuten e ceftolozane-tazobactam, che non hanno breakpoint e non devono essere utilizzati per le infezioni da stafilococco.

Per gli agenti somministrati per via orale, occorre prestare attenzione a raggiungere un'esposizione sufficiente nel sito dell'infezione.

Se cefotaxime e ceftriaxone sono segnalati per gli stafilococchi sensibili alla meticillina, questi devono essere segnalati come "Suscettibile, esposizione aumentata". Alcuni *S. aureus* meticillino-resistenti sono sensibili alla ceftarolina e al ceftobiprole.

2. Vedere la tabella dei dosaggi.

3. *S. aureus* e *S. lugdunensis* con valori di MIC della cefoxitina >4 mg/L e *S. saprophyticus* con valori di MIC della cefoxitina >8 mg/L sono resistenti alla meticillina, soprattutto per la presenza del gene *mecA* o *mecC*. La diffusione su disco predice in modo affidabile la meticillina resistenza alla meticillina.

4. Per gli stafilococchi diversi da *S. aureus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus*, la MIC della cefoxitina è un predittore di resistenza alla meticillina più scarso rispetto alla diffusione su disco.

5/C. In *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. coagulans* il disco di cefoxitina è meno predittivo per il rilevamento della resistenza alla meticillina rispetto ad altri stafilococchi. Utilizzare il disco di oxacillina da 1 ug con breakpoint di diametro di zona $S \geq 220$, $R < 20$ mm.

6/D. Gli isolati sensibili alla meticillina possono essere dichiarati sensibili alla ceftarolina senza ulteriori test.

7/E. Gli isolati resistenti sono rari.

8/F. Gli isolati sensibili alla meticillina possono essere dichiarati sensibili al ceftobiprololo senza ulteriori test.

B. Se gli stafilococchi coagulasi-negativi non sono identificati a livello di specie, utilizzare i breakpoint del diametro di zona $S \geq 225$, $R < 25$ mm ^[22].

8. Risultati

Nella tesi sono stati analizzati in modo retrospettivo i dati epidemiologici relativi agli isolati batterici Gram negativi *MultiDrug Resistant* più diffusi (*Acinetobacter baumannii* complex, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) e allo *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) isolati presso gli stabilimenti ospedalieri dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord di Pesaro nel periodo di tempo compreso tra gli anni 2015 e 2021, ed il primo semestre dell'anno 2022.

Inoltre, sono stati analizzati i dati relativi agli screening colturali di sorveglianza effettuali mediante tampone nasale per la ricerca specifica di *Staphylococcus aureus* MRSA e tampone rettale per la ricerca specifica di ceppi resistenti ai carbapenemi (*Klebsiella pneumoniae* KPC e *Acinetobacter baumannii* complex) su una popolazione ospedaliera selezionata.

In particolare gli screening mediante tampone nasale vengono effettuati su tutti i pazienti dializzati, ematologici e quelli da sottoporre a interventi di chirurgia ortopedica, mentre gli screening mediante tampone rettale su tutti i pazienti in ingresso nei reparti di terapia intensiva, sui pazienti ematologici e sui pazienti dei reparti geriatrici e del dipartimento di medicina quando provenienti da strutture esterne o in casi di isolamento di batteri multi-resistenti quando isolati post-ricovero del paziente.

In Figura 1 viene riportata la distribuzione degli isolamenti di enterobatteri sul totale degli isolati batterici espressi in valore assoluto (1A PO Fano, 1D PO Pesaro/Muraglia) e percentuale (1B PO Fano, 1E PO Pesaro/Muraglia), e quella relativa alla distribuzione dei ceppi produttori di ESBL e carbapenemasi (KPC) espressi in valore percentuale (1C PO Fano, 1F PO Pesaro/Muraglia), rispetto al totale degli enterobatteri isolati negli stabilimenti ospedalieri dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2015-2021 e nel primo semestre dell'anno 2022.

In particolare, dai dati riportati emerge che nel PO di Fano:

- il numero assoluto di enterobatteri isolati vede una distribuzione abbastanza costante negli anni, con un'oscillazione percentuale variabile tra il 38% e il 45%, un picco nel 2020 (53,9%) e presumibilmente un aumento nel 2022 visto che i dati riportati riguardano l'elaborazione di solo 6 mesi;

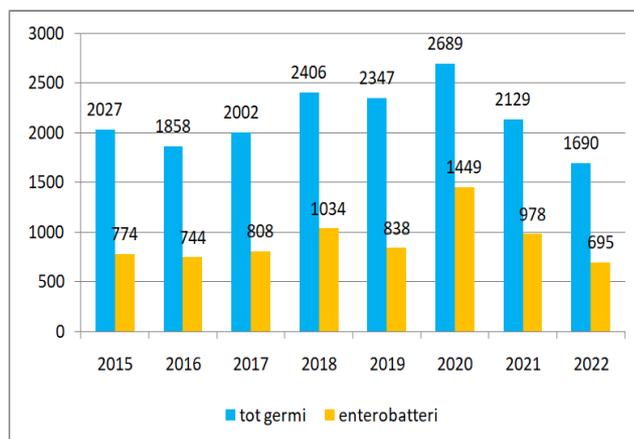


Figura 1A
Vedi pag. 72

- il numero percentuale di ceppi produttori di ESBL ha subito un notevole incremento negli anni 2016-2019 con un'oscillazione percentuale variabile tra il 16,8% e il 23%, rispetto all'anno 2015 (7,5%), per stabilizzarsi intorno all'8,5% negli anni successivi;

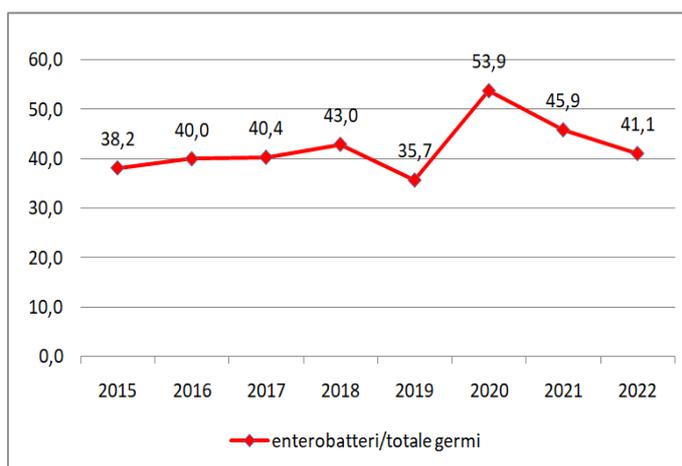


Figura 1B
Vedi pag. 72

- il numero percentuale di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemi con fenotipo KPC non ha subito variazioni significative, ad eccezione dell'anno 2019, rimanendo stabile su valori intorno al 3%.

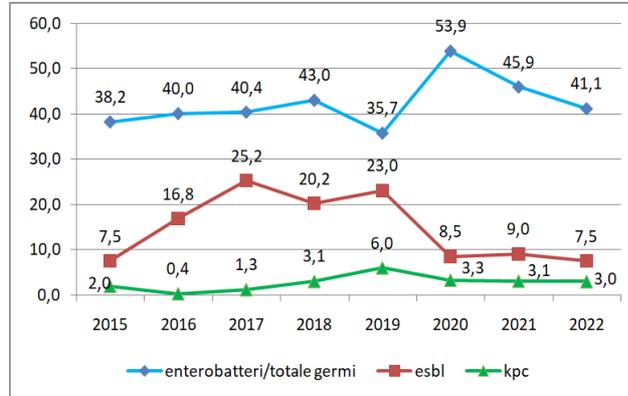


Figura 1C
Vedi pag. 72

In particolare, dai dati riportati emerge che negli stabilimenti di Pesaro:

- il numero assoluto di enterobatteri isolati vede una distribuzione abbastanza costante negli anni (circa 43%), con un lieve incremento negli anni 2020-2021 (47,3% e 49,2% rispettivamente);

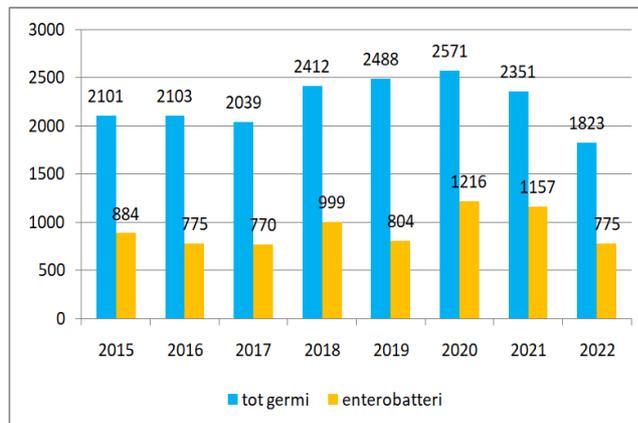


Figura 1D
Vedi pag. 72

- il numero percentuale di ceppi produttori di ESBL ha subito un notevole incremento negli anni 2018-2020 con un'oscillazione percentuale variabile tra il 17% e il 24,9%, per diminuire negli anni successivi stabilizzandosi nel primo semestre del 2022 al 15,3%;

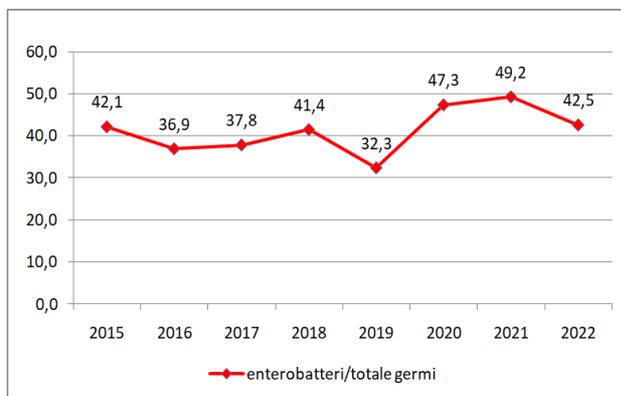


Figura 1E
Vedi pag. 72

- il numero percentuale di ceppi di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemi con fenotipo KPC ha fatto registrare un picco del 16,8% nel 2018, per poi subire un decremento nel 2019 (2,6%), un aumento al 7,4 % nel 2020 e una progressiva diminuzione negli anni 2021-2022 stabilizzandosi al 3,1%, valore simile a quello registrato negli anni 2015-2017.

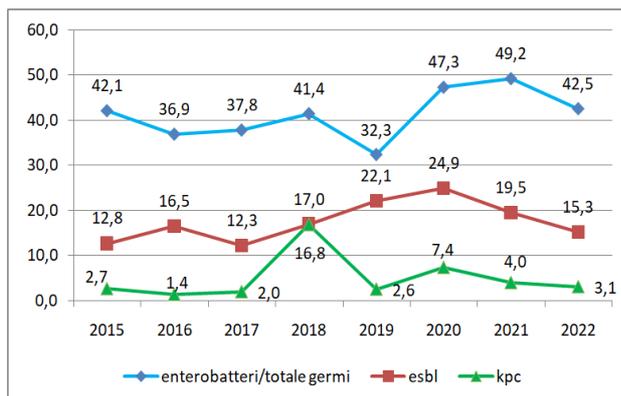


Figura 1F
Vedi pag. 72

Figura 1. Cap. 8 Distribuzione degli isolamenti di enterobatteri sul totale degli isolati batterici espressi in valore assoluto (1A) e percentuale (1B), e distribuzione dei ceppi produttori di ESBL e carbapenemasi (KPC) espressi in valore percentuale (1C), presso il PO di Fano dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2015-2021 e nel primo semestre dell'anno 2022.

Distribuzione degli isolamenti di enterobatteri sul totale degli isolati batterici espressi in valore assoluto (1D) e percentuale (1E), e distribuzione dei ceppi produttori di ESBL e carbapenemasi (KPC) espressi in valore percentuale (1F), presso gli stabilimenti di Pesaro e Muraglia dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2015-2021 e nel primo semestre dell'anno 2022.

In Figura 2 viene riportata la distribuzione in valore percentuale degli isolati di *Staphylococcus aureus* (linea blu) rispetto al totale degli isolati batterici rispettivamente negli stabilimenti ospedalieri di Fano (2A) e di Pesaro (S.Salvatore e Muraglia; 2B) dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2015-2021 e nel primo semestre dell'anno 2022.

Possiamo osservare nella distribuzione relativa agli isolati di *Staphylococcus aureus* nel PO di Fano due picchi di negli anni 2015 e 2017 corrispondenti al 55,8% e al 40,4% rispettivamente, ed una progressiva diminuzione negli anni successivi con valori stabili di isolamento pari al 20%; mentre nella distribuzione relativa agli stabilimenti di Pesaro si registra un picco nel 2016 pari al 48,2% ed una progressiva diminuzione negli anni successivi con valori stabili di isolamento pari al 15-20%.

Per quanto riguarda la percentuale di isolati di *Staphylococcus aureus* MRSA (linea rossa) rispetto agli isolati totali di *Staphylococcus aureus*, nel PO di Fano si ha un andamento stabile dal 2016 con valore medio intorno al 7,5%, mentre negli stabilimenti di Pesaro la distribuzione è stabile al 9%.

Figura 2A

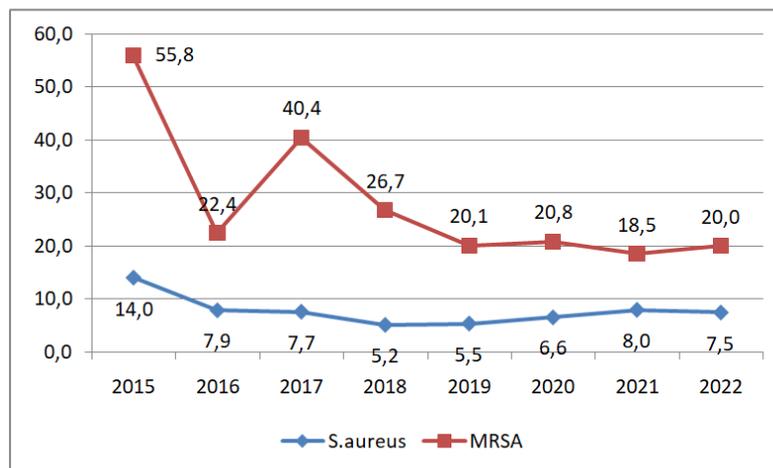


Figura 2B

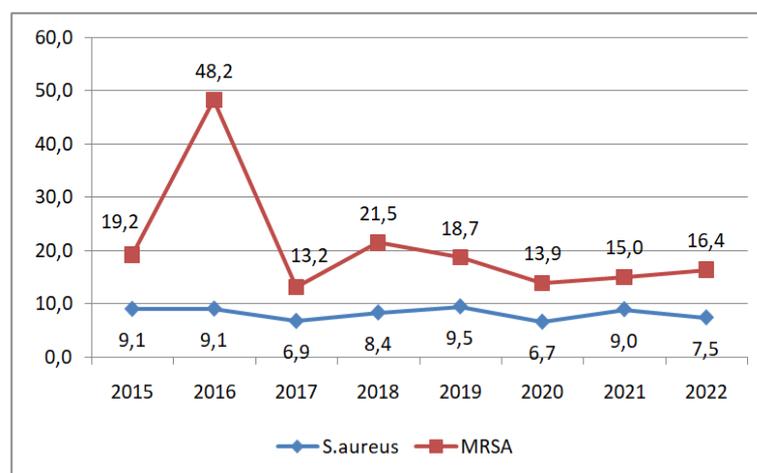


Figura 2 – Distribuzione in valore percentuale degli isolati di *Staphylococcus aureus* (linea blu) rispetto al totale degli isolati batterici e degli isolati di *Staphylococcus aureus* MRSA (linea rossa) rispetto agli isolati totali di *Staphylococcus aureus*, rispettivamente negli stabilimenti ospedalieri di Fano (2A) e di Pesaro (S.Salvatore e Muraglia; 2B) dell’Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2015-2021 e nel primo semestre dell’anno 2022.

Relativamente agli isolati dei batteri Gram negativi MultiDrug Resistant in figura 3 sono riportate le distribuzioni in valore percentuale degli isolati di *Acinetobacter baumannii* complex (ABC) MultiDrug Resistant (linea blu) e di *Pseudomonas aeruginosa* (linea rossa) rispetto al totale degli isolati batterici, e la distribuzione degli isolati di *Pseudomonas aeruginosa* MultiDrug Resistant (linea verde) rispetto al totale degli *Pseudomonas aeruginosa* isolati, rispettivamente negli stabilimenti ospedalieri di Fano (3A) e di Pesaro (S.Salvatore e Muraglia; 3B) dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2015-2021 e nel primo semestre dell'anno 2022.

Dai dati emerge un andamento stabile della distribuzione di *Acinetobacter baumannii* complex (ABC) MultiDrug Resistant nel PO di Fano al 4%, e un incremento dal 2020 per gli isolati negli stabilimenti di Pesaro con valori che passano da una media del 2% (2015-2019) a valori del 6% (2020-2022).

Il numero di isolati di *Pseudomonas aeruginosa* è stabile negli anni in tutti gli stabilimenti dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord, anche se si registra un picco del numero di *Pseudomonas aeruginosa* MultiDrug Resistant isolati nell'anno 2017 nel PO di Fano (15,7%) per poi stabilizzarsi intorno al 6%.

Per quanto riguarda gli stabilimenti di Pesaro si assiste a un picco del numero di *Pseudomonas aeruginosa* MultiDrug Resistant isolati negli anni 2015-2016 negli (22%), ad una progressiva e significativa diminuzione fino al 2018 (2%) con picchi variabili dal 5 al 9% negli anni successivi.

Relativamente agli screening colturali di sorveglianza per *Staphylococcus aureus* MRSA, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* complex resistenti ai carbapenemi sono stati elaborati i dati relativi agli anni 2020-2021 e al primo semestre dell'anno 2022. Come riportato in Figura 4 si può osservare un andamento simile negli anni per numero di screening eseguiti negli stabilimenti ospedalieri dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord.

Possiamo osservare un aumento nel numero di positività relative agli isolati di *Klebsiella pneumoniae* con fenotipo KPC associabile all'aumento di casi di batteriemia da KPC riscontrati in periodo pandemia Covid. Dati che ha esteso l'esecuzione degli screening colturali di sorveglianza per batteri Gram negativi MultiDrug Resistant ai pazienti over 65 anni con accesso dal Pronto soccorso.

Figura 3A

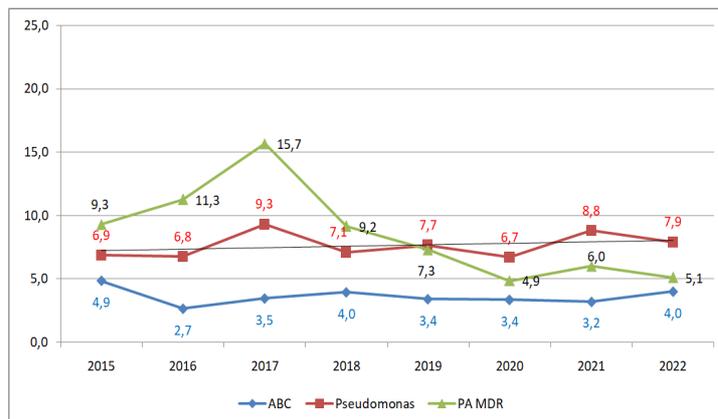


Figura 3B

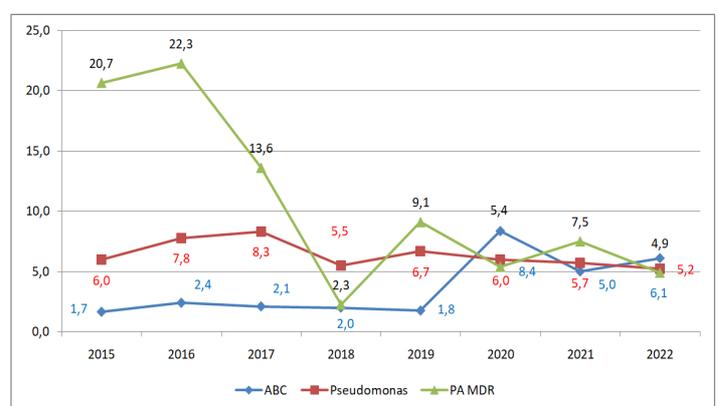


Figura 3 – Distribuzione in valore percentuale degli isolati di *Acinetobacter baumannii* complex (ABC) MultiDrug Resistant (linea blu) e di *Pseudomonas aeruginosa* (linea rossa) rispetto al totale degli isolati batterici. Distribuzione degli isolati di *Pseudomonas aeruginosa* MultiDrug Resistant (linea verde) rispetto al totale degli *Pseudomonas aeruginosa* isolati, rispettivamente negli stabilimenti ospedalieri di Fano (3A) e di Pesaro (S.Salvatore e Muraglia; 3B) dell’Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2015-2021 e nel primo semestre dell’anno 2022.

Figura 4A

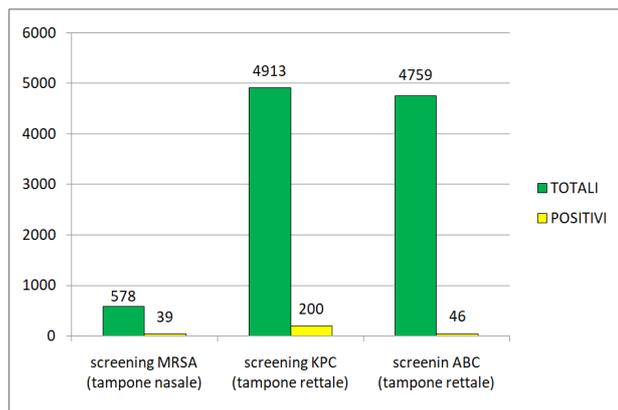


Figura 4B

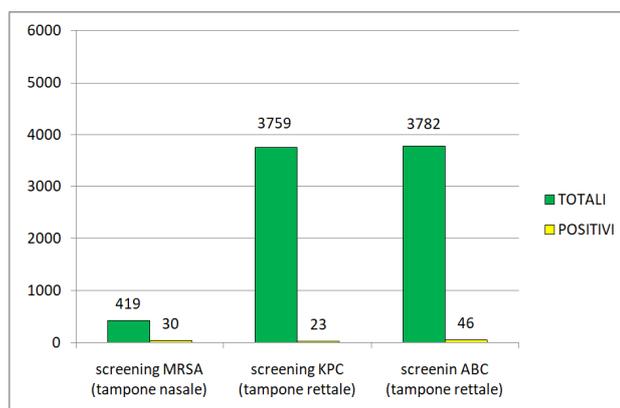


Figura 4C

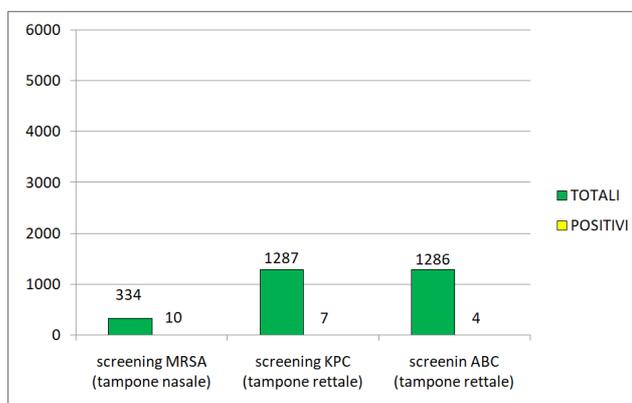


Figura 4 – Distribuzione degli screening per *Staphylococcus aureus* MRSA, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* complex resistenti ai carbapenemi eseguiti presso gli stabilimenti ospedalieri dell’Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti Marche Nord negli anni 2020 (A), 2021 (B) e nel primo semestre dell’anno 2022 (C).

9. Discussione

Le differenze riscontrate negli stabilimenti ospedalieri sono dovute al fatto che nell'Azienda Marche Nord ci sono reparti ospedalieri diversi, dalla UOC di Malattie Infettive e Ematologia di Muraglia, ai reparti chirurgici, con medicina e rianimazioni Covid dell'Ospedale San Salvatore, ai reparti medici, Geriatrici e riabilitativi dell'Ospedale Santa Croce.

Dall'analisi dei dati emerge che l'introduzione puntuale dei test di screening dal 2017 ha contribuito a ridurre e contenere la diffusione dei germi *MultiDrug-Resistant* permettendo di contestualizzare e impostare terapie empiriche rispetto alla circolazione dei microrganismi anche non resistenti attraverso un'analisi attenta dell'epidemiologia locale.

Come riportato nella sessione Risultati negli anni 2015-2022 è stato possibile analizzare l'andamento della frequenza di isolamento dei ceppi di enterobatteri produttori di EBL o resistenti ai carbapenemi e dello *Staphylococcus aureus MRSA* al fine di valutare le opportune azioni correttive (es. applicare i test colturali di screening per sorveglianza attiva di popolazioni target) per contrastare la diffusione degli stessi.

L'introduzione dei test colturali di screening per la sorveglianza dei batteri MultiDrug Resistance in particolare *Staphylococcus aureus MRSA*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii complex* resistenti ai carbapenemi ha permesso di monitorare costantemente l'andamento della circolazione degli stessi in ambiente ospedaliero ma soprattutto di contenere la loro diffusione.

Dall'analisi retrospettiva dei dati emerge che i test di screening sono utili se:

1. applicati a una popolazione selezionata di pazienti target,
2. si considera e valuta criticamente l'epidemiologia locale,
3. si considera l'endemicità di alcuni microrganismi MDRO,
4. si attuano le procedure per il contenimento della diffusione degli MDRO,
5. si ragiona in termini di gestione del paziente in sinergia tra ospedale e territorio,
6. si attuano strategie di *Infection Control* e *Antimicrobial Stewardship*.

Tali test hanno però dei limiti che sono rappresentati dal fatto che:

- ✓ non è facile distinguere tra colonizzazione ed infezione,

- ✓ dobbiamo considerare variabili legate alla corretta modalità di esecuzione e conservazione del prelievo,
- ✓ l'esito dei test è legato alla tipologia e numerosità dei siti indagati,
- ✓ l'esito dei test è dipendente dalla sensibilità e specificità dei test utilizzati (90-98% e 48-100% rispettivamente),
- ✓ dalla carica del microrganismo,
- ✓ dal Turn-Around-Time (TAT), ossia il tempo di risposta per la refertazione dei risultati,
- ✓ dal carico di lavoro per il reparto ed il laboratorio di microbiologia,
- ✓ dalle analisi costo-beneficio.

Dall'analisi dei dati emerge un utilizzo appropriato e puntuale dei test colturali di screening nell'ambito di percorsi diagnostici che hanno lo scopo di contenere e evitare la diffusione dei germi *MultiDrug-Resistant* all'interno di una politica impostata sul contenimento dell'*Infection Control* con un approccio multidisciplinare all'*Antimicrobial Stewardship*.

10. Conclusioni

Le infezioni correlate all'assistenza gravi oltre ad implicare sofferenza per il paziente ed aumento di mortalità, comporta un maggior impiego in valore di risorse umane rispetto ad altri pazienti ed un maggiore impatto in termini di costi. L'approccio multidisciplinare risulta, quindi, di fondamentale importanza al fine di garantire un'ulteriore crescita del *management* sanitario nell'ambito della gestione e controllo della Infezioni Correlate all'Assistenza. Indubbiamente, le condizioni di sovraffollamento, contatto, alterazioni cutanee, superfici contaminate e scarsa pulizia, sottolineano l'importanza della qualità ambientale nella diffusione delle ICA. Infatti, molti patogeni sono in grado di resistere nell'ambiente anche per periodi prolungati, come l'*Acinetobacter*, che è in grado di sopravvivere 30 giorni sulle superfici plastiche e fino a 3 anni sul pavimento, o l'MRSA (*Staphylococcus aureus* meticillino-resistente) che si riscontra nella quota respirabile della polvere e nei bagni anche di degenti non colonizzati. Pertanto, si può sottolineare che l'epidemiologia ambientale locale gioca senza dubbio un ruolo rilevante per quanto riguarda la trasmissione dei patogeni, costituendo un'importante fonte di contagio.

Dall'analisi epidemiologica degli anni 2020-2022 durante la pandemia Covid si è assistito ad un aumento di batterimie da Enterococchi Vancomicina-Resistenti (VRE) in pazienti sottoposti a interventi chirurgici maggiori e pazienti ricoverati nei reparti di Terapia Intensiva. È indiscusso che la gestione del rischio clinico richieda necessariamente una politica focalizzata allo sviluppo di elementi strategici, quali la condivisione e l'integrazione multidisciplinare e multiprofessionale, ma più in particolare, è necessario sottoporre a test di screening tutti quei pazienti ad alto rischio e non estenderli alla popolazione che frequenta l'Azienda.

Secondo i risultati ottenuti dallo studio l'Azienda Ospedaliera Marche Nord non si discosta in modo drastico dalle altre realtà nosocomi.

I test colturali di screening hanno consentito un contenimento delle infezioni, d'altro canto non permette una distinzione tra colonizzazione e infezione del paziente, per questo motivo sarebbe inutilmente dispendioso applicare lo screening a pazienti che non rispettano i requisiti del paziente a rischio. La scelta di questo tipo di esame piuttosto che altri metodi di rilevamento del microrganismo è stata presa in merito all'elevata specificità e sensibilità diagnostica, ma nell'ottica di bilanciare i costi del carico di lavoro in reparto e in laboratorio.

Per quanto riguarda gli approcci futuri prossimi, in seguito ai dati recenti del primo semestre del 2022 si sta valutando l'impiego di test di screening per VRE a tutti quei pazienti che devono essere sottoposti a interventi chirurgici di maggior entità e ai relativi follow-up dei pazienti ricoverati in Terapia Intensiva. In seguito a una valutazione dei costi e dell'efficacia dei test di screening sarà possibile in futuro introdurre l'utilizzo di test molecolari rapidi, in grado di essere refertati entro le 2 ore, per tutti quei pazienti in shock settico al fine di individuare precocemente l'agente eziologico e l'eventuale fenotipo di resistenza.

11. Bibliografia e link utili

¹ C. GLEN MAYHALL; WOLTERS KLUWER HEALTH, LIPPICOTT WILLIAMS & WILKINS - “Fourth edition Hospital Epidemiology and Infection Control”

² Piano Nazionale di Contrasto dell’Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020

³ www.microbiologiaitalia.it

⁴ ECDC NOTA INFORMATIVA - “Gli antibiotici di ultima linea si stanno rivelando inefficaci: opzioni possibili per affrontare questa minaccia imminente per i pazienti e i sistemi sanitari”

⁵ DOCUMENTO APPROVATO DAL CONSIGLIO DIRETTIVO SIMPIOS IL 27 SETTEMBRE 2010 - “I Batteri Gram Negativi Multiresistenti: Un Problema Emergente E Di Attualita’. Indicazioni Gestionali”

⁶ REGIONE AUTONOMA – FRIULI-VENEZIA GIULIA -” GESTIONE DEL RISCHIO CLINICO - Indicazioni per la gestione delle infezioni da enterobatteriaceae resistenti ai carbapenemi”

⁷ Circolare ministeriale 52 del 1985: “Lotta alle infezioni ospedaliere”

⁸ Circolare ministeriale 8 del 1988: “Lotta alle infezioni ospedaliere: la sorveglianza”

⁹ DPR 13 settembre 1988: “Determinazione degli standard del personale ospedaliero”

¹⁰ DM 24 luglio 1995: “Contenuti e modalità degli indicatori di efficienza nel Servizio sanitario nazionale”

¹¹ DEL BUONO R., CUCCINIELLO F., CARASSITI M. – “Screening with oro-rectal surveillance swab in an italian ICU: epidemiological and medico-legal aspects” 2017 Edizioni Minerva Medica

¹² PRANITA D. TAMMA AND PATRICIA J. SIMNER; PUBMED CENTER - “Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates”.

¹³ JOFFREY VAN PREHN*, ANNA M. KAISER, SUZANNE D. VAN DER WERFF, ROSA VAN MANSFELD AND CHRISTINA M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS - “Colonization sites in carriers of ESBL- producing Gram-negative bacteria”

¹⁴ DUCCEL G ET AL. 2002. “Prevention of hospital-acquired infections. A practical guide.” 2nd edition.
<http://www.who.int/csr/resources/publications/whocdscsreph200212.pdf>

¹⁵ CLSI. 2009. “Analysis and presentation of cumulative antimicrobial susceptibility test data; approved guideline.” 3rd ed. CLSI document M39-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute

¹⁶ S. AMBRETTI, C. GAGLIOTTI, F. LUZZARO, P. MALACARNE, A. PAN, B. PIERETTI, C. TASCINI, M. SARTI;” *Microbiologia Medica*” 2015, “Reporting epidemiology of antibiotic resistance.” vol. 30, n.1, 16 pagg.

¹⁷ E TACCONELLI, M A CATALDO, S J DANCER, G DE ANGELIS, M FALCONE, U FRANK, G KAHLMETER, A PAN, N PETROSILLO, J RODRÍGUEZ-BAÑO, N SINGH, M VENDITTI, D S YOKOE, B COOKSON, EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY “ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multi-drug resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients” — 2014 Jan;20.

¹⁸ www.liofilchem.com

¹⁹ *www.corisbio.com*

²⁰ *www.biomerieux.it*

²¹ *E. MATUSCHEK, D. F. J. BROWN AND G. KAHLMETER - “Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories”*

²² *EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 12.0, valid from 2022-01-01*