

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

1.

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie “L. Spallanzani”

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS

Caratterizzazione fenotipica ed epidemiologia di Enterobatteri ESBL-produttori in campioni urinari con particolare attenzione alla fosfomicina

Relatore:
Prof.ssa Maria Rosalia Pasca

Correlatore:
Dott.ssa Antonella Rezzani

Tesi Sperimentale di
Veronica Puleri

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1. INTRODUZIONE 1

1.1. Enterobatteri: caratteristiche generali 1

1.1.1 *Escherichia coli* 4

1.1.2 *Klebsiella pneumoniae* 7

1.1.3 *P. mirabilis* 9

1.2. Le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL): tipi, meccanismi di resistenza 11

1.3 Epidemiologia delle ESBL in Italia 13

1.4 Infezioni delle vie urinarie 14

1.5 Antibiotico-Resistenza 17

1.6 Fosfomicina 21

2. SCOPO DEL LAVORO 26

3. MATERIALI E METODI 28

3.1 Origine dei ceppi urinari 28

3.2 Processamento dei campioni urinari 29

3.3 Lettura e interpretazione delle piastre colturali seminate 32

3.4 Identificazione dei batteri e test di sensibilità antibiotica mediante lo strumento MicroScan WalkAway plus 34

3.5 Interpretazione dei risultati del Microscan e test di conferma fenotipica 40

3.6 Determinazione della sensibilità/resistenza alla fosfomicina mediante il metodo dell'agar diluizione 42

4. RISULTATI E DISCUSSIONE 45

5. CONCLUSIONI 64

6. BIBLIOGRAFIA 66

1. INTRODUZIONE

1.1. Enterobatteri: caratteristiche generali

Le Enterobacteriaceae, note anche come enterobatteri, rappresentano una vasta e diversificata famiglia di batteri Gram-negativi. I loro membri includono sia batteri commensali, normalmente presenti nella flora intestinale dell'uomo e degli animali, sia specie patogene, alcune delle quali si sono strettamente adattate all'ospite umano. Dal punto di vista biologico, gli enterobatteri sono metabolicamente molto attivi e si moltiplicano rapidamente in condizioni sia di aerobiosi sia di anaerobiosi. Questa capacità metabolica ne favorisce la sopravvivenza in diversi ambienti, causando soprattutto infezioni di tipo urinario e gastrointestinali. Inoltre, la loro diffusione nel circolo sanguigno può determinare un grave risposta infiammatoria sistemica, nota come shock endotossico da Gram-negativi.

Tali batteri presentano dimensioni relativamente grandi, con una lunghezza compresa tra 2 e 4 μm, pareti laterali parallele ed estremità arrotondate con una morfologia variabile che va da grandi coccobacilli a bastoncini allungati o filamentosi. Sono asporigeni e non alcool-acido resistenti [1].

Presentano esigenze nutrizionali semplici:

- Fermentano il glucosio;
- Riducono i nitrati in nitriti;
- Risultano catalasi-positivi (ad eccezione del sierotipo 1 di *Shigella dysenteriae*) e ossidasi-negativi.

Inoltre, l'assenza del citocromo C rappresenta un altro elemento chiave per la differenziazione delle *Enterobacterales* da altri bacilli Gram-negativi [2]. In aerobiosi o in ridotta tensione di ossigeno, sono tutti in grado di utilizzare il glucosio per via fermentativa con produzione di acidi e, talora, di gas. Questa proprietà e l'assenza del citocromo c sono caratteri molto importanti per differenziare gli enterobatteri da vari altri bacilli Gram negativi repertabili in materiali patologici umani, i quali sono sempre ossidasi-positivi o in grado di portare a termine una demolizione ossidativa del glucosio.

Tutti gli enterobatteri crescono bene nei comuni terreni di coltura. L'aspetto delle colonie è molto simile per tutte le specie e non costituisce pertanto un carattere utilizzabile in laboratorio per l'identificazione. Le colonie dei batteri del gruppo *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* sono tutte provvisti di una capsula molto evidente che conferisce un aspetto decisamente mucoso. Le colonie dei batteri del gruppo *Proteus* nei terreni solidi tendono ad invadere tutta la superficie disponibile (colonie sciamanti) a causa della notevole mobilità dei batteri stessi e sono spesso caratterizzati da una serie concentrica di zone di crescita, corrispondenti ai diversi cicli riproduttori [3].

I membri della famiglia *Enterobacterales* presentano una struttura antigenica complessa, e possono essere classificati sulla base degli antigeni O, H, K. (Figura 1)

L'**antigene K** corrisponde al polisaccaride capsulare, non costantemente presente; in *Salmonella typhi* è identificato come antigene Vi, ed è spesso coinvolto nella patogenicità [2]. Solo il sottotipo di E. coli K1 possiede l'antigene K ed è generalmente associato a meningiti neonatali. *Citrobacter* e *Proteus* non possiedono antigeni K [4].

L'**antigene H** è costituito dalle proteine flagellari, ed è pertanto assente nei batteri non mobili, quali *Klebsiella* e *Shigella* [2]. L'antigene H essendo di natura proteica è denaturato dal calore.

L'**antigene somatico O** è costituito dalla porzione polisaccaridica del lipopolisaccaride (LPS), localizzato nella membrana esterna dei batteri Gram-negativi. Il LPS rappresenta l'endotossina ed è considerato una dei principali fattori di virulenza. È costituito da tre regioni principali: il **polisaccaride somatico O**, che consente di distinguere i diversi ceppi appartenenti alla stessa specie; il **nucleo polisaccaridico**, relativamente conservato tra gli *Enterobacterales*; e il **lipide A,** responsabile dell'attività endotossica ed è coinvolto nell'insorgenza di manifestazioni sistemiche quali: febbre, leucopenia, attivazione del complemento, coagulazione intravascolare disseminata e shock tossico [5,6] (Fig. 1).

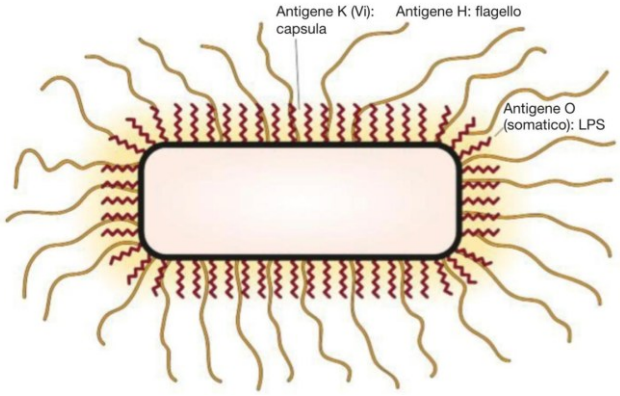

Figura 1. Antigeni della membrana esterna delle *Enterobacterales*.[2]

Oltre all'LPS i batteri posseggono altri fattori di virulenza:

- **Adesine**: pili o fimbrie, macromolecole localizzate sulla superficie cellulare responsabili della loro adesività con la cellula ospite e sono classificati nei tipi 1-4. Ad esempio, i pili di tipo 1 favoriscono l'adesione alle cellule intestinali e permettono ai batteri di resistere alla peristalsi e al normale flusso intestinale. I pili di tipo 2, invece, sono importanti fattori di virulenza e possono favorire la colonizzazione in altri sedi diverse dall'intestino e contribuire allo sviluppo dell'infezione. Un esempio importante è rappresentato dai ceppi di *E. coli* uropatogeni (UPEC). Tali ceppi utilizzano i pili P per legarsi ai P-glicolipidi delle cellule

epiteliali uretrali e renali. Questa capacità di adesione consente quindi al batterio di resistere al flusso dell'urina e di colonizzare il tratto urinario.

- **Invasine**: contribuiscono alla diffusione del patogeno nelle cellule dell'ospite.
- **Capsula:** strato esterno che avvolge il batterio ed è generalmente costituita da polisaccaridi. Se presente, ostacola la fagocitosi, rendendo più difficile il riconoscimento e l'eliminazione del batterio da parte delle cellule immunitarie.
- **Sistemi di secrezione di tipo III e IV: s**ono complessi proteici coinvolti nel trasferimento di specifiche proteine all'interno delle cellule dell'ospite. La secrezione avviene in risposta a segnali ricevuti o dal contatto batterio-cellula ospite o da stimoli ambientali quali, la disponibilità di sostanze nutritive e la concentrazione di Ca2+ [2].

Gli enterobatteri sono responsabili di diverse manifestazioni cliniche, che possono essere suddivise in tre principali categorie:

- **Infezioni sistemiche:** comprendono patologie come il tifo e il paratifo, caratterizzate da una diffusione dell'infezione nell'organismo tramite circolo ematico e/o linfatico.
- **Infezioni intestinali**: sostenute principalmente da *E. coli*, *Salmonella* spp. e *Shigella* spp.; si manifestano come gastroenteriti o enteriti, con sintomi prevalentemente diarroici o dissenterici. Alcuni ceppi di *Salmonella, Shigella,* e particolari varianti di *E. coli*, sono invasivi e determinano infiammazione della mucosa intestinale. Al contrario, i ceppi non invasivi di *E. coli* producono enterotossine che provocano diarrea senza causare danni diretti ai tessuti.

  Le infezioni intestinali sono generalmente di origine esogena e si trasmettono attraverso l'ingestione di alimenti contaminati da materiale fecale di soggetti infetti risultando più frequenti in contesti con condizioni igienico-sanitarie precarie, ma possibili anche in Paesi industrializzati sottoforma di focolai epidemici [5,6].
- **Infezioni extraintestinali**: Al contrario, molte infezioni extraintestinali e sistemiche sono generalmente di origine endogena e derivano da Enterobatteri già presenti nel microbiota intestinale dello stesso individuo. Il microbiota intestinale contribuisce a prevenire la colonizzazione eccessiva da parte di microrganismi potenzialmente patogeni, limitandone la proliferazione. Questo ruolo protettivo è particolarmente importante nei pazienti ospedalizzati e immunocompromessi, soprattutto nei soggetti sottoposti a chemioterapia o a trapianto di cellule staminali ematopoietiche. La somministrazione di antibiotici può alterare l'equilibrio del microbiota intestinale e favorire la selezione e l'espansione di ceppi resistenti. Questi microrganismi possono successivamente attraversare la barriera intestinale e raggiungere il circolo sanguigno, causando infezioni sistemiche [5,7].

E. coli e K. pneumoniae, sono considerati patogeni opportunisti in grado di causare infezioni gravi e potenzialmente letali. L'utilizzo di farmaci è considerata una via efficace per contrastare le infezioni dagli enterobatteri; ma allo stesso tempo l'abuso di antibiotici ha portato ad una resistenza ai farmaci, aumentando di conseguenza le infezioni da Enterobacteriaceae e pertanto, vi è la necessita di trovare nuovi metodi di controllo [8].

In particolare, le specie produttrici di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) sono state definite come patogeni di priorità 1 dall'Organizzazione Mondiale della Sanità. Inoltre, è emerso che la diffusione delle Enterobacteriaceae produttrici di ESBL in ambito domestico (23% per *E. coli* e 25% per *K. pneumoniae*) superano quelli degli ambienti sanitari [9].

1.1.1 Escherichia coli

Il genere *Escherichia* è costituito da cinque specie, ma solamente *E. coli* risulta clinicamente rilevante [2]. Prende il nome dal pediatra tedesco Theodor Escherich, ed è costituito da bacilli Gram-negativi anaerobi facoltativi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae.

E. coli è un bacillo Gram-negativo, con dimensioni di circa 1 μm in lunghezza e 0,35 μm di diametro. Può possedere flagelli peritrichi, strutture filamentose a forma di frusta che consentono al batterio di muoversi nell'ambiente, oppure di pili, in grado di favorire l'adesione alle superfici e ad altre cellule. È un aerobio facoltativo, capace di crescere sia in presenza sia in assenza di ossigeno e su comuni terreni di coltura utilizzati in laboratorio, a temperature comprese tra 30 e 35°C e fermenta il lattosio. Dal punto di vista evolutivo appartiene alla famiglia delle Enterobacteriaceace e mostra una stretta relazione con i batteri patogeni quali *Salmonella*, *Klebsiella*, *Serratia* e *Yersinia pestis*.

Risiede normalmente nell'intestino dei mammiferi, ma può essere rinvenuto, sebbene meno frequentemente, anche nel tratto intestinale di uccelli, rettili e pesci [10].

Nell'intestino dei mammiferi, *E. coli* costituisce una componente del microbiota, sebbene rappresenti genericamente solo una piccola parte della comunità batterica complessiva. L'intestino è infatti un ambiente caratterizzato da una ridotta disponibilità di ossigeno ed è prevalentemente colonizzato da batteri anaerobi obbligati, tra cui Bacteroidota e Bacillota. *E. coli* colonizza soprattutto lo strato di muco che riveste l'epitelio intestinale e presenta generalmente un'abbondanza relativa generalmente limitata, ma variabile tra individui e nel tempo (circa lo 0,1–5%) [11] [12] [13] [14].

Nello strato di muco, *E. coli* vive insieme ad altre specie batteriche e compete con esse i nutrienti disponibili. La capacità di utilizzare un'ampia varietà di nutrienti contribuisce alla sua persistenza nell'intestino, nonostante la continua eliminazione attraverso le feci. La sua concentrazione fecale può variare notevolmente, raggiungendo valori compresi, a seconda dell'individuo e delle condizioni considerate, di circa 10^6–10^9 cellule per grammo di materiale fecale [10,15].

La sua presenza nei mammiferi spiega la sua capacità di metabolizzare il lattosio, caratteristica che ha reso *E. coli* un importante organismo modello per lo studio della regolazione dell'espressione genica.

E. coli, pur facendo parte della normale flora intestinale, può determinare diverse patologie, tra cui malattie diarroiche, colite, peritonite, batteriemia e infezioni del tratto urinario. Alcune infezioni opportunistiche sono causate da ceppi normalmente innocui che diventano patogeni quando infettano pazienti immunodepressi o affetti da altre patologie [10].

Esistono tuttavia ceppi patogeni, dotati di specifici fattori di virulenza in grado di provocare malattia anche in individui sani; questi sono principalmente responsabili delle gastroenteriti [10] e vengono suddivisi in più gruppi:

- *E. coli* enterotossigenico (ETEC).
- *E.coli* enteroemorragico (EHEC), noto come *coli* produttore di tossina Shiga indicato come EHEC/ STEC.
- *E.coli* enteroinvasivo (EIEC).
- *E. coli* enteropatogeno (EPEC).
- *E. coli* enteroaggregante (EAEC).

***E. coli* enterotossigenico (ETEC)**: evidenziato per la prima volta a Calcutta nel 1971[16], causa infezioni diarroiche soprattutto in aree con condizioni igienico-sanitarie sfavorevoli. Colpisce sia i bambini residenti in queste zone sia gli adulti provenienti da altri contesti, determinando la cosiddetta "diarrea del viaggiatore" [2]. Determinano, quindi, una tipica diarrea acquosa con nausea, crampi addominali e febbre di modesta entità. La deplezione idro-salina può essere cospicua e, se non opportunamente corretta, può anche avere esito letale, particolarmente in bambini denutriti [17]. L'infezione richiede un elevato inoculo e si trasmette attraverso l'assunzione di alimenti contaminati da soggetti infetti o portatori asintomatici. I ceppi ETEC sono provvisti di adesine (fimbrie) specifiche per la mucosa intestinale e la loro patogenicità è associata alla produzione di due classi di enterotossine, termolabili (LT) e termostabili (ST). Le enterotossine LT comprendono LT-I e LT-II, mentre le tossine ST comprendono Sta e STb; tra queste, LT-I e Sta sono maggiormente associate alle infezioni nell'uomo. I geni che codificano queste tossine sono localizzati su plasmidi, che possono contenere anche i geni responsabili della produzione dei fattori di colonizzazione, tra cui CFA/I, CFA/II, CFA/III.

***E. coli* enteroemorragico (EHEC):** può causare infezioni gastrointestinali anche gravi e rappresenta una delle principali cause di malattia nei Paesi industrializzati. La sola ingestione di una carica infetta molto bassa, inferiore a 100 batteri, può determinare l'insorgenza dell'infezione. La trasmissione

avviene principalmente tramite il consumo di carne poco cotta, latte non pastorizzato, succhi di frutta o vegetali crudi e acqua contaminata.
I ceppi EHEC producono la tossina Shiga, nota come verotossina per il suo effetto citotossico sulle cellule Vero. Sono presenti due varianti antigenicamente e geneticamente distinte della tossina, Stx-1 e Stx-2, entrambe codificate da batteriofagi lisogeni. Stx-1 è identica alla tossina Shiga prodotta da *Shigella dysenteriae* di tipo 1, mentre la Stx-2 presenta circa il 60% di omologia con Stx-1. Tra i ceppi EHEC, il sierotipo O157:H7 rappresenta uno dei più noti ed è associato allo sviluppo di colite emorragica, caratterizzata da diarrea sanguinolenta e intensi crampi addominali. L'infezione si osserva più frequentemente nei mesi più caldi e nei bambini sotto i 5 anni. Altri sintomi possono comprendere nausea, vomito e, in alcuni casi, febbre. Nei casi più gravi l'infezione può evolvere in sindrome emolitica-uremica (SEU), una condizione grave che può provocare danni ai reni e al sistema nervoso centrale soprattutto in età pediatrica.

***E. coli* enteroinvasivo (EIEC):** l'infezione si manifesta inizialmente con diarrea acquosa e, in alcuni casi può progredire verso una forma dissenterica, con febbre, crampi addominali e presenza di sangue nelle feci. Questi ceppi sono caratterizzati dalla capacità di invadere l'epitelio intestinale, in particolare il colon, determinando il danneggiamento delle cellule epiteliali con conseguente formazione di ulcerazioni. L'infezione viene generalmente acquisita attraverso il consumo di alimenti o acqua contaminati. Il trattamento prevede principalmente il mantenimento di un'adeguata idratazione; nei casi più gravi o complicati può essere valutata la terapia antibiotica. La prevenzione si basa sull'adozione di corrette pratiche igienico-sanitarie, tra cui il lavaggio accurato delle mani, la corretta manipolazione e cottura degli alimenti e il consumo di acqua sicura [2].

***E. coli* enteropatogeno (EPEC):** si sviluppa prevalentemente nei bambini e, più raramente, negli adolescenti e negli adulti nei Paesi a basso reddito. Sono provvisti di una peculiare adesività localizzata. questa caratteristica è legata alla presenza, nel microrganismo, di un fattore EAF (EPEC adherence factor) corrispondente ad una proteina della membrana di 94 KDa codificata da un plasmide [18]. Il batterio aderisce all'epitelio dell'intestino tenue determinando la distruzione dei microvilli. Questa alterazione della superficie epiteliale compromette la funzione intestinale e può determinare diarrea acquosa, con rischio di disidratazione nei casi più gravi.

***E. coli* enteroaggregante (EAEC):** nei bambini provoca diarrea acquosa persistente, vomito e disidratazione. Questi ceppi tendono ad aggregarsi secondo una caratteristica disposizione definita a "mattoni ammassati", mediata dalla produzione di fimbrie aggreganti di aderenza I e II (AAF/I e AAF/II), codificate da geni localizzati su plasmidi, l'adesione dei ceppi EAEC alla mucosa intestinale

stimola inoltre la produzione di muco formando uno strato di biofilm sull'epitelio dell'intestino tenue [2].

Oltre ai ceppi responsabili delle infezioni gastrointestinali, *E. coli* comprende ceppi patogeni definiti extraintestinali (ExPEC), capaci di colonizzare e causare infezioni in sedi al di fuori del tratto digerente. Gli ExPEC comprendono quattro patotipi, classificati in base al rispettivo sito di isolamento e caratterizzati da specifici meccanismi di virulenza che ne favoriscono la capacità di causare infezioni [19] [20]. Tra questi, gli *E. coli* uropatogeni (UPEC) rappresentano i principali agenti eziologici delle infezioni del tratto urinario (ITU). Questi ceppi possiedono specifici fattori di virulenza che ne favoriscono la colonizzazione a livello delle vie urinarie. Tra i principali fattori di virulenza vi sono le adesine**,** tra cui i pili di tipo 1, pili P, AAF/II, AAF/IIIV e Dr, che consentono al batterio di aderire alle cellule epiteliali della vescica e delle vie urinarie superiori. Un ulteriore fattore di virulenza è rappresentato dall'emolisina HlyA, in grado di provocare la lisi degli eritrociti e di altre tipologie cellulari, contribuendo al danno cellulare e alla modulazione della risposta infiammatoria dell'ospite [2]. La capacità degli UPEC di aderire all'epitelio, colonizzare il tratto urinario e persistere nell'ospite può favorire la comparsa di infezioni ricorrenti, rendendo il trattamento particolarmente complesso. La gestione delle ITU si basa principalmente sulla terapia antibiotica, mentre nei casi più complessi è necessario l'intervento chirurgico [21].

1.1.2 Klebsiella pneumoniae

K. pneumoniae, appartiene alla famiglia delle *Enterobacterales* ed è la specie più rappresentativa del genere *Klebsiella*. È un batterio Gram-negativo, di piccole dimensioni (0,5-2 μm), con morfologia bastoncellare corta, capsulato, asporigeno e privo di motilità. Dal punto di vista biochimico, *K. pneumoniae* è in grado di metabolizzare diversi carboidrati, incluso il lattosio, con produzione di acido e gas [22]. Inoltre, su terreno agarizzato, il batterio assume un caratteristico aspetto mucoide grazie alla presenza della capsula polisaccaridica associata alla membrana esterna batterica.
Fu descritta per la prima volta nel 1882 da Carl Friedlander che ne identificò la presenza nei polmoni di pazienti deceduti a causa di polmonite. I batteri appartenenti al genere *Klebsiella* sono ampiamente diffusi in natura e possono essere rinvenuti in numerosi habitat, inclusi piante, animali e uomo. È coinvolta nello sviluppo di diverse infezioni umane, quali polmoniti, infezioni del tratto urinario (IVU) e infezioni sistemiche del sangue. In particolare, le infezioni delle vie urinarie correlate all'uso del catetere (CAUTI) risultano facilitate dalla capacità del batterio di aderire alle superfici dei dispositivi medici e di formare biofilm. In ambiente ospedaliero esistono molteplici potenziali vie di trasmissione di *K.* p*neumoniae;* tra queste, il contatto diretto tra gli operatori sanitari e pazienti riveste

un ruolo centrale, con le mani del personale sanitario che rappresentano una delle principali fonti di diffusione [23].

Nel corso del tempo, *K. pneumoniae* ha subito una significativa evoluzione in termini di virulenza e resistenza antimicrobica, dando origine a diverse varianti, tra cui; *K. pneumoniae* classica (cKP), *K. pneumoniae ipervirulenta (*hvKP) e *K. pneumoniae* multiresistente (MDR).

La cKP rappresenta la forma più diffusa ed è tipicamente associata a infezioni acquisite in ambito ospedaliero, interessando soprattutto soggetti con patologie croniche o immunocompromessi. Al contrario, la hvKP è prevalentemente responsabile di infezioni comunitarie, quali ascessi epatici piogenici, endoftalmite e meningite in soggetti giovani e precedentemente sani. L'elevata virulenza della hvKP è legata alla sua marcata capacità di invasione e di sopravvivenza nell'ospite, legata alla produzione di vari fattori di virulenza del ceppo. Tra i principali fattori di virulenza di *K. pneumoniae* rientrano la capsula, il LPS, le fimbrie, i pili e i siderofori [24].

La **capsula polisaccaridica** rappresenta uno dei principali meccanismi di evasione immunitaria per aiutare a eludere il sistema immunitario durante l'infezione, preservando i batteri dall'opsonofagocitosi e dall'azione dei fattori sierici battericidi [23] [25]. Essa è costituita da polisaccaridi complessi formati da 4 a 6 zuccheri, tra cui l'acido uronico, uno dei componenti più diffusi [26]. Tra i sierotipi capsulari, K1, K2, K4 e K5 sono considerati i più virulenti e sono associati a numerose malattie invasive; in particolare, il sierotipo K2 risulta essere il più aggressivo ed è frequentemente isolato in casi di infezioni urinarie, polmoniti e batteriemie [27].

Il **lipopolisaccaride (LPS),** comunemente definito endotossina, costituisce un elemento strutturale essenziale della membrana esterna dei batteri Gram- negativi. Il riconoscimento dell'LPS da parte dell'ospite attraverso il recettore Toll-like 4 (TLR4) determina l'attivazione di una potente risposta infiammatoria [28], che può contribuire allo sviluppo della sepsi e dello shock settico. Dal punto di vista strutturale il LPS è composto dal lipide A, da un dominio centrale e dall'antigeno O. Le differenze nella struttura dell'antigene O permettono la classificazione dei batteri in diversi sierotipi O; in particolare, sono stati identificati nove sierotipi O principali, dei quali O1, O2, O3 risultano responsabili di circa l'80% delle infezioni da *Klebsiella* spp.

I **pili** sono strutture filamentose che si estendono dalla superficie cellulare batterica e possono raggiungere una lunghezza fino a 10 µm [23]. In *Klebsiella* spp. si distinguono principalmente due classi di pili: pili di tipo 1 (*fim)* e pili di tipo 3 (*mrk*). I pili di tipo 1 sono coinvolti nell'adesione alle superfici mucosali e contribuiscono alla virulenza, mentre i pili di tipo 3 oltre a mediare l'adesione alle cellule ospiti, svolgono un ruolo chiave nella formazione del biofilm [29].

I **siderofori** sono molecole capaci di chelare il ferro, un elemento essenziale per la crescita batterica. *Klebsiella* spp. produce diversi siderofori, tra cui l'enterobactina (ent), un sideroforo catecolato ampiamente diffuso [23]. Poiché ent è comune a molti batteri, il sistema immunitario dell'ospite ha

sviluppato meccanismi per sequestrala, limitando così la disponibilità di ferro [30]. In risposta, i batteri hanno sviluppato altri siderofori come la salmochelina, un derivato glucosilato dell'enterobactina, in grado di eludere tali meccanismi di difesa [31]. (Figura 2)
Infine, la presenza di pompe di efflusso, contribuisce alla resistenza agli antibiotici e il sistema di secrezione di tipo VI, una struttura ancorata alla membrana, consente il trasferimento di molecole effettrici e tossine verso cellule bersaglio [23].

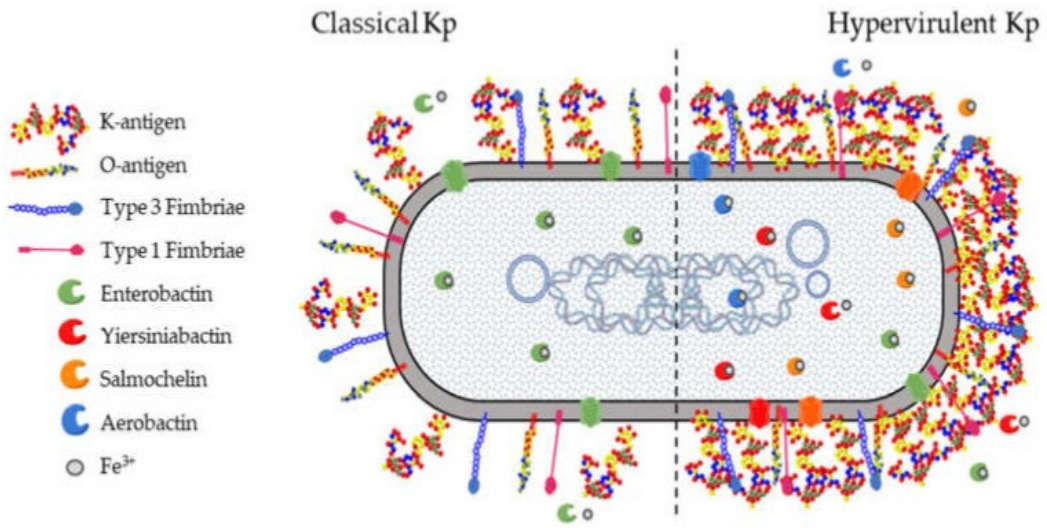

Figura 2. Fattori di virulenza negli isolati di *K. pneumoniae*. [32]

Accanto all'acquisizione di numerosi fattori di virulenza, l'impiego diffuso degli antibiotici in ambito clinico ha esercitato una forte pressione selettiva su *K. pneumoniae*, favorendo l'emergere e la diffusione dei ceppi multiresistenti (MDR) [24]. Tali ceppi sono infatti portatori di un'ampia varietà di geni di resistenza antimicrobica, che conferiscono al batterio la capacità di eludere l'azione di numeri antibiotici comunemente utilizzati. Tra i principali meccanismi di resistenza rientra la produzione di β-lattamasi, in particolare le β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), le cefalosporinasi e le carbapenemasi [33].

1.1.3 P. mirabilis

P. mirabilis è un batterio Gram-negativo appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae. È un batterio di forma bastoncellare e anaerobio facoltativo. Si distingue da molti altri batteri per la sua capacità di muoversi e diffondersi rapidamente sui terreni di coltura (swarming). È spesso coinvolto nelle infezioni urinarie, soprattutto in persone che presentano anomalie strutturali o funzionali dell'apparato urinario [34]. Le infezioni sono particolarmente frequenti nei pazienti portatori di catetere vescicale, poiché il batterio può risalire facilmente verso le vie urinarie. Il microrganismo

può colonizzare inizialmente l'intestino e successivamente raggiungere la regione periuretrale. Questa colonizzazione può portare alla contaminazione del catetere e favorire lo sviluppo di infezioni ospedaliere.

Tra le specie del genere *Proteus* più associate alle infezioni urinarie vi sono *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *P. penneri*. In particolare, *P. mirabilis* rappresenta una delle cause di infezioni urinarie complicate ed è una delle cause più frequenti di batteriuria nei pazienti con catetere a lungo termine.

Alcuni studi hanno dimostrato che questo batterio è in grado di aderire a diversi materiali utilizzati per i cateteri, come silicone e plastica. Per riuscire ad attaccarsi a queste superfici, produce diversi fattori di adesione, tra cui fimbrie, emoagglutinina, flagelli, emolisina e proteasi dell'immunoglobulina A [35].

In particolare, i flagelli hanno un ruolo centrale perché permettono al batterio di muoversi, aderire alle cellule dell'ospite e diffondersi nei tessuti. Inoltre, aiutano il microrganismo a riconoscere e adattarsi all'ambiente esterno. Nelle specie di *Proteus* è tipico il fenomeno della "sciamatura" (Figura 3). Si tratta di un processo che consente ai batteri di muoversi in modo coordinato su superfici solide e di espandersi rapidamente in nuove aree. Quando crescono in ambiente liquido, questi batteri si presentano come bastoncelli singoli, mobili, lunghi circa 1-2 μm, dotati di numerosi flagelli distribuiti sulla superficie, che permettono loro di nuotare.

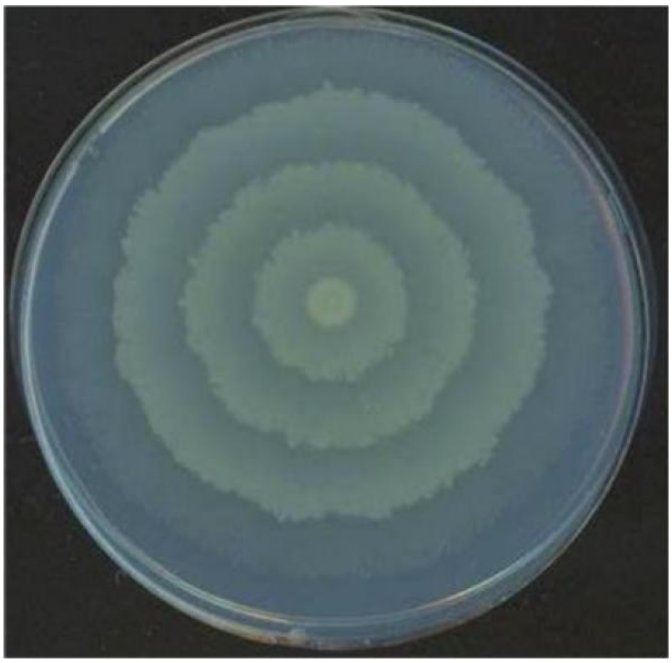

Figura 3. Fenomeno dello sciame. [36]

Tuttavia, quando vengono trasferiti su una superficie solida, si trasformano in cellule più lunghe, diventano multinucleate e capaci di muoversi in gruppo. Queste cellule allungate, lunghe anche 20-

80 μm, migrano rapidamente dal punto iniziale di crescita grazie a un movimento altamente coordinato, reso possibile dalla stretta interazione tra le cellule [35].

È importante sottolineare che *P. mirabilis* produce un enzima chiamato ureasi, attivato in presenza di urea. Questo enzima scinde l'urea in ammoniaca e anidride carbonica. La produzione di ammoniaca determina un aumento del pH urinario, rendendo l'ambiente più alcalino. Un pH più alto favorisce la formazione di cristalli di sali di calcio e magnesio, normalmente sciolti nelle urine, con conseguente formazione di cristalli di struvite e carbonato di idrossiapatite (ovvero formazione di calcoli) [37] [38], una caratteristica tipica delle infezioni sostenute da *P. mirabilis*. La presenza dei calcoli offre diversi vantaggi al batterio; in particolare, consente ai microrganismi di annidarsi al loro interno, proteggendosi dall'azione del sistema immunitario e facilitando la loro moltiplicazione. Inoltre, i calcoli possono ostacolare il normale flusso dell'urina negli ureteri, creando un ambiente ricco di nutrienti e favorendo danni ai tessuti sia per l'azione dell'ammoniaca sia per l'ostruzione meccanica. Sebbene *P. mirabilis* sia generalmente sensibile a molti antibiotici utilizzati nel trattamento delle infezioni urinarie, l'eradicazione completa può risultare difficile proprio a causa della formazione di calcoli, cicatrici renali e cateteri permanenti. Per questo motivo, le infezioni possono diventare croniche o recidivanti [38].

Oltre alle infezioni del tratto urinario, *P. mirabilis* può causare problemi in altre parti del corpo, come tratto respiratorio, occhi, orecchie, naso, pelle, gola, ustioni e ferite. Inoltre, è stato associato a meningoencefalite neonatale, empiema e osteomielite [36].

1.2. Le beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL): tipi, meccanismi di resistenza

Le β-lattamasi a spettro esteso (Extended-Spectrum β-Lactamases, ESBL) rappresentano un'importante categoria di enzimi prodotti dai batteri Gram-negativi, in grado di conferire resistenza a numerosi antibiotici β-lattamici, in particolare alla penicillina, cefalosporine di prima, seconda e terza generazione e ai monobattami, ma non le cefamicine o i carbapenemi. Sono inibite dall'acido clavulanico (sulbactam o tazobactam) e i determinanti genetici sono generalmente associati a plasmidi ma spesso causano co-resistenza (aminoglicosidi, chinoloni) [39].

Gli antibiotici β-lattamici agiscono a basse concentrazioni interferendo con la sintesi della parete cellulare batterica. In particolare, inibiscono gli enzimi coinvolti nella formazione del peptidoglicano, tra cui transpeptidasi, endopeptidasi e carbossipeptidasi, noti complessivamente come Penicillin Binding Proteins (PBP). Questi enzimi sono fondamentali per la formazione dei legami peptidici che conferiscono stabilità alla parete batterica. Durante la fase di attiva replicazione, i β-lattamici si legano alle PBP presenti sulla superficie del batterio e acilano un residuo di serina nel sito attivo dell'enzima, determinando la formazione di un complesso inattivo. L'inibizione delle PBP

compromette la sintesi del peptidoglicano, indebolendo la struttura della parete cellulare. Questo processo induce inoltre l'attivazione di autolisine, enzimi che degradano ulteriormente la parete batterica, portando infine alla lisi e alla morte del microrganismo.

Tuttavia, i batteri possono sviluppare diversi meccanismi di resistenza nei confronti degli antibiotici β-lattamici. In primo luogo, possono ridurre o impedire l'interazione tra l'antibiotico e le PBP bersaglio, ad esempio attraverso modifiche strutturali delle stesse PBP, che ne riducono l'affinità per il farmaco. In secondo luogo, possono limitare l'accesso dell'antibiotico al sito d'azione, ad esempio mediante una ridotta permeabilità della membrana o l'attivazione di sistemi di efflusso. Infine, uno dei meccanismi più rilevanti è rappresentato dalla produzione di enzimi batterici, le β-lattamasi, in grado di idrolizzare l'anello β-lattamico dell'antibiotico, inattivandolo prima che possa esercitare la sua azione [40].

Le β-lattamasi possono essere classificate secondo due principali sistemi, basati rispettivamente su criteri molecolari e funzionali: la classificazione di Ambler e quella di Bush -Jacoby-Medeiros.

La classificazione di Ambler si fonda sulla struttura molecolare dell'enzima e sulla sequenza amminoacidica, suddividendo le β-lattamasi in quattro classi principali (A, B, C, e D). Le classi A, C, D comprendono enzimi a serina, mentre la classe B include le metallo-β-lattamasi. Le ESBL, tra cui TEM, SHV e CTX-M, appartengono prevalentemente alla classe A. La classificazione di Bush - Jacoby-Medeiros, invece, si basa su criteri funzionali (substrato e sensibilità agli inibitori). In questo sistema, le ESBL sono generalmente incluse nel gruppo 2be, caratterizzato da enzimi in grado di idrolizzare cefalosporine a spettro esteso e inibiti dall'acido clavulanico [41].

Tra le principali famiglie di ESBL si distinguono le varianti **TEM, SHV e CTX-M,** che differiscono per origine evolutiva, caratteristiche molecolari e diffusione epidemiologica [39].

Le β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) di tipo TEM derivano principalmente dagli enzimi TEM-1 e TEM-2. Il TEM-1 è stato identificato per la prima volta nel 1965 in un isolato di *E. coli* proveniente da un paziente greco, da cui deriva il nome dell'enzima [42]. Questo enzima è in grado di idrolizzare efficacemente l'ampicillina e, in misura minore altre penicilline, mentre mostra un'attività molto limitata nei confronti delle cefalosporine a spettro esteso. Inoltre, risulta sensibile all'inibizione dell'acido clavulanico. Il TEM-2 presenta un profilo di attività simile a quello del TEM-1, ma si differenzia per alcune caratteristiche molecolari, tra cui una maggiore attività del promotore e una lieve variazione del punto isoelettrico [43]. Le β-lattamasi di tipo TEM sono diffuse principalmente tra i batteri della famiglia delle Enterobacteriaceae, in particolare *E. coli* e *K. pneumoniae*, ma sono state riscontrate anche in altre specie, tra cui *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp.[39] e, più raramente, in batteri non appartenenti a questa famiglia, come *Pseudomonas aeruginosa* [44].

Le β-lattamasi di tipo SHV derivano dal gene progenitore *blaSHV*, localizzato originariamente sul cromosoma di *K. pneumoniae*. Ad oggi sono state identificate oltre 230 varianti enzimatiche appartenenti a questo gruppo.

Le β-lattamasi di tipo CTX-M prendono il nome dalla loro elevata capacità di idrolizzare la cefotaxime. Ad oggi sono note più di 250 varianti, suddivise in cinque principali sottogruppi (CTX-M-1, -2, -8, -9 e -25). Questi enzimi sono stati descritti per la prima volta alla fine degli anni '80 in diverse aree geografiche, tra cui Giappone, Germania e Argentina. A partire dagli anni 2000, le CTX-M hanno mostrato una rapida diffusione a livello globale, in particolare in Europa, dove risultano frequentemente associate a *E. coli* anche in ambito comunitario. Attualmente, *E. coli* rappresenta il principale produttore di CTX-M, seguito da altre Enterobacteriaceae come *K. pneumoniae, Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Morganella morganii*.

Oltre alle principali famiglie, sono stati descritti anche altri enzimi ESBL meno frequenti, tra cui OXA, VEB, PER, BES, TLA, SFO, IBC e GES. Sebbene meno diffusi, alcuni di questi enzimi sono stati associati a episodi epidemici, evidenziando il loro potenziale impatto clinico ed epidemiologico [39]. Le usuali opzioni terapeutiche di prima linea, ovvero penicilline e cefalosporine, sono inefficaci *in vitro* contro i ceppi di *E. coli* e *K. pneumoniae* produttori di ESBL, e la co-resistenza ad altri agenti restringe ulteriormente le possibilità terapeutiche. I carbapenemi rappresentano l'opzione terapeutica più affidabile e, nei casi gravi, l'unica; tuttavia, è necessario un loro uso oculato per evitare lo sviluppo di patogeni produttori di carbapenemasi.

Data la limitata disponibilità di nuovi agenti per i patogeni Gram-negativi resistenti, si sono cercate alternative tra gli antibiotici di uso comune e quelli trascurati, ma potenzialmente attivi. Alcuni antibiotici di vecchia generazione, appartenenti a classi particolari, come la fosfomicina e la nitrofurantoina, hanno mantenuto la loro attività contro *E. coli* produttore di ESBL e *K. pneumoniae*, e sono riemersi come opzioni per il trattamento delle infezioni del tratto urinario [45].

1.3 Epidemiologia delle ESBL in Italia

L'epidemiologia delle *Enterobacterales* produttrici di β-lattamasi a spettro esteso in Italia rappresenta oggi un problema consolidato e in continua evoluzione. Un contributo fondamentale alla comprensione di questo fenomeno deriva da un'indagine nazionale nel 2003, i cui risultati hanno evidenziato come gli enzimi CTX-M fossero già ampiamente diffusi sul territorio italiano, soprattutto in *E. coli* e, in misura minore, in *K. pneumoniae*. Lo studio, basato su isolati clinici non duplicati raccolti in 11 ospedali universitari distribuiti sul territorio italiano, ha documentato la presenza, di tali enzimi, sottolineando il loro ruolo emergente nel contesto europeo, contribuendo a definire l'Italia come uno dei Paesi europei maggiormente coinvolti nella diffusione delle ESBL [46].

Sebbene inizialmente meno diffusi rispetto agli enzimi TEM e SHV [47,48], i CTX-M oggi sono i principali responsabili della resistenza agli antibiotici β- lattamici negli *Enterobacterales*. La loro ampia diffusione è legata alla presenza dei geni *blaCTX*-M su plasmidi trasferibili, che facilitano il passaggio di questi determinanti tra diversi batteri. Tra le varianti più comuni in Europa si trovano CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15.

Le infezioni sostenute da Enterobatteri produttori di ESBL sono associate a un aumento significativo di morbilità, mortalità e costi sanitari, rendendo questo fenomeno di grande rilevanza clinica ed epidemiologica [46].

Altri studi condotti in ambito ospedaliero, in particolare a Roma hanno evidenziato un'elevata diffusione di ceppi di *E. coli* produttori di CTX-M-15, spesso correlati tra loro dal punto di vista genetico, suggerendo una trasmissione diretta tra pazienti e quindi una diffusione intraospedaliera. Questo contribuisce alla comparsa sia di focolai epidemici sia di infezioni sporadiche [49].

Negli anni più recenti, l'epidemiologia delle ESBL è stata interpretata secondo un approccio integrato "One Health", che considera l'interconnessione tra uomo, animali e ambiente. In tale contesto si è dimostrato la presenza di *E. coli* produttori di ESBL sia in infezioni umane extraintestinali sia in animali destinati alla produzione alimentare in Italia. Lo studio ha dimostrato la predominanza degli enzimi di tipo CTX-M in entrambe le popolazioni, evidenziando tuttavia una maggiore eterogeneità negli isolati animali, nei quali sono stati riscontrati anche enzimi SHV e CMY-2 [50].

Ulteriori evidenze confermano la presenza di *Enterobacterales* produttori di ESBL in ambito veterinario. In particolare, ceppi di *K. pneumoniae* produttori di ESBL sono stati identificati in casi di mastite bovina in Italia, mostrando caratteristiche genetiche comparabili a quelle degli isolati clinici umani. Questo dato rafforza l'ipotesi che gli animali possano rappresentare un potenziale serbatoio di resistenza e contribuire alla diffusione dei determinanti ESBL lungo la filiera alimentare e ambientale [51].

1.4 Infezioni delle vie urinarie

Le infezioni delle vie urinarie (IVU) rappresentano una delle infezioni batteriche più diffuse al mondo e rappresentano un importante problema di salute pubblica. Nei Paesi in via di sviluppo, occupano il secondo posto dopo quelle del tratto respiratorio inferiore, costituendo una quota significativa dei casi. Le manifestazioni cliniche sono estremamente variabili: alcune persone non presentano alcun sintomo, mentre altre possono sviluppare febbre, malessere generale, e nei casi più gravi, diffusione dell'infezione nel circolo ematico [21].

Per una corretta gestione clinica, le infezioni del tratto urinario possono essere classificate secondo diversi criteri. Tra i sistemi più utilizzati vi è la classificazione ORENUC, proposta dall'European Association of Urology che tiene conto dei seguenti fattori:

- presentazione clinica;
- sede anatomica dell'infezione;
- gravità del quadro clinico:
- presenza di fattori di rischio;
- possibilità di instaurare una terapia antimicrobica appropriata.

In base a tale classificazione, le IVU si distinguono in:

- *IVU non complicate*: comprendono infezioni acute, sporadiche o ricorrenti che interessano le basse vie urinarie, come la cistite, o le alte vie urinarie, come la pielonefrite, e si verificano in donne non gravide in assenza di anomalie anatomiche o funzionali del tratto urinario e di comorbilità rilevanti.
- *IVU complicate*: includono tutte le infezioni che non rientrano nella definizione precedente e che si verificano in pazienti con un aumentato rischio di complicanze, come donne in gravidanza, pazienti con malattie renali o condizioni di immunodepressione.
- *IVU ricorrenti*: infezioni, complicate e non complicate, che si ripresentano con una frequenza di almeno tre episodi l'anno.
- *IVU associate al catetere*: infezioni che insorgono in pazienti portatori di catetere vescicale o sottoposti a recente cateterizzazione.
- *Urosepsi*: disfunzione d'organo potenzialmente letale causata da una risposta infiammatoria sistemica disregolata secondaria a un'infezione delle vie urinarie o dei genitali maschili.
- *Batteriuria asintomatica*: presenza di batteri nelle urine in assenza di sintomi clinici [52](Figura 4.)

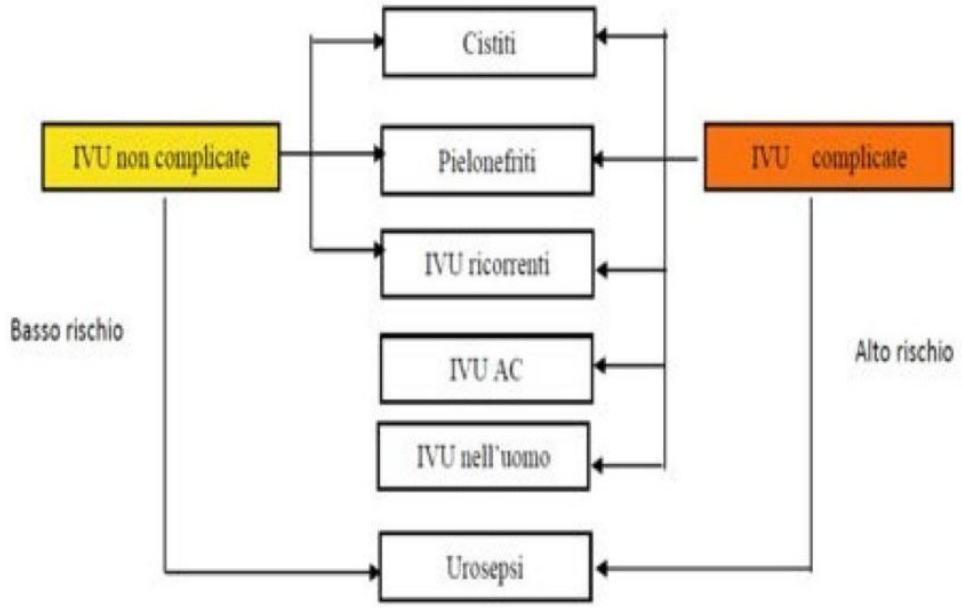

Figura 4. Rappresentazione schematica delle IVU complicate e non complicate. [52]

Dal punto di vista clinico, le principali manifestazioni cliniche associate alle IVU includono:

- **Pielonefrite acuta;**
- **Cistite acuta;**
- **Batteriuria asintomatica**.

La **pielonefrite acuta** è un'infezione che interessa il rene. Si manifesta generalmente con batteriuria, piuria, febbre elevata, dolore al fianco, e può associarsi a sintomi tipici della cistite[21]. Clinicamente si evidenza spesso una marcata sensibilità nella regione lombare in corrispondenza dell'angolo costo-vertebrale. In presenza di fattori predisponenti, come ostruzione delle vie urinarie, reflusso vescico-uretrale o disfunzioni della vescica, l'infezione può diventare più persistente e più complicata, con possibile evoluzione verso necrosi papillare e progressiva compromissione della funzione renale. La migrazione di calcoli o materiale necrotico lungo l'uretere può determinare un intenso dolore al fianco con irritazione all'inguine [1,53].

La **cistite acuta** rappresenta la forma più comune di infezione urinaria ed è caratterizzata da sintomi irritativi quali bruciore durante la minzione (disuria), dolore sovrapubico, senso di peso addominale inferiore e talvolta urine maleodoranti. A differenza della pielonefrite, la cistite acuta non è generalmente associata a febbre o a segni sistemici; tali manifestazioni sono possibili in caso di coinvolgimento del rene. Da un punto di vista patogenetico, la sintomatologia è causata da una irritazione della mucosa vescicale e uretrale [1,21].

La **batteriuria asintomatica** è caratterizzata dalla presenza di batteri nelle urine in assenza di sintomi clinici. Nelle donne, la diagnosi richiede due campioni consecutivi positivi di mitto intermedio con carica $>10^5$ UFC/mL, mentre negli uomini è sufficiente un singolo riscontro positivo. In assenza di particolari fattori di rischio, questa condizione non richiede trattamento, poiché può avere un ruolo protettivo nei confronti di sovrainfezioni; la terapia è indicata solo nel momento i cui sussistono tali fattori di rischio [52,53].

Alcune categorie di soggetti, tra cui donne in gravidanza o in menopausa, anziani, diabetici e bambini prepuberali, presentano una maggiore suscettibilità alle IVU, con un aumentato rischio di coinvolgimento delle alte vie urinarie. Durate la gravidanza, le recidive possono comportare conseguenze rilevanti per la madre e il feto. Nelle donne in menopausa, la riduzione dei livelli di estrogeni determina alterazioni dell'epitelio e del microbioma urogenitale, favorendo la comparsa di infezioni ricorrenti. Tra i principali fattori predisponenti figurano la disfunzione vescicale e intestinale e il reflusso vescicouretrale soprattutto quando si verificano contemporaneamente.

Dal punto di vista epidemiologico, il principale agente eziologico delle IVU non complicate è *E. coli*, responsabile di circa il 75% dei casi. Tuttavia, sono presenti altri microrganismi opportunisti che possono essere coinvolti nelle infezioni del tratto urinario come *K. pneumoniae, Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus faecalis, Streptococcus agalactiae* e *P. mirabilis* [21].

In ambito sanitario, il cateterismo vescicale rappresenta un importante fattore di rischio per IVU complicate. Le infezioni associate a catetere (CAUTI) costituiscono una quota significativa delle infezioni correlate all'assistenza sanitaria. Sebbene frequentemente asintomatiche, esse possono manifestarsi con febbre, brividi, malessere generale o sintomi riconducibili a cistite o pielonefrite, soprattutto dopo la rimozione del dispositivo. Il catetere vescicale, pur essendo necessario per il monitoraggio della diuresi o per la gestione della ritenzione urinaria, rappresenta una via diretta di accesso per i microrganismi provenienti dall'ambiente esterno o dalla flora cutanea. Il rischio di infezione aumenta con la durata del cateterismo e l'inserimento non corretto del catetere [54].

L'elevata incidenza delle IVU, la frequente comparsa di recidive e il progressivo aumento della resistenza agli antibiotici tra gli uropatogeni evidenziano la necessità di sviluppare strategie diagnostiche, terapeutiche e preventive sempre più efficaci, al fine di ridurre l'impatto di queste infezioni sulla salute pubblica [53].

1.5 Antibiotico-Resistenza

L'introduzione del Salvarsan nel 1910 per il trattamento della sifilide segnò l'inizio dell'era moderna della terapia antimicrobica. Da quel momento, in poco più di un secolo, gli antibiotici hanno

rivoluzionato la medicina, contribuendo in maniera significativa alla riduzione della mortalità per infezioni e all'aumento dell'aspettativa di vita di oltre vent'anni.

Un punto di svolta fondamentale fu rappresentato dalla scoperta della penicillina nel 1928 che diede avvio a un periodo di intensa innovazione scientifica, noto come "età d'oro" degli antibiotici, durante il quale furono identificate numerose molecole antibatteriche [55].

Il termine antibiotico, derivante dal greco anti ("contro") e bios ("vita"), indica un composto naturale o sintetico in grado di inibire la crescita dei batteri (azione batteriostatica) o di eliminarli (azione battericida). Una caratteristica di questi farmaci è la tossicità selettiva, che consente di colpire specificatamente il microrganismo patogeno senza danneggiare in modo significativo l'organismo ospite. Ciò è possibile grazie al fatto che gli antibiotici agiscono su bersagli peculiari delle cellule batteriche, come componenti strutturali o processi metabolici, differenti da quelli delle cellule umane [1]. L'impatto degli antibiotici nella pratica medica è stato straordinario. Oltre a rendere curabili numerose infezioni, hanno permesso lo sviluppo e la sicurezza di procedure complesse come trapianti d'organo, terapie oncologiche e interventi cardiochirurgici, che richiedono un'efficace profilassi antimicrobica [55].

Nonostante ciò, emersero preoccupazioni legate all'uso improprio degli antibiotici. Durante il discorso per il premio Nobel nel 1945, Artur Fleming mise in guardia la comunità scientifica del rischio di favorire lo sviluppo di antibiotico-resistenze attraverso un utilizzo inadeguato degli antibiotici, sottolineando come dosaggi insufficienti o trattamenti non necessari potessero selezionare batteri più resistenti. Oggi, questa previsione è stata concretizzata dall'OMS nell'ambito di sensibilizzazione internazionali [56].

L'antibiotico- resistenza si configura infatti come un problema complesso che coinvolge non solo la pratica clinica, ma anche i pazienti e l'intero sistema sanitario. L'uso scorretto degli antibiotici come: l'assunzione senza reale necessità, l'interruzione precoce della terapia o l'impiego di dosaggi non adeguati, contribuisce alla selezione di ceppi batterici resistenti. Inoltre, la diffusione di tali microrganismi è facilitata da condizioni igieniche non ottimali, in particolare negli ambienti ospedalieri. Le conseguenze cliniche sono rilevanti e comprendono un aumento della difficoltà terapeutica, trattamenti più lunghi e costosi e un maggiore rischio di complicanze per il paziente [57].

L'aumento della resistenza antimicrobica, che coinvolge sia i batteri Gram-positivi sia quelli Gram-negativi, ha reso necessario stabilire criteri per classificare i microrganismi in base al loro profilo di antibiotico-resistenza, al fine di raccogliere e confrontare in modo affidabile i dati epidemiologici.

Si distinguono tre categorie principali:

- **MDR (Multidrug-resistant):** condizione in cui un microrganismo presenta resistenza ad almeno un agente antimicrobico appartenente a tre o più classi di antibiotici.

- **Extensively drug-resistant (XDR):** condizione in cui un microrganismo risulta non suscettibile agli antimicrobici appartenenti a quasi tutte le classi disponibili, mantenendo sensibilità soltanto a una o due classi.
- **Pandrug-resistant (PDR):** condizione caratterizzata dalla non suscettibilità del microorganismo tutti gli agenti antimicrobici appartenenti a tutte le classi considerate [58].

Inoltre, la resistenza agli antibiotici può essere classificata secondo tre diverse modalità: **intrinseca**, **acquisita** tramite cambiamenti genetici o trasferimento genico orizzontale e **adattativa** [59].

La **resistenza intrinseca** è una caratteristica naturale di alcune specie batteriche, dovuta a specifiche proprietà strutturali o biochimiche. Ad esempio, i batteri del genere *Mycoplasma*, essendo privi di parete cellulare, risultano naturalmente resistenti agli antibiotici β-lattamici [60]. Allo stesso modo, generi come *Leuconostoc* e *Pediococcus* presentano una resistenza intrinseca alla vancomicina, poiché i loro precursori della parete cellulare non possiedono i siti di legame per questo antibiotico.[61]

La **resistenza acquisita** si sviluppa invece in batteri inizialmente farmaco-sensibili per poi sviluppare una vera e propria resistenza derivata da modificazioni genetiche. Queste possono avvenire tramite mutazioni spontanee oppure attraverso l'acquisizione di geni di resistenza da altri microrganismi. Un esempio rilevante è rappresentato da *Mycobacterium tuberculosis*, che può diventare resistente alla rifampicina a causa di mutazioni nel gene che codifica per l'RNA polimerasi. [59,60] Le mutazioni genetiche possono inoltre modificare il bersaglio dell'antibiotico, ridurre l'affinità o diminuire la permeabilità della membrana batterica. Un caso clinico importante è la resistenza al trimetoprim in *E. coli* e *Haemophilus influenzae*, dovuta da mutazioni nel gene codificante l'enzima diidrofolato reduttasi [62].

Negli Enterobatteri, un ulteriore importante meccanismo di resistenza acquisita è rappresentato dalla produzione di β-lattamasi, enzimi in grado di inattivare gli antibiotici β-lattamici. L'ampio impiego di questi antimicrobici ha favorito la diffusione delle β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), prevalentemente appartenenti alla classe A e codificati da geni frequentemente localizzati su plasmidi [5]. Questi enzimi possono inattivare le ossimino-cefalosporine ad ampio spettro, incluse quelle di terza e, con attività variabile, di quarta generazione e monobattami (aztreonam). Non idrolizzano invece le cefamicine (es.: cefoxitina) e carbapenemi (es.: meropenem, imipenem, ertapenem e doripenem) [63]. Questi enzimi sono generalmente inibiti dagli inibitori delle β-lattamasi (BLI), quali acido clavulanico, sulbactam e tazobactam. I geni che codificano le ESBL si trovano spesso su plasmidi o associati ad elementi mobili, come trasposoni o sequenze di inserzione, insieme ad altri determinanti di resistenza. La loro diffusione può quindi determinare fenotipi di multiresistenza, comprendenti anche la resistenza ad aminoglicosidi, trimetoprim, sulfonamidi, tetracicline, cloramfenicolo e fluorochinoloni [64].

Altri meccanismi di resistenza acquisita comprendono il trasferimento genico orizzontale, attraverso il quale i batteri possono scambiarsi materiale genetico mediante trasformazione, trasduzione o coniugazione. Questo processo ha favorito, ad esempio, la diffusione di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA), grazie all'acquisizione del gene *mecA*, localizzato su un elemento genetico mobile [65,66].

Infine, la **resistenza adattativa** è un fenomeno temporaneo che si manifesta in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli, come l'espressione di pompe di efflusso o la formazione di biofilm. Un esempio è rappresentato da *P. aeruginosa,* in cui la pompa di efflusso MexXy-OprM contribuisce a una resistenza transitoria, destinata a dissiparsi con la scomparsa dello stimolo esterno [67].

Alla luce di questi meccanismi, appare evidente come la resistenza antimicrobica sia il risultato di un complesso adattamento evolutivo dei microrganismi, amplificato dalle pressioni selettive esercitate dall'uomo. La crescente diffusione di batteri antibiotico-resistenti limita significativamente le opzioni terapeutiche disponibili, rendendo sempre più complessa la gestione delle infezioni.

Secondo il più recente rapporto della European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), coordinata dall'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), l'antibiotico-resistenza continua a rappresentare una delle principali minacce per la salute pubblica in Europa. I dati raccolti nei Paesi dell'Unione Europea evidenziano come i livelli di resistenza rimangano particolarmente elevati per diversi patogeni prioritari, tra cui *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *S. aureus* [68].

S. aureus resistente alla meticillina (MRSA), si è affermato come un importante patogeno in epoca contemporanea, responsabile di significativi livelli di malattia e mortalità. La sua capacità di eludere le difese immunitarie dell'ospite attraverso vari meccanismi contribuisce allo sviluppo di batteriemie, endocarditi, infezioni della cute e dei tessuti molli e infezioni nosocomiali [69,70].

Sebbene l'incidenza delle infezioni ematiche da *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) sia diminuita rispetto al 2019, persistono criticità legate a *E. coli* resistente alle cefalosporine di terza generazione e, soprattutto, a *K. pneumoniae* resistente ai carbapenemi, in aumento in diversi Paesi europei. Il rapporto evidenzia quindi la necessità di rafforzare la sorveglianza microbiologica, l'antimicrobial stewardship, la prevenzione e il controllo delle infezioni e l'approccio One Health per contrastare la resistenza antimicrobica [68].

Il Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025, ha presentato la prosecuzione del precedente PNCAR 2017-2020, prorogato fino al 2021, ha definito indirizzi strategici e operativi per contrastare l'antibiotico-resistenza in Italia attraverso un approccio integrato One Health, che considera strettamente interconnesse la salute umana, animale e ambientale. Il Piano ha avuto come obiettivo principale la riduzione dell'incidenza e dell'impatto delle infezioni sostenute da microrganismi resistenti, attraverso sei principali linee di intervento: rafforzamento dell'approccio

One Health e della sorveglianza, prevenzione e controllo delle infezioni correlate all'assistenza, uso appropriato degli antibiotici in ambito umano e veterinario, ricerca e innovazione per lo sviluppo di strumenti diagnostici e terapeutici, collaborazione nazionale e internazionale e sensibilizzazione della popolazione e formazione degli operatori sanitari, veterinari e ambientali [71].

1.6 Fosfomicina

La fosfomicina è un antibiotico ad azione battericida, originariamente isolato, tra gli altri microrganismi, da *Streptomyces fradiae* nel 1969 da un gruppo di ricercatori della Spanish Penicillin and Antibioctics Company.

Nel corso degli anni, il farmaco è stato impiegato in numerosi Paesi per molteplici indicazioni cliniche, sia nella formulazione endovenosa (sale disodico) sia nelle formulazioni orali (sale di calcio o trometamolo). Più recentemente, si è osservato un significativo incremento del suo utilizzo, correlato alla crescente diffusione di microrganismi MDR, nei confronti dei quali la fosfomicina rappresenta un'importante alternativa terapeutica, utilizzabile sia da sola sia in associazione con altri antibiotici [72,73].

Agisce bloccando il primo stadio della sintesi del peptidoglicano, componente fondamentale della parete cellulare batterica. Il farmaco entra nella cellula attraverso specifici sistemi di trasporto, in particolare il trasportatore del glicerolo-3-fosfato (GlpT) e quello del glucosio-6-fosfato (UhpT). Una volta penetrata nel citoplasma batterico, la fosfomicina inibisce irreversibilmente l'enzima UDP-N-acetilglucosamina enolpiruvil-transferasi (MurA), catalizzatore della reazione che porta alla formazione dell'acido N-acetilmuramico, precursore fondamentale del peptidoglicano.

Dal punto di vista strutturale la fosfomicina è un analogo del fosfoenolpiruvato e presenta un anello epossidico, elemento essenziale per la sua attività biologica e un gruppo fosfonico. Il legame covalente con MurA determina l'inattivazione dell'enzima causando la lisi del batterio, soprattutto durante la fase di crescita. (Figura 5)

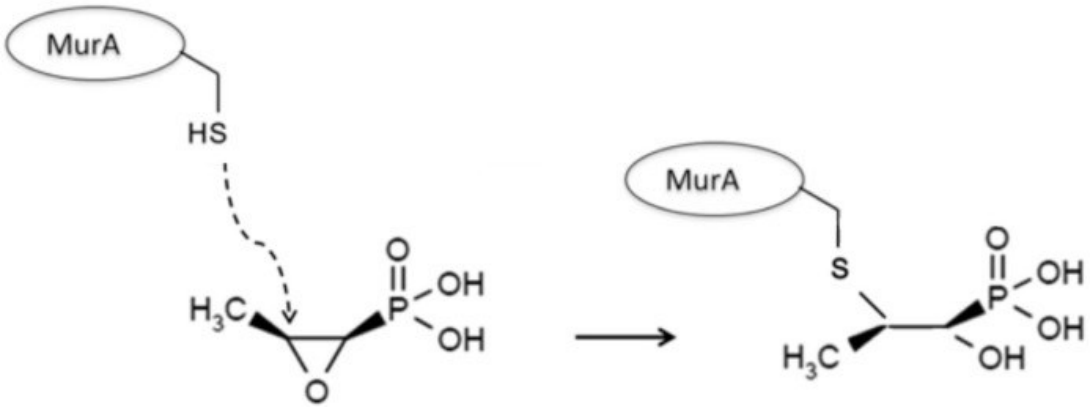

Figura 5. Meccanismo d'azione della fosfomicina. [74]

Poiché sia i batteri Gram-positivi sia Gram-negativi necessitano della sintesi di acido N-acetilmuramico per la formazione del peptidoglicano, la fosfomicina presenta un ampio spettro d'azione. Inoltre, il suo meccanismo d'azione unico riduce la probabilità di resistenze crociate con altre classi antibiotiche. Per questo motivo è stata impiegata nel trattamento di infezioni causate da microrganismi MDR, come *S. aureus* MRSA, enteroccocchi resistenti alla vancomicina (VRE), *Enterobacterales* produttori di ESBL o carbapenemasi e *P. aeruginosa* MDR.[74]. Diversi studi hanno riportato che tra 81% e il 100% dei ceppi di *E. coli* produttori di ESBL mantiene la sensibilità alla fosfomicina [75].

La resistenza può essere legata a modificazioni strutturali dell'enzima bersaglio MurA, in particolare a sostituzioni aminoacidiche che ne riducono l'affinità per il farmaco. [76] In altri casi, la resistenza è associata alla capacità del batterio di utilizzare vie alternative per la sintesi della parete cellulare, come il riciclo dei precursori del peptidoglicano, limitando così la dipendenza dalla via di sintesi *de novo* inibita dalla fosfomicina [77].

La resistenza acquisita è più frequentemente correlata a mutazioni nei geni che codificano per i sistemi di trasporto della fosfomicina (*glpT, uhpT*). Tali alterazioni riducono o impediscono l'ingresso del farmaco all'interno della cellula batterica, compromettendone l'attività [78].

Sono stati inoltre descritti dei meccanismi meno frequenti di resistenza basati sulla produzione di enzimi in grado di modificare strutturalmente la fosfomicina e di inattivarla. Tra questi rientrano FosA, FosB, FosC e FosX [75].

La fosfomicina rappresenta un'importante opzione terapeutica di prima linea nel trattamento delle vie urinarie, in particolare nelle forme non complicate, dove viene frequentemente impiegata come trattamento iniziale in attesa dei risultati dell'urinocoltura e dell'antibiogramma [79]. È indicata anche nelle cistiti ricorrenti, nell'uretrite batterica aspecifica, nelle infezioni urinarie complicate o secondarie e nella profilassi pre-operatoria in ambiente urologico.

Un ulteriore aspetto interessante è la sua capacità di ridurre l'adesione dei batteri alle cellule epiteliali dell'apparato urinario, contribuendo così a limitare la colonizzazione [72]. Al di fuori dell'ambito urinario, la fosfomicina viene usata in combinazione con la tobramicina in particolare per il trattamento delle infezioni respiratorie con l'obiettivo di potenziare l'efficacia antimicrobica [80]. Nelle infezioni sistemiche invece, la fosfomicina viene somministrata per via endovenosa, generalmente a dosaggi compresi tra 4 e 8 g ogni 8 ore [81].

Dal punto di vista farmacocinetico, la fosfomicina è una molecola a basso peso molecolare, idrosolubile e con scarso legame alle proteine plasmatiche. Queste caratteristiche permettono alla molecola di distribuirsi facilmente nei tessuti e nei liquidi corporei. Studi clinici hanno dimostrato

che raggiunge concentrazioni efficaci nei tessuti infiammati, nelle ossa, nei polmoni e nei liquidi oculari. È stato inoltre documentato il suo ingresso attivo nei leucociti polimorfonucleati [74].

L'eliminazione avviene quasi esclusivamente per via renale attraverso la filtrazione glomerulare; di conseguenza, la sua clearance è direttamente proporzionale alla velocità di filtrazione glomerulare (VFG). Non è metabolizzata e non ha legame farmaco proteico.

In termini di sicurezza, la fosfomicina è considerata un antibiotico generalmente ben tollerato. Quando viene somministrata per via orale, gli effetti indesiderati riguardano l'apparato gastrointestinale e comprendono diarrea, nausea, dolore addominale e dispsepsia; nella maggior parte dei casi si tratta di disturbi lievi e temporanei. Più raramente possono comparire cefalea, vertigini e infezioni del tratto respiratorio superiore [82]. Nella somministrazione endovenosa, invece, l'effetto avverso più importante è l'ipokaliemia, osservata in circa il 20-25% dei pazienti trattati, probabilmente correlata a un'azione a livello del tubulo renale. La controindicazione principale è l'ipersensibilità al principio attivo. Nel complesso, la fosfomicina è considerata un antibiotico sicuro [83].

Alcuni studi sperimentali condotti su animali hanno inoltre evidenziato un possibile effetto protettivo della fosfomicina nei confronti della nefrotossicità indotta dagli aminoglicosidi. Tale azione sarebbe correlata all'inibizione del rilascio di istamina conseguente alla degranulazione mastocitaria indotta da tali antibiotici [82].

Il Comitato europeo per i test di sensibilità antimicrobica (EUCAST) ha recentemente ridotto il breakpoint di sensibilità per la formulazione di fosfomicina trometamolo utilizzata per le infezioni del tratto urinario non complicate (uUTI) da 32 mg/L a 8 mg/L (sensibile [S] ≤8 mg/L; resistente [R] >8 mg/L) per la specie di *E. coli*.

Sebbene la fosfomicina sia attiva contro diversi batteri Gram-negativi e Gram-positivi, i breakpoint clinici sono raccomandati solo per isolati di *E. coli*, poiché non esistono breakpoint ufficiali per altri patogeni delle infezioni del tratto urinario. L' assenza di breakpoint clinici per le altre specie batteriche potrebbe portare a una riduzione dell'uso della fosfomicina orale, soprattutto se non è disponibile la concentrazione minima inibitoria (MIC). Tuttavia, la modifica del breakpoint non dovrebbe avere un impatto sulla scelta della terapia empirica per le UTI.

Il metodo di riferimento standard per la determinazione della sensibilità alla fosfomicina è l'agar diluizione su terreno agarizzato con aggiunta di glucosio-6-fosfato (25 mg/L). (Tabella 1) [84].

Tabella 1. Interpretazione dei risultati di sensibilità alla fosfomicina per *E. coli* secondo i breakpoint EUCAST (nella versione aggiornata).

Antibiotico/Specie	MIC S ≤ (mg/L)	MIC R > (mg/L)	Contenuto del disco (µg)	Diametro alone S ≥ (mm)	Diametro alone R < (mm)
Fosfomicina (IVU) - *E. coli*	8	8	200	24	24
Fosfomicina orale (solo IVU non complicate) - *E. coli*	8	8	200	24	24

Nota: La sensibilità (S) è associata a valori di MIC ⩽8 mg/L e a un diametro dell'alone di inibizione ⩾24 mm (se si utilizza la metodica manuale di diffusione su disco: Kirby Bauer), mentre la resistenza (R) è associata a MIC >8 mg/L e a un diametro <24 mm (se si utilizza la metodica manuale di diffusione su disco: Kirby Bauer).

La fosfomicina endovenosa è stata inoltre utilizzata in terapia combinata contro diversi patogeni in varie tipologie di infezione. Tuttavia, oggi non è stato possibile determinare con certezza il reale beneficio aggiuntivo della fosfomicina nelle terapie di combinazione. I dati attualmente disponibili non dimostrano correlazione tra i valori di MIC e l'efficacia clinica in tali contesti; di conseguenza, l'EUCAST non fornisce indicazioni specifiche sull'utilizzo dei test di sensibilità per orientare la scelta della terapia combinata [84].

Le linee guida aggiornate del 2025 dell'EAU sulle infezioni urologiche raccomandano fosfomicina trometamolo per via orale come trattamento di prima linea per la terapia antimicrobica delle ITU localizzate nelle donne; le aminopenicilline e i fluorochinoloni non sono raccomandati [85]. Le linee guida dell'EAU hanno anche evidenziato il ruolo della gestione antimicrobica per combattere la crescente minaccia della resistenza antimicrobica batterica (AMR), fornendo raccomandazioni basate sull'evidenza per la selezione, il dosaggio e la durata degli antibiotici.

La gestione antimicrobica mira a ottimizzare gli esiti clinici limitando tossicità, selezione di organismi virulenti e costi, senza compromettere la qualità dell'assistenza. In questo contesto, la variabilità della sensibilità alla fosfomicina tra i diversi Paesi sottolinea l'importanza dei dati epidemiologici per guidarne un uso appropriato e contrastare l'emergere di resistenze antimicrobiche [86].

La fosfomicina si dimostra promettente anche nel trattamento delle infezioni del tratto urinario in popolazioni di pazienti vulnerabili, tra cui, a titolo esemplificativo, pazienti con infezioni del tratto urinario associate a catetere, uomini e donne in gravidanza.

L'emergere e la diffusione di batteri Gram-negativi MDR correlati alle infezioni del tratto urinario (UTI) è in aumento in tutto il mondo, sia negli ospedali che nella comunità. Pertanto, l'opzione terapeutica è una preoccupazione crescente a causa della presenza di microrganismi produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) che mostrano resistenza non solo alle cefalosporine ma anche ai chinoloni e al co-trimossazolo. Le opzioni di trattamento alternative per isolati di *E. coli* produttore di ESBL includono carbapenemi, tigeciclina, combinazioni di beta-lattamici/inibitori delle beta-lattamasi (BL/BLI) e fosfomicina. Ma tutti questi farmaci sono somministrati per via parenterale, tranne la fosfomicina [87].

In questo studio, ci siamo proposti pertanto di valutare la sensibilità antimicrobica della fosfomicina e di altri antimicrobici comuni nei confronti di isolati clinici batterici provenienti da campioni di urina.

2. SCOPO DEL LAVORO

L'internato è stato svolto presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia, sede di Pavia, da settembre 2025 a febbraio 2026 sotto la supervisione della Dr.ssa Rezzani.

Le infezioni delle vie urinarie rappresentano una delle principali cause di richiesta di esami microbiologici e di prescrizione antibiotica sia in ambito ospedaliero sia territoriale. La crescente diffusione di Enterobatteri produttori di beta lattamasi a spettro esteso (ESBL) costituisce una rilevante problematica clinica e di sanità pubblica poiché tali microrganismi sono caratterizzati da elevati livelli di resistenza agli antibiotici beta lattamici e da una frequente associazione con ulteriori meccanismi di multiresistenza ad altri farmaci.

In questo contesto, la fosfomicina ha suscitato crescente interesse come possibile alternativa terapeutica per il trattamento delle infezioni urinarie sostenute da Enterobatteri produttori di ESBL, grazie alla sua attività contro numerosi ceppi MDR e al favorevole profilo farmacocinetico.

Scopo del presente studio è stato quello di valutare la diffusione degli Enterobatteri isolati da campioni urinari processati durante il periodo di tirocinio presso il laboratorio di Microbiologia dell'Istituto Maugeri, sede Pavia, caratterizzando la distribuzione delle principali specie batteriche e la prevalenza dei ceppi produttori di ESBL.

Inoltre, lo studio si è proposto di analizzare i profili di sensibilità antibiotica degli isolati ESBL-produttori, con un focus specifico dedicato alla fosfomicina, al fine di determinarne l'attività *in vitro* nei confronti dei ceppi isolati e di valutarne il potenziale impiego terapeutico alla luce del crescente incremento della resistenza agli antibiotici di prima linea. Infatti, un ulteriore obiettivo è stato quello di verificare l'affidabilità dei risultati di sensibilità alla fosfomicina, risultati ottenuti con sistema automatizzato MicroScan WalkAway, confrontando i ceppi classificati come resistenti secondo i criteri EUCAST vigenti, con il metodo di riferimento in agar diluizione, allo scopo di determinare la reale prevalenza di resistenza e di evidenziare eventuali discrepanze diagnostiche.

In sintesi, l'analisi dei dati derivante dall'attività routinaria a cui ho attivamente partecipato, è stata condotta prendendo in considerazione i seguenti aspetti:

- Distribuzione delle urinocolture totali e positive alla presenza de microrganismi per sesso e fascia di età dei pazienti.
- Identificazione delle principali specie di *Enterobacterales* isolate dai campioni urinari.
- Determinazione della frequenza degli isolati produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL).
- Caratterizzazione fenotipica dei ceppi produttori di ESBL mediante valutazione del profilo di suscettibilità agli antimicrobici secondo i criteri EUCAST.
- Valutazione della suscettibilità alla fosfomicina dei ceppi ESBL-produttori.

- Confronto del profilo di sensibilità alla fosfomicina con metodo automatizzato e metodo manuale di agar diluizione.
- Valutazione del potenziale ruolo della fosfomicina come opzione terapeutica nel trattamento delle infezioni urinarie sostenute da *Enterobacterales* ESBL-produttori.

I risultati dello studio intendono contribuire alla definizione dell'epidemiologia locale degli Enterobatteri ESBL-produttori, fornire dati aggiornati sui profili di antibiotico-resistenza e supportare le strategie di antimicrobial stewardship, favorendo un impiego più appropriato della fosfomicina nel trattamento delle infezioni urinarie e contribuendo al contenimento della diffusione dell'antibiotico-resistenza.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Origine dei ceppi urinari

L'IRCCS Maugeri è un istituto dedicato alla diagnosi, cura e riabilitazione di pazienti affetti da patologie croniche e condizioni di fragilità, affiancando all'attività assistenziale una consolidata attività di ricerca scientifica.

L'internato è stato svolto presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia della sede di Pavia, che funge da Core Laboratory e centro di riferimento per l'analisi microbiologica dei campioni provenienti dalle diverse sedi lombarde dell'Istituto Maugeri. La centralizzazione delle attività analitiche consente di uniformare le procedure, ottimizzare le risorse tecnologiche e professionali, garantire elevati standard qualitativi e assicurare una gestione efficiente e tracciabile dell'intero processo laboratoristico, contribuendo all'affidabilità e alla tempestività dei risultati diagnostici. (figura 6)

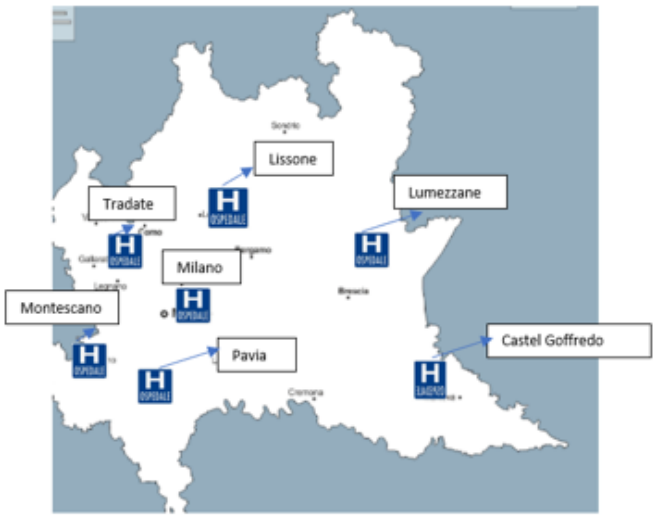

Figura 6. Sedi degli Istituti Clinici Maugeri della Regione Lombardia da cui provengono i campioni microbiologici analizzati nello studio.

L'internato di tesi è stato svolto da settembre 2025 a febbraio 2026; in questo periodo sono state apprese le tecniche diagnostiche e elaborati i dati della routine microbiologica.

Lo studio è stato condotto esclusivamente su campioni urinari provenienti da pazienti ricoverati raccolti nell'ambito della normale attività diagnostica del laboratorio al fine di ottenere una consolidata rappresentatività epidemiologica e una consistenza di dati microbiologici, caratteristiche ritenute indispensabili per garantire solidità e attendibilità allo studio.

La popolazione assistita dagli Istituti Maugeri è costituita prevalentemente da pazienti anziani e fragili, spesso affetti da più patologie croniche e sottoposti a ricoveri prolungati. Molti di essi necessitano dell'utilizzo di dispositivi medici invasivi, come cateteri vescicali, cateteri venosi e PEG (gastronomia endoscopica percutanea) oppure presentano ulcere da pressione e sono frequentemente sottoposti a terapie antibiotiche. Questi fattori, insieme alla presenza di comorbilità, immunodepressione e ridotta autosufficienza, aumentano il rischio di sviluppare infezioni e favoriscono la colonizzazione da parte di batteri multiresistenti agli antibiotici.

3.2 Processamento dei campioni urinari

La corretta interpretazione dell'urinocoltura dipende strettamente dalla qualità del campione raccolto. Per ottenere risultati affidabili, è necessario che:

- Il campione sia rappresentativo del quadro clinico del paziente e venga raccolto con tecnica appropriata;
- La raccolta venga effettuata preferibilmente al mattino, o comunque dopo almeno 3-5 ore dall'ultima minzione, previa accurata igiene dei genitali esterni;
- Si raccolga il secondo getto urinario, eliminando il primo per ridurre la contaminazione della flora uretrale (urocoltura da mitto intermedio);
- Il campione sia raccolto in condizioni sterili, utilizzando un contenitore sterile a bocca larga con tappo a vite, oppure, quando indicato, mediante catetere vescicale o sacchetto adesivo.

Dopo il prelievo e l'identificazione univoca mediante codice a barre, i campioni biologici sono stati inviati rapidamente al laboratorio tramite un sistema di posta pneumatica ad aria compressa, che ha garantito tempi di consegna ridotti e l'integrità dei campioni. La posta pneumatica è un sistema automatizzato che consente il rapido trasporto dei campioni biologici dai reparti al laboratorio mediante condotte ad aria compressa. Questo sistema riduce i tempi di trasferimento, ottimizza il flusso di lavoro e favorisce una più tempestiva esecuzione delle analisi. In microbiologia clinica, la rapidità del trasporto è particolarmente importante poiché contribuisce a preservare l'integrità del campione, evitando alterazioni della carica microbica dovute a ritardi nel processamento. Nel caso delle urocolture, inoltre, consente di mantenere inalterate le caratteristiche chimico-fisiche delle urine e i principali parametri di supporto diagnostico, migliorando l'affidabilità dei risultati microbiologici. (Figura 7)



Figura 7. Sistema di posta pneumatica impiegato per il trasporto dei campioni biologici al Laboratorio di Microbiologia e relativi bossoli.

Per preservare l'integrità del materiale biologico durante il trasporto, i campioni sono stati collocati in contenitori rigidi dedicati (bossoli), progettati per limitare gli effetti delle sollecitazioni meccaniche e garantire condizioni di sicurezza durante la movimentazione. I campioni provenienti dagli altri Istituti Maugeri sono stati invece consegnati manualmente e registrati presso la sezione di ricezione. Una volta giunti presso il laboratorio di Microbiologia e Virologia, i campioni idonei sono stati acquisiti tramite lettura del codice a barre e stampate un numero congruo di etichette necessarie per identificare le piastre colturali per la semina.

La semina dei campioni è stata eseguita mediante tecnica di strisciamento per isolamento, seguendo i percorsi diagnostici standardizzati proposti dalla Società Scientifica AMCLI. (Figura 8). Tale metodica ha consentito sia l'ottenimento di colonie isolate sia la determinazione quantitativa della batteriuria, espressa come unità formanti colonia per millilitro (UFC/mL), calcolata in funzione del volume inoculato.

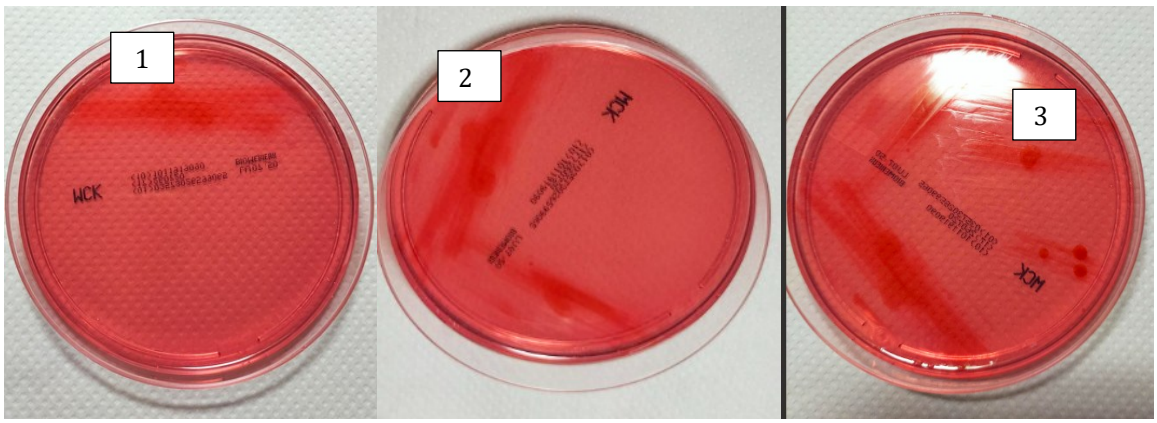

Figura 8. Tecnica di semina a tre quadranti impiegata per l'ottenimento di colonie isolate su terreno agarizzato.

Per l'isolamento e la caratterizzazione dei microrganismi sono stati utilizzati due terreni colturali: (Figura 9)

- **Agar sangue**: un terreno molto nutriente, favorisce la crescita della maggior parte dei batteri. È un terreno allestito con l'aggiunta di 5% di sangue (di montone o cavallo) utilizzato per evidenziare la capacità di emolisi dei batteri. Permette di distinguere la differente emolisi su sangue. La β-emolisi è caratterizzata dalla completa lisi degli eritrociti con formazione di un alone trasparente attorno alla colonia. L'α-emolisi è dovuta a una lisi parziale con comparsa di un alone verde attorno alla colonia per degradazione della bilirubina in biliverdina, mentre la γ-emolisi indica l'assenza di attività emolitica.
- **MacConkey agar**: è considerato sia un terreno selettivo sia differenziale, utilizzato per l'isolamento dei batteri Gram-negativi. La presenza di cristalvioletto e sali biliari inibisce la crescita dei Gram-positivi. Esso è considerato differenziale perché differenzia i Gram-negativi lattosio-fermentanti (colonie rosse) dai non fermentanti (colonie bianche).

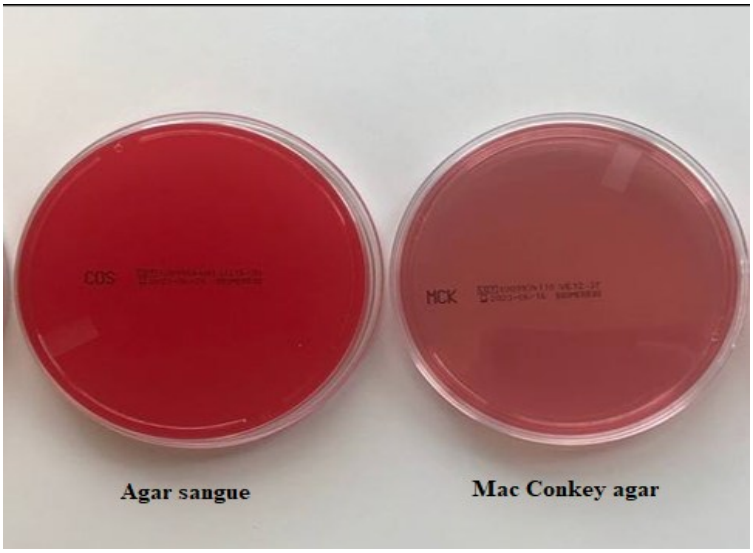

Figura 9. Terreni utilizzati per la semina.

I campioni sono stati inoculati utilizzando un'ansa calibrata da 1 μL, che consente di correlare ogni colonia batterica sviluppata a una concentrazione di 10^3 CFU/mL nel campione analizzato. Le piastre così seminate sono state incubate in termostato a 37° C per 18/20 ore.

Inoltre, in caso di richiesta per ricerca di miceti, i campioni urinari sono stati strisciati sul terreno cromogeno Brilliance Candida Agar (Figura 10), utilizzato per l'isolamento delle specie di *Candida*. Le piastre sono state incubate in aerobiosi a 35°C per 48 ore.



Figura 10. Terreno cromogeno per la ricerca di miceti.

Questo terreno permette una prima identificazione delle diverse specie di *Candida* grazie allo sviluppo di colonie con colorazioni differenti, rendendo l'interpretazione dei risultati più semplice e rapida rispetto ai terreni tradizionali. Questo terreno cromogeno differenzia le seguenti specie di *Candida* in base al diverso colore delle colonie: *Candida albicans* (verde), *Candida tropicalis* (blu scuro, con alone rosa) e *Candida krusei* (rosa e dall'aspetto lanuginoso), *Candida glabrata* (colonie di colore viola tipico) e *Candida dubliniensis* (colonie di colore verde scuro tipico).

3.3 Lettura e interpretazione delle piastre colturali seminate

Dopo 18/20 ore di incubazione a 37 °C, le piastre sono state esaminate dal personale dirigente per valutare la presenza di crescita microbica e determinare la carica batterica espressa in CFU/mL.
In assenza di crescita batterica, il campione veniva refertato come negativo.
Infatti, l'esito dell'urocoltura è stato classificato in 3 categorie:

- **Negativa**, in assenza di crescita batterica significativa.
- **Positiva**, in presenza di crescita di uno o più microrganismi ritenuti clinicamente significativi secondo i criteri interpretativi del laboratorio.
- **Contaminata**, in presenza di crescita polimicrobica o di caratteristiche microbiologiche suggestive di contaminazione del campione durante la raccolta o il trasporto.

In presenza di crescita microbica, l'interpretazione dei risultati si basava su tre criteri principali:

1. **Carica batterica**: la concentrazione batterica è stata determinata contando il numero di colonie presenti sulla piastra moltiplicato per il fattore di diluizione. Ad esempio, utilizzando un'ansa calibrata da 1 µl per la semina dei campioni urinari, come nella nostra routine, il fattore di diluizione corrispondeva a 1000 CFU/mL. La crescita estesa fino all'ultimo quadrante di semina indicava generalmente una carica batterica superiore a 10^6 CFU/mL. La

conta veniva eseguita separatamente per ciascun tipo di colonia con caratteristiche morfologiche differenti.

2. **Numero di specie microbiche isolate**: veniva valutata la presenza di una o più specie batteriche sulla base delle caratteristiche delle colonie, quali dimensioni, aspetto, colore ed eventuale attività emolitica osservata su Agar sangue.
3. **Tipologia dei microrganismi isolati**: La crescita di più microrganismi appartenenti alla flora saprofita era interpretata come contaminazione del campione e refertata come *"flora mista"*.

Il criterio di Kass, che definiva significativa una batteriuria $\geq 10^5$ UFC/mL ha rappresentato per molti anni il riferimento per la diagnosi microbiologica delle infezioni urinarie [88]. Tuttavia, le attuali evidenze scientifiche hanno dimostrato che tale soglia non è assoluta, poiché infezioni urinarie possono manifestarsi anche con cariche batteriche inferiori, mentre valori elevati possono essere riscontrati in condizioni di batteriuria asintomatica [89]. Per questo motivo, l'interpretazione dell'urocoltura richiede un approccio integrato che consideri, oltre alla carica batterica, il microrganismo isolato, la modalità di raccolta del campione e il contesto clinico del paziente.

Nel presente studio, i campioni classificati come "carica dubbia" (<50.000 UFC/mL) sono stati valutati sulla base dell'interpretazione microbiologica complessiva, considerando la carica batterica, la specie isolata, il suo potenziale patogeno, la crescita in coltura pura o mista e la probabilità di contaminazione. In particolare, uropatogeni tipici come *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* sono stati interpretati diversamente rispetto a microrganismi frequentemente associati alla contaminazione [89].

Nella routine del laboratorio di Microbiologia dell'IRCCS Maugeri, l'urocoltura viene sempre interpretata insieme ai risultati dell'esame chimico-fisico e del sedimento urinario. La presenza concomitante di batteriuria, piuria e alterazioni urinari aumenta infatti la probabilità di una reale infezione. Questo approccio multidisciplinare migliora l'accuratezza diagnostica, riduce il rischio di sovradiagnosi e limita l'impiego inappropriato di antibiotici, in accordo con i principi dell'antimicrobial stewardship [89].

Pertanto, i campioni classificati con "carica dubbia" sono stati successivamente correlati, prima della refertazione (o come positivi o come campioni da ripetere), ai risultati dell'esame chimico-fisico delle urine, valutando la presenza di nitriti, esterasi leucocitaria, leucocituria, ematuria e cellule epiteliali, al fine di verificare se tali parametri potessero supportare l'interpretazione microbiologica e orientare la distinzione tra infezione, colonizzazione e contaminazione.

Nello specifico per ciascun campione, non francamente positivo, sono stati confrontati i risultati dell'esame chimico fisico delle urine e la crescita batterica. In particolare, sono stati analizzati i parametri maggiormente correlati ai processi infettivi e infiammatori del tratto urinario: nitriti, esterasi leucocitaria, leucociti, emazie e cellule epiteliali squamose.

La positività ai nitriti è stata correlata alla presenza di batteriuria significativa, in quanto numerosi batteri soprattutto appartenenti alle *Enterobacterales*, sono in grado di ridurre i nitrati urinari a nitriti attraverso l'enzima nitrato-reduttasi. Pertanto, la presenza di nitriti è stata considerata un indicatore altamente specifico di infezione urinaria sostenuta da tali microrganismi. L'assenza di nitriti non è stata invece ritenuta sufficiente per escludere un'infezione, poiché può verificarsi in presenza di batteri incapaci di produrre nitrato-reduttasi, di basse cariche batteriche, di un ridotto tempo di permanenza dell'urina in vescica o di una dieta povera di nitrati.
La positività dell'esterasi leucocitaria è stata correlata alla presenza di leucociti nel sedimento urinario e interpretata come espressione della risposta infiammatoria dell'ospite. La contemporanea positività dell'esterasi leucocitaria e della leucocituria è stata valutata come un forte indicatore di infiammazione delle vie urinarie.
La leucocituria è stata analizzata inoltre come parametro quantitativo dell'infiammazione urinaria. Un aumento del numero di leucociti è stato considerato indicativo di un processo infettivo quando associato a una crescita microbiologica significativa. Nei casi di urocoltura negativa, la presenza di leucocituria è stata interpretata con cautela, considerando la possibilità di condizioni infiammatorie non batteriche, infezioni già trattate con terapia antibiotica o infezioni sostenute da microrganismi a crescita difficile.
La presenza di emazie è stata correlata all'esito dell'urocoltura al fine di valutare l'eventuale associazione tra ematuria e infezione urinaria. Sebbene l'ematuria possa essere conseguenza del danno infiammatorio della mucosa uroteliale provocato dall'infezione, essa rappresenta un reperto aspecifico e può essere osservata anche in numerose condizioni non infettive. Per tale motivo, questo parametro è stato interpretato esclusivamente in associazione agli altri dati laboratoristici.
Le cellule epiteliali squamose sono state considerate un indicatore della qualità del campione urinario. Un'elevata concentrazione di tali cellule è stata interpretata come suggestiva di contaminazione durante la raccolta delle urine, soprattutto quando associata a crescita polimicrobica o a cariche batteriche dubbie. Nei campioni con abbondanti cellule epiteliali squamose, la positività dell'urocoltura è stata valutata con particolare cautela, poiché la contaminazione può determinare risultati microbiologici falsamente positivi o di difficile interpretazione [90].

3.4 Identificazione dei batteri e test di sensibilità antibiotica mediante lo strumento MicroScan WalkAway plus

Una volta completata la lettura delle piastre colturali, i campioni positivi sono stati sottoposti all'identificazione biochimica del microrganismo isolato e alla determinazione della sensibilità agli antibiotici mediante il sistema MicroScan WalkAway plus.

Il MicroScan WalkAway Plus rappresenta uno strumento altamente automatizzato, in grado di gestire tutte le fasi dell'analisi, dall'incubazione dei pannelli alla lettura e interpretazione dei risultati, fino alla segnalazione automatica di eventuali meccanismi di resistenza o risultati critici, riducendo significativamente l'intervento manuale dell'operatore e migliorando la standardizzazione dell'intero processo analitico.
La gestione dei dati è affidata al software BASE, che consente la raccolta, l'archiviazione, la validazione e la consultazione dei risultati. Il software può essere integrato con il sistema informatico di laboratorio (LIS), favorendo la trasmissione dei referti ai reparti clinici. Inoltre, mette a disposizione strumenti dedicati alla sorveglianza microbiologica, tra cui la segnalazione automatica dei microrganismi multiresistenti e l'analisi epidemiologica dei dati, fondamentali per il monitoraggio delle infezioni correlate all'assistenza e per il controllo della diffusione dell'antibiotico-resistenza.
L'interpretazione delle MIC è stata effettuata secondo le regole EUCAST Clinical Breakpoint Tables, versione 16.0; ove previsto, sono stati applicati gli Expert Rules e i commenti interpretativi EUCAST per l'identificazione di specifici meccanismi fenotipici di resistenza e per la validazione dei profili di sensibilità.

MicroScan WalkAway plus è una piattaforma automatizzata ampiamente utilizzata nei laboratori di microbiologia clinica, progettata per ottimizzare il flusso di lavoro e garantire risultati accurati, standardizzati e riproducibili in tempi ridotti, rappresentando un valido supporto nella scelta della terapia antimicrobica più appropriata. Il sistema si basa sulla metodica della microdiluizione in brodo, considerata il metodo di riferimento per la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) degli antibiotici. Attraverso un'unica analisi è stato possibile eseguire contemporaneamente sia l'identificazione batterica (ID), sia il test di sensibilità agli antibiotici (AST), utilizzando degli specifici pannelli monouso contenenti substrati biochimici e antibiotici a concentrazioni prestabilite. Lo strumento è dotato di 96 postazioni che consentono l'alloggiamento, l'incubazione e il monitoraggio simultaneo di altrettanti pannelli garantendo un'elevata riproduttibilità analitica.
Dopo l'inoculo della sospensione batterica standardizzata, i pannelli sono stati incubati all'interno dello strumento, che monitora automaticamente la crescita batterica mediante un sistema ottico capace di rilevare variazioni cromatiche e turbidimetriche. La lettura è stata effettuata ogni 15 minuti per tutta la durata dell'incubazione, consentendo un controllo continuo delle reazioni. I dati ottenuti sono stati successivamente confrontati con quelli presenti nel database interno del sistema, permettendo l'identificazione del microrganismo e la determinazione del relativo profilo di sensibilità agli antibiotici, oltre al calcolo della MIC.
Per l'allestimento dei pannelli, dalle colonie isolate è stata preparata una sospensione batterica con torbidità standard pari a 0,5 McFarland, utilizzando il sistema di inoculo PromptD, fornito dalla ditta

produttrice. Il kit è costituito da un puntale sterile in poliprolipene dotato di una scanalatura terminale, progettata per trattenere una quantità standardizzata di batteri, e da un collare rimovibile che permetteva di eliminare l'eccesso di materiale batterico aderente all'asticella. Il puntale con adese le colonie del microrganismo è stato successivamente inserito in un flacone contenente 30 mL di soluzione acquosa stabilizzata di tensioattivo PLURONIC (soluzione fornita dalla ditta produttrice, con brevetto), mentre l'impugnatura del dispositivo fungeva da tappo del flacone.

La preparazione della sospensione batterica ha previsto le seguenti fasi (Figura 11.):

1. prelievo di tre colonie ben isolate da una coltura pura mantenendo il puntale perpendicolare alla superficie dell'agar;
2. rimozione del collare per eliminare l'eccesso di materiale batterico aderente all'asticella;
3. apertura del flacone contenente il diluente;
4. inserimento del puntale nel flacone e chiusura mediante pressione e rotazione;
5. agitazione manuale seguita da miscelazione con vortex fino a ottenere una sospensione omogenea con torbidità standardizzata.

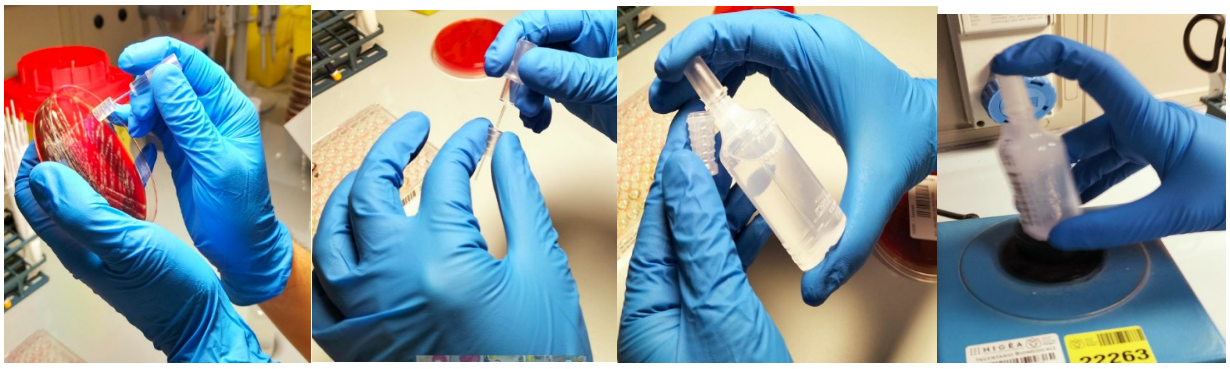

Figura 11. Rappresentazione delle varie fasi per la preparazione della sospensione batterica.

Al termine della preparazione, i flaconi sono stati posizionati in un apposito rotore (Figura 12), orientando il codice a barre verso l'esterno per consentirne la corretta lettura automatica. Nella parte superiore del rotore sono stati collocati i puntali necessari alla fase di inoculo. Successivamente, il rotore e i pannelli destinati all'identificazione e all'antibiogramma sono stati inseriti nel sistema automatico **SH2000** (Figura 13), che, dopo aver acquisito i codici identificativi di flaconi e pannelli, li ha associati automaticamente e ha dispensato 115 µL della sospensione batterica in ciascun pozzetto.

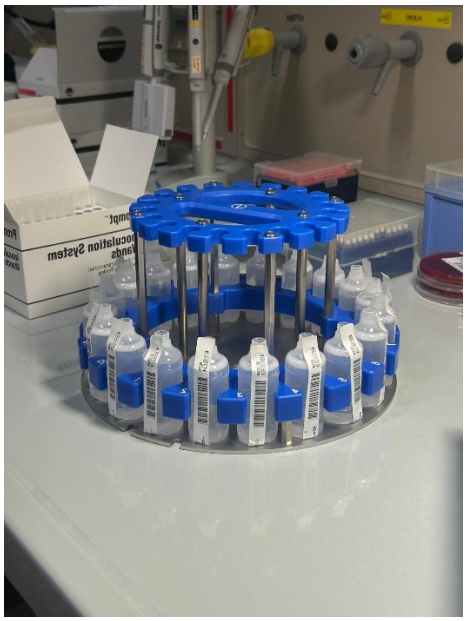

Figura 12. Flaconi contenenti le sospensioni batteriche preparate per l'identificazione batterica e l'esecuzione dell'antibiogramma mediante sistema automatizzato MicroScan.

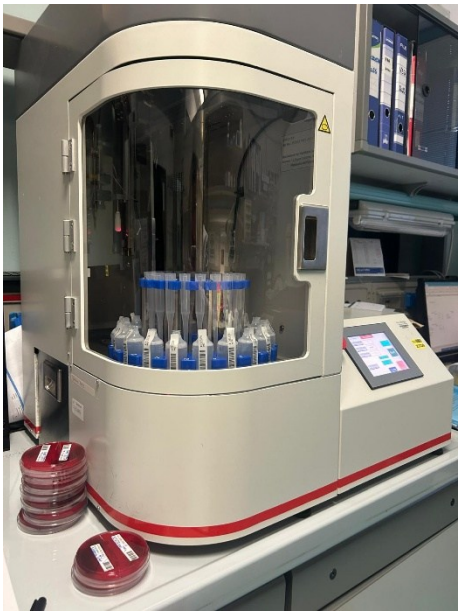

Figura 13. Sistema automatizzato SH2000 per la standardizzazione e l'inoculo delle sospensioni batteriche.

Una volta completato l'inoculo, i pannelli sono stati sigillati mediante un apposito coperchio e trasferiti nel MicroScan WalkAway Plus System (Figura 14), prestando attenzione a non toccare il fondo dei pozzetti per evitare possibili interferenze durante la lettura ottica. I pannelli sono stati quindi incubati per un periodo compreso tra 16 e 20 ore, durante il quale lo strumento ha monitorato

continuamente la crescita del microrganismo e l'andamento delle reazioni biochimiche. Al termine dell'incubazione, il software ha elaborato automaticamente i dati ottenuti, fornendo l'identificazione della specie batterica, il valore della MIC e l'interpretazione della sensibilità o della resistenza nei confronti degli antibiotici testati.



Figura 14. Sistema MicroScan WalkAway Plus per l'incubazione, la lettura e l'interpretazione automatizzata dei pannelli microbiologici.

In base al tipo di microrganismo isolato e al tipo di campione clinico, sono stati impiegati i seguenti pannelli MicroScan:

- **NEG URINE COMBO 98:** impiegato per l'identificazione e antibiogramma dei batteri Gram-negativi isolati da campioni urinari (Figura 15);
- **NEG COMBO 99**: utilizzato per Gram-negativi provenienti da campioni diversi dalle urine;
- **POS COMBO 49**: per i batteri Gram-positivi, come stafilococchi ed enterococchi;
- **NEG MIC 62:** utilizzato per i batteri Gram-negativi già identificati durante la lettura delle piastre come *E. coli* o *P. mirabilis*. Il pannello è stato utilizzato solo per fornire la MIC degli antibiotici perché presentava solo pozzetti contenenti diluizioni scalari di farmaci antimicrobici;
- **NEG MDR COMBO 100**: progettato per valutare l'attività dei nuovi antibiotici β-lattamici associati agli inibitori delle β-lattamasi (BLIC), quali ceftazidime/avibactam e ceftolozano/tazobactam.



Figura 15. Pannello MicroScan NEG URINE COMBO 98 impiegato per l'identificazione biochimica e la determinazione della sensibilità antimicrobica dei batteri Gram-negativi isolati da campioni urinari.

I pozzetti destinati all'antibiogramma contenevano concentrazioni crescenti dei diversi antibiotici, consentendo di individuare la minima concentrazione capace di inibire la crescita batterica, ovvero la MIC. I valori ottenuti sono stati interpretati secondo i criteri stabiliti dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), che classifica il microrganismo nelle seguenti categorie:

- **Sensibile (S)**: il microrganismo è inibito nella crescita dalle concentrazioni dell'antibiotico raggiungibili con il dosaggio standard; è quindi associato a un'elevata probabilità di successo terapeutico.
- **Sensibile con aumentata esposizione (I):** il microrganismo può essere trattato con successo purché venga aumentata l'esposizione all'antibiotico, ad esempio modificando il dosaggio, la frequenza di somministrazione o ottimizzando la sede d'azione del farmaco.
- **Resistente (R)**: il microrganismo non viene inibito dalle concentrazioni dell'antibiotico normalmente raggiungibili nell'organismo, per cui è associato a un'elevata probabilità di insuccesso terapeutico.

Ogni pannello comprende inoltre due pozzetti di controllo, identificati con C (controllo negativo) e G (controllo positivo), che consentono allo strumento di verificare la corretta esecuzione del test. Qualora tali controlli non fossero risultati conformi ai parametri previsti, l'analisi è stata automaticamente interrotta e il pannello considerato non valido.

Al termine dell'analisi, le reazioni biochimiche osservate sono state convertite in un codice numerico, definito Biocode, che è stato confrontato con quelli presenti nel database interno del sistema. In questo

modo è stato possibile identificare il genere e la specie del microrganismo, associando al risultato una percentuale di probabilità. Un'identificazione è considerata: ottimale quando la probabilità è compresa tra il 96% e il 99,9%, buona quando è pari o superiore all'80%. Valori inferiori all'80% indicavano un'identificazione non sufficientemente affidabile. In quest'ultimo caso sia l'identificazione sia l'antibiogramma sono stati considerati non validi e l'intera procedura è stata ripetuta.

Il controllo di qualità analitica è stato eseguito utilizzando ceppi di riferimento ATCC raccomandati da EUCAST (ad esempio *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), al fine di verificare l'accuratezza delle procedure di identificazione e delle determinazioni delle MIC. Tutte le attività analitiche sono state svolte nel rispetto delle procedure interne del laboratorio e delle raccomandazioni del produttore del sistema analitico.

3.5 Interpretazione dei risultati del Microscan e test di conferma fenotipica

Con il software BASE di Microscan è stato possibile controllare il profilo biochimico, la tassonomia, i meccanismi di resistenza e le relative reinterpretazioni del sistema rispetto alla MIC riscontrata del ceppo patogeno in analisi.

I pannelli utilizzati hanno permesso anche di individuare e confermare meccanismi di resistenza agli antibiotici come la produzione di ESβL tra gli isolati di *Enterobacterales*.

Il sistema Microscan ha confrontato automaticamente i valori di MIC di Cefotaxime (CTX) e Ceftazidime (CAZ) testati singolarmente con quelli ottenuti in associazione all'acido clavulanico, un inibitore delle β-lattamasi. In concomitanza di una riduzione della MIC di almeno 3 diluizioni in presenza dell'acido clavulanico rispetto all'antibiotico testato da solo, il sistema ha definito il microrganismo come produttore di ESBL.

In alcuni casi, l'isolato clinico ha mostrato crescita in tutti i pozzetti contenenti le cefalosporine, comprese quelle associate all'acido clavulanico. In questo caso, MicroScan non essendo in grado di applicare l'algoritmo precedentemente descritto, ha segnalato una sospetta produzione di ESBL, rendendo necessario un test di conferma. A tale scopo è stato eseguito un test immunocromatografico **NG-Test CTX-M MULTI** qualitativo rapido a flusso laterale che ha consentito di rilevare direttamente la presenza delle β-lattamasi di tipo CTX-M.

Il test è stato in grado di identificare almeno 26 varianti appartenenti ai cinque gruppi CTX-M (1,2,8,9 e 25) direttamente da colonie batteriche isolate, fornendo il risultato in circa 15 minuti. Il principio del test si basava sull'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici, sviluppati a partire dalle varianti CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-14, le più diffuse a livello clinico [91].

La card è costituita da una membrana di nitrocellulosa sulla quale sono immobilizzati anticorpi di cattura, disposti in corrispondenza della linea (T), e da una linea di controllo (C).
Durante la migrazione del campione per capillarità, l'eventuale presenza dell'enzima CTX-M determina la formazione di un complesso antigene-anticorpo che viene catturato sulla linea test, dando origine a una banda colorata. La comparsa della sola linea di controllo indicava un risultato negativo, mentre la presenza contemporanea delle linee C e T confermava la produzione delle β-lattamasi CTX-M (Figura16). L'assenza della linea di controllo rendeva invece il test non valido e ne richiedeva la ripetizione.



Figura 16. Test immunocromatografico positivo NG-Test CTX-M MULTI.

L'esecuzione del test si è articolata nelle seguenti fasi (Figura 17):

1. **Preparazione del tampone**: dispensare 5 gocce (150 µL) di tampone di estrazione presente nel kit, in una provetta Eppendorf;
2. **Prelievo della colonia**: prelevare con l'ansa una colonia batterica ben isolata dal terreno di coltura;
3. **Preparazione della sospensione**: risospendere la colonia nel tampone di estrazione e omogenizzare accuratamente mediante vortex;
4. **Applicazione del campione**: utilizzando la pipetta fornita dal kit, dispensare 100 µL della sospensione nella zona "S" della card CTX-M;
5. **Lettura del risultato**: lasciare migrare il campione per 15 minuti e procedere all'interpretazione del test.

Il risultato, in questo modo, ha consentito di confermare in modo rapido e affidabile la presenza delle β-lattamasi CTX-M.

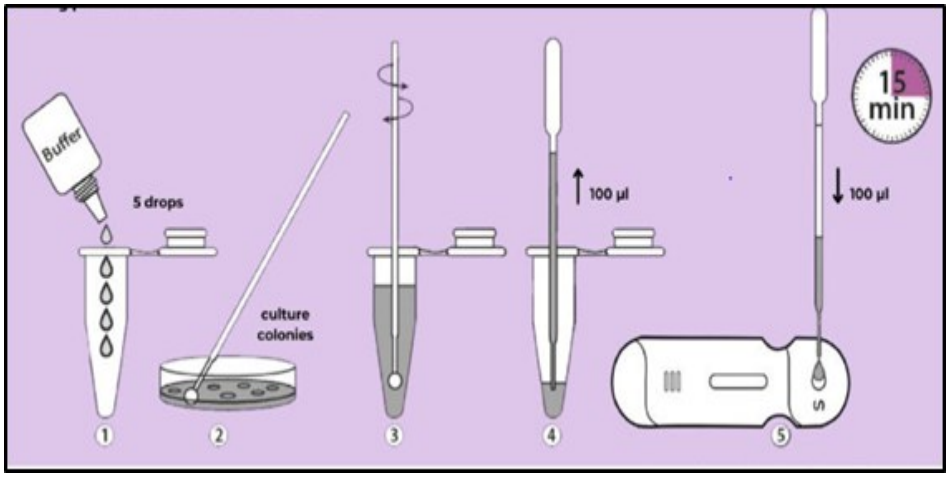

Figura 17. Rappresentazione schematica della procedura di esecuzione del test immunocromatografico NG-Test CTX-M MULTI.

3.6 Determinazione della sensibilità/resistenza alla fosfomicina mediante il metodo dell'agar diluizione

La sensibilità degli isolati batterici alla fosfomicina è stata valutata mediante il sistema AD Fosfomycin 0,25-256, basato sul metodo della diluizione in agar (agar dilution). Il sistema, commercializzato nel 2019 da Liofilchem Srl (Roseto degli Abruzzi, Italia) è costituito da un pannello contenente 12 pozzetti riempiti con terreno agarizzato + 25 mg/L di G6P (glucosio -6-fosfato) con concentrazioni crescenti di fosfomicina comprese tra 0,25-256 ug/mL (Figura 18).

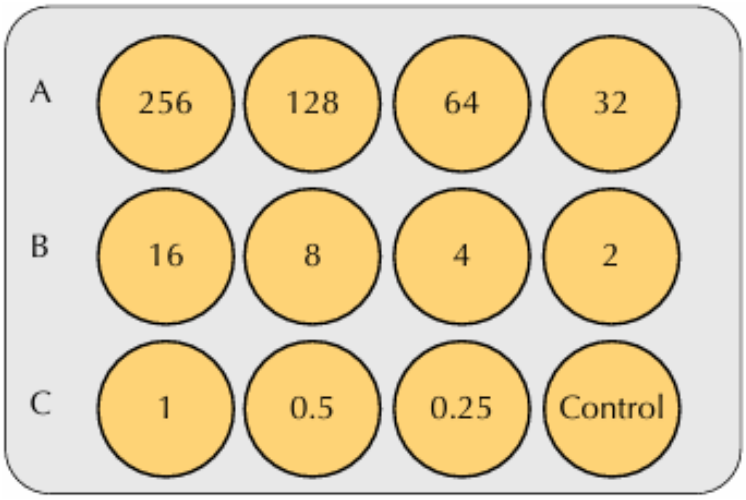

Figura 18. Pannello del sistema AD Fosfomycin 0,25-256 di 12 pozzetti contenente concentrazioni crescenti di fosfomicina.

Per l'esecuzione del test, è stata eseguita la seguente procedura (figura 19):

1. Le colonie isolate (2/3) sono state sospese in 3 mL di soluzione fisiologica al fine di ottenere una torbidità pari a 0.5 McFarland, misurata tramite turbidimetro.
2. Entro 15 minuti dalla preparazione, la diluizione della sospensione standardizzata è stata ulteriormente diluita in soluzione fisiologica con rapporto 1:10.
3. 2 µL della sospensione diluita, sono stati dispensati in ciascun pozzetto del pannello, ottenendo una concentrazione finale pari a circa 10^4UFC/spot per punto di inoculo. Il primo pozzetto inoculato privo di antibiotico rappresentava il controllo di crescita, seguito dai pozzetti contenenti concentrazioni crescenti di fosfomicina.
4. Il pannello chiuso con l'apposito coperchio è stato incubato a 35 ± 2 °C per un periodo compreso tra 16 e 20 ore in condizioni aerobiche.

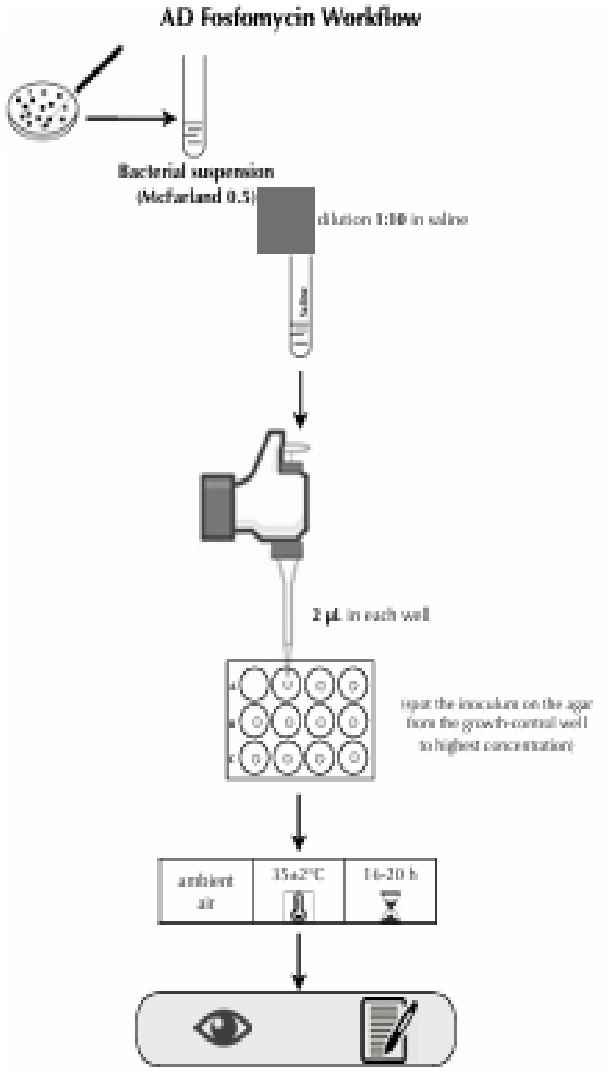

Figura 19. Esecuzione del test AD Fosfomycin 0,25-256 per la determinazione della sensibilità alla fosfomicina.

Al termine dell'incubazione, la concentrazione minima inibente (MIC) è stata determinata mediante lettura visiva della crescita batterica nei pozzetti. In base alle linee guida EUCAST, la MIC è stata identificata come la minima concentrazione alla quale la crescita risultava non confluente, ignorando colonie singole, microcolonie e sottili veli di crescita. Per facilitare la lettura dei risultati, i pannelli sono stati osservati su una superficie scura e non riflettente utilizzando il modello di lettura fornito dal produttore. Prima di interpretare il test, è stata verificata la presenza di crescita nel pozzetto di controllo. In assenza di crescita, il test è stato considerato non valido ed è stato ripetuto utilizzando una nuova coltura batterica.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Provenienza dei campioni urinari.

L'internato di tesi è stato svolto nell'arco di 6 mesi, da settembre 2025 a febbraio 2026 presso il laboratorio di Microbiologia dell'IRCCS Maugeri, sede Pavia. I dati presentati e discussi nel presente progetto di studio derivano sia dall'analisi microbiologica delle urocolture da me processate direttamente durante il periodo di internato, sia dall'elaborazione dei campioni urinari analizzati nell'ambito dell'attività diagnostica di routine del laboratorio.

In questo periodo sono stati analizzati complessivamente N. 7034 urocolture, di cui N. 4821 (68.5%) ottenute da mitto intermedio e N. 2213 (31.5%) raccolte tramite catetere urinario. (Grafico 1 e 2)

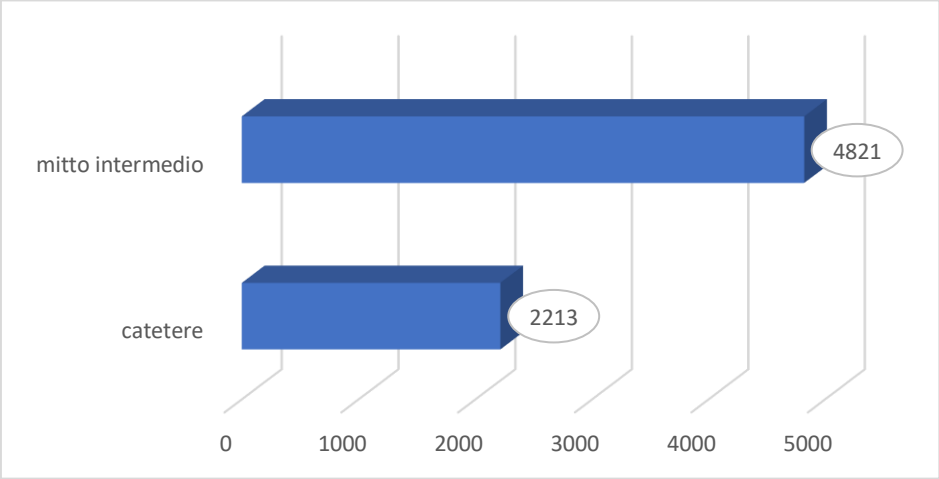

Grafico 1. Distribuzione dei campioni urinari in valore assoluto in base alla modalità di raccolta (mitto intermedio e catetere).

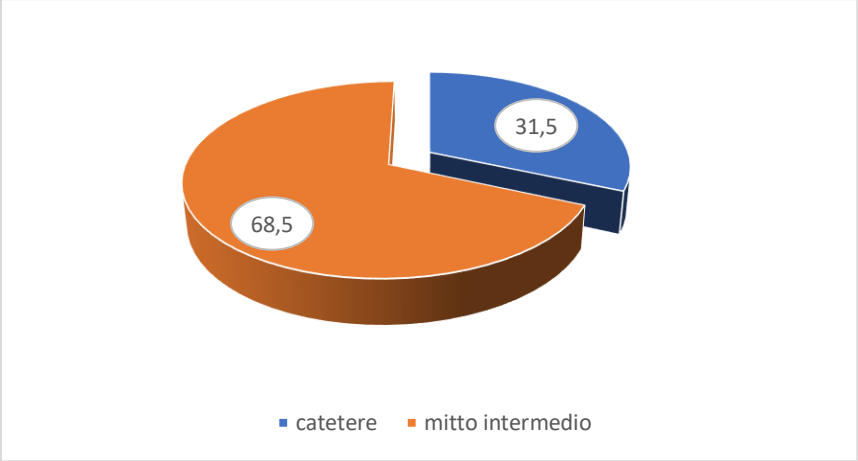

Grafico 2. Rappresentazione dei campioni urinari in percentuale.

L'ampia casistica raccolta nel periodo di studio testimonia la notevole attività diagnostica del Laboratorio di Microbiologia e fornisce una solida base per l'analisi dei microrganismi urinari. La numerosità del campione ha contribuito infatti ad aumentare la robustezza delle osservazioni effettuate, permettendo una descrizione più accurata della distribuzione dei microrganismi patogeni e dei relativi pattern microbiologici nella popolazione esaminata.

La predominanza dei campioni raccolti mediante mitto intermedio (68,5%) conferma il ruolo di questa metodica quale procedura di riferimento per la diagnosi microbiologica delle infezioni delle vie urinarie. Tale modalità di raccolta è infatti quella maggiormente impiegata nella pratica clinica, poiché consente di ottenere un campione in modo non invasivo, semplice e relativamente affidabile, riducendo il rischio di contaminazione da parte della flora periuretrale. Inoltre, rappresenta la tecnica di prima scelta nei pazienti in grado di collaborare e di effettuare autonomamente la raccolta, garantendo un adeguato equilibrio tra accuratezza diagnostica, praticità e accettabilità per il paziente.

La quota significativa di urocolture provenienti da pazienti portatori di catetere urinario (31,5%) sottolinea il ruolo rilevante di questa popolazione nel contesto ospedaliero, riabilitativo e delle strutture di lungodegenza. Tale dato assume particolare rilevanza poiché il cateterismo urinario rappresenta uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di batteriuria e di infezioni delle vie urinarie associate all'assistenza sanitaria. Le linee guida della European Association of Urology (EAU) riportano che il rischio di acquisire batteriuria aumenta progressivamente durante il periodo di cateterizzazione, con un incremento stimato del 3–8% per ogni giorno di permanenza del catetere. [85]. Inoltre, i pazienti cateterizzati sono frequentemente colonizzati da microrganismi appartenenti alla flora ospedaliera, spesso caratterizzati da profili di antibiotico-resistenza più complessi rispetto a quelli osservati nelle infezioni acquisite in comunità.

Distribuzione per sesso e età.

Tra le urocolture incluse nello studio, N. 3742 (53.2%) provenivano da pazienti di sesso femminile e N. 3292 (46.8%) da pazienti di sesso maschile (Grafico 3).

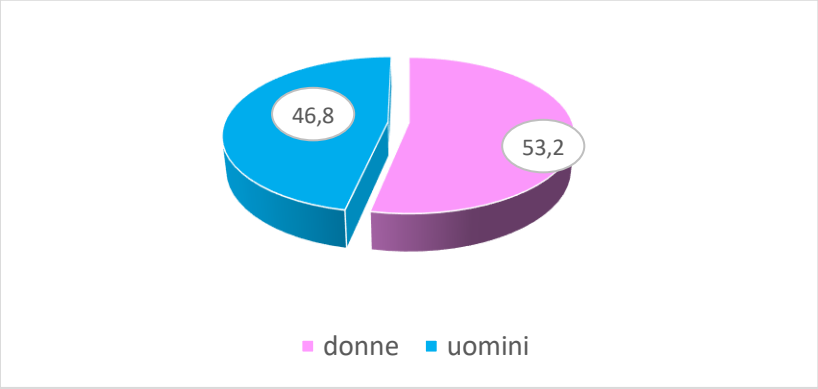

Grafico 3. Distribuzione percentuale delle urocolture in base al sesso dei pazienti.

Tale distribuzione evidenzia una lieve predominanza, nel campione esaminato di donne, dato in linea con la maggior frequenza delle infezioni delle vie urinarie nelle donne rispetto agli uomini. Questo risultato è attribuibile principalmente a fattori anatomici e fisiologici, quali la ridotta lunghezza dell'uretra, la vicinanza dell'orifizio uretrale alla regione perianale e alle modificazioni ormonali che caratterizzano il periodo post-menopausale [92].

La differenza tra i 2 sessi risulta tuttavia relativamente modesta, indicando una buona rappresentatività di entrambi i gruppi nella popolazione studiata. Questo aspetto è particolarmente rilevante ai fini dell'analisi strutturale degli Enterobatteri produttori di ESBL in quanto permette di valutare la diffusione di microrganismi resistenti in una popolazione eterogenea sotto il profilo demografico.

Tuttavia, il numero consistente di campioni provenienti da soggetti di sesso maschile suggerisce che le infezioni delle vie urinarie rappresentano una problematica clinica significativa anche nella popolazione maschile, specialmente nelle fasce di età più avanzate e in presenza di fattori predisponenti.

L'età media della popolazione studiata, calcolata sulla base della distribuzione dei campioni urinari nelle diverse classi di età, è risultato essere pari a 71 anni. Tale dato conferma che la maggior parte delle richieste di urocolture proveniva da una popolazione anziana. Questi dati sono coerenti con la comorbidità, ospedalizzazione e utilizzo di dispositivi urinari. Come si evince dal Grafico 4, la distribuzione dei campioni urinari processati, per sesso e fascia di età, evidenzia una predominanza di richiesta di urocolture nelle fasce di età più avanzate.

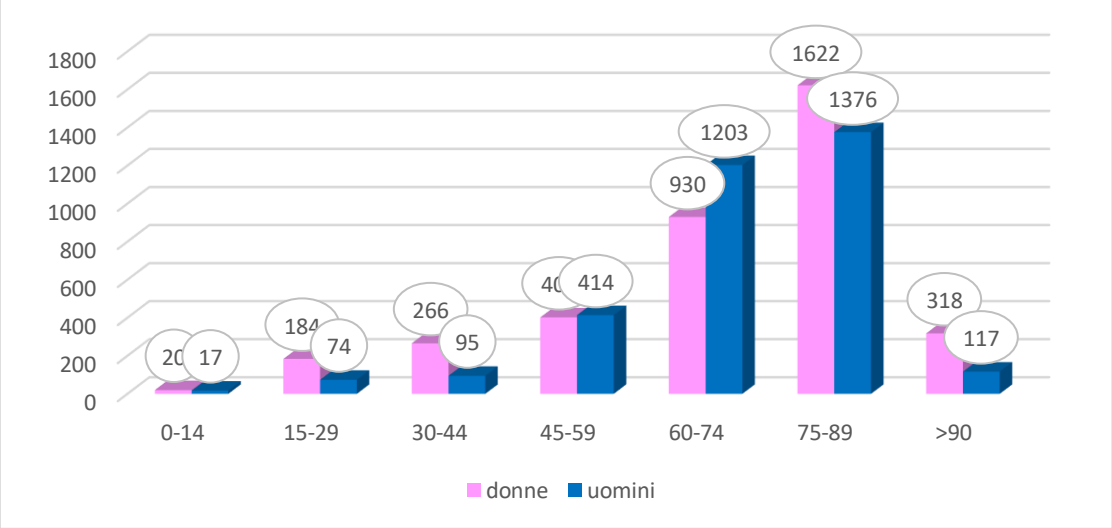

Grafico 4. Distribuzione assoluta delle urocolture per sesso e fascia di età.

Nelle donne il maggior numero di campioni processati è stato registrato nell'intervallo di età 75-89 (N. 1622), seguita dalla fascia di età 60-74 (N. 930). Analogamente, negli uomini, gli intervalli di età più rappresentati risultano essere quelli compresi tra 75-89 (N. 1376) e tra 60-74 anni (N. 1203).

Tali dati confermano come la richiesta di esami colturali urinari aumenti progressivamente con l'età in entrambi i sessi. Questo andamento può essere attribuito a una pluralità di fattori clinici e assistenziali che caratterizzano le fasce di popolazione più anziane. Con l'avanzare dell'età, infatti, si osserva un aumento della prevalenza di patologie croniche quali diabete mellito, insufficienza renale, malattie neurologiche e condizioni di immunodepressione, tutte associate a una maggiore suscettibilità alle infezioni delle vie urinarie. A ciò si aggiungono alterazioni anatomiche e funzionali dell'apparato urinario correlate all'invecchiamento, come l'ipertrofia prostatica nell'uomo, il prolasso degli organi pelvici e le modificazioni ormonali nella donna in post-menopausa, che possono favorire la colonizzazione batterica e la comparsa di episodi infettivi ricorrenti. Un ulteriore elemento è rappresentato dal maggiore ricorso alle cure sanitarie da parte della popolazione anziana, che comporta un incremento delle indagini diagnostiche e dei controlli microbiologici. La frequente esposizione a procedure assistenziali, ricoveri ospedalieri e strutture residenziali, nonché l'utilizzo di dispositivi invasivi come il catetere vescicale, costituiscono infatti importanti fattori di rischio per lo sviluppo di infezioni urinarie, comprese quelle sostenute da microrganismi multiresistenti agli antibiotici. Inoltre, la maggiore attenzione clinica rivolta ai pazienti fragili porta spesso all'esecuzione di urinocolture sia a scopo diagnostico sia per il monitoraggio di condizioni predisponenti o di episodi infettivi ricorrenti. Nel complesso, l'incremento della richiesta di esami colturali urinari nelle classi di età più avanzate riflette non solo una maggiore incidenza delle infezioni delle vie urinarie, ma anche la crescente complessità clinica della popolazione anziana e la necessità di un approccio diagnostico mirato per garantire una gestione appropriata del paziente e un uso razionale della terapia antibiotica.

Dai dati esposti, si osserva una maggior rappresentazione femminile nelle fasce d'età comprese tra 15 e 44 anni, in accordo con la maggior probabilità di infezioni delle vie urinarie nel periodo in cui l'attività sessuale e la gravidanza rappresentano ulteriori fattori predisponenti. Nell'età più avanzata, invece, il divario tra i 2 sessi, tende a ridursi, probabilmente in relazione all'aumento delle patologie urologiche e delle condizioni predisponenti negli uomini. Infatti, tale risultato può essere spiegato dalla maggiore frequenza di patologie prostatiche, che determinano ristagno urinario e aumentano il rischio di infezioni ricorrenti.

A questo si aggiunge il maggiore ricorso a procedure urologiche invasive e al cateterismo vescicale nei pazienti anziani di sesso maschile, condizioni che favoriscono la colonizzazione e l'infezione da microrganismi MDR.

Pertanto, la distribuzione osservata nella popolazione in studio rispecchia il diverso peso dei fattori predisponenti nelle differenti fasce di età e conferma quanto descritto dalla letteratura epidemiologica sulle infezioni delle vie urinarie [93].

Caratteristiche del campione e esiti delle urocolture.

Considerando tutti i campioni di urine seminate, N. 3841 pari a 49.5% sono risultati negativi alla crescita batterica, N. 2837 pari al 40.3% sono risultati positivi alla presenza microbica e N.716 pari al 10.2% mostravano una flora polimicrobica (Tabella 2, Grafico 5).

Tabella 2. Distribuzione dei campioni urinari in base all'esito colturale dopo processamento dell'urocoltura. I valori sono espressi come numero assoluto di campioni (n) e percentuale sul totale.

Esito del processamento dell'urocoltura	**n. campioni**	**%**
Assenza di crescita microbica (Negativa)	3.481	49,5
Presenza di crescita microbica	2.837	40,3
Flora polimicrobica	716	10,2
Totale	**7.034**	**100,0**

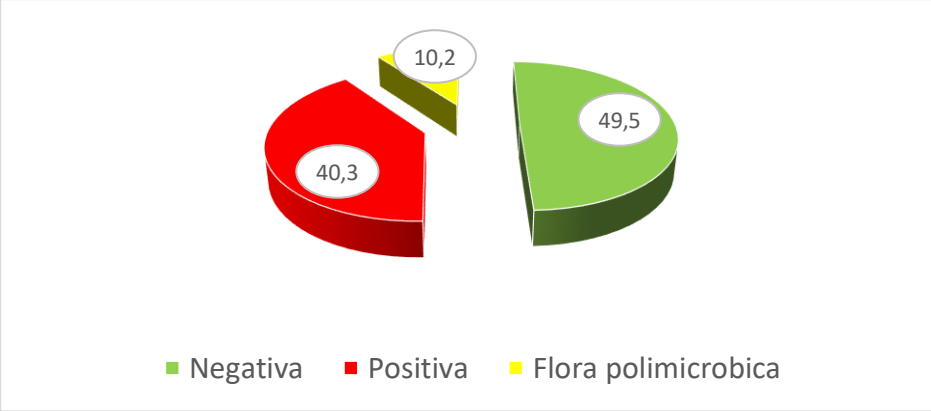

Grafico 5. Ripartizione delle urocolture in base all'esito microbiologico (negative, positive e polimicrobiche).

L'elevata positività alla presenza microbica nelle urocolture conferma la rilevanza clinica delle infezioni urinarie nella popolazione studiata, mentre la presenza di flora polimicrobica può essere correlata a contaminazione del campione durante la raccolta.

Tale distribuzione è coerente con la pratica clinica, in cui la richiesta di urocoltura è spesso effettuata sulla base di sintomi urinari aspecifici o in pazienti già sottoposti a terapia antibiotica empirica, condizioni che possono determinare un'elevata percentuale di esami con esito negativo.

La quota di campioni con flora polimicrobica (10,2%) merita particolare attenzione. Nella maggior parte dei casi, la presenza di molteplici microrganismi è attribuibile alla contaminazione del campione durante la raccolta, soprattutto quando non vengono rispettate le corrette procedure di prelievo del mitto intermedio. Per tale motivo, questi campioni vengono generalmente esclusi dalle analisi epidemiologiche e dai test di sensibilità antimicrobica, poiché non consentono di identificare con certezza l'agente eziologico responsabile dell'infezione. Tale dato sottolinea l'importanza di una corretta informazione del paziente e del personale infermieristico sulle modalità di raccolta delle urine. Inoltre, un'interpretazione errata dei risultati colturali può portare alla prescrizione di terapie antibiotiche non necessarie, aumentando il rischio di effetti avversi per il paziente, di selezione di microrganismi resistenti agli antibiotici e dei costi sanitari. Nei casi dubbi, può essere utile ripetere l'urocoltura, prestando attenzione alle corrette modalità di raccolta delle urine, per ottenere un risultato più affidabile.

Il numero di urocolture positive alla crescita microbica ottenuta nel presente studio (40,3%) ha consentito di raccogliere un'ampia casistica di isolati batterici, rappresentativa della popolazione afferente al laboratorio di microbiologia dell'Istituto Maugeri. Tale numerosità costituisce un presupposto importante per la successiva caratterizzazione di Enterobacteriaceae produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e per la valutazione della loro suscettibilità agli antibiotici con un focus alla fosfomicina. L'esclusione dei campioni con flora polimicrobica consente inoltre di limitare possibili bias interpretativi e di ottenere una valutazione più accurata della distribuzione delle specie batteriche e dei relativi profili di antibiotico-resistenza.

Il numero di campioni positivi e/o negativi alla crescita microbica varia al variare della modalità di raccolta. Infatti, l'analisi dei risultati in relazione alla modalità di raccolta del campione ha evidenziato una marcata differenza nei tassi di positività delle urocolture. Tra le urocolture da catetere, N. 1229 campioni sono risultati positivi alla presenza microbica (55.5%), mentre tra i campioni da mitto intermedio N. 1608 sono risultati positivi (33.4 %) (Tabella 3).

Tabella 3. Interpretazione microbiologica delle urocolture in base alla modalità di raccolta.

Modalità di raccolta	Negativa n. (%)	Positiva n. (%)	Flora polimicrobica n. (%)	Totale
Catetere urinario	627 (28,3)	1.229 (55,5)	357 (16,2)	2.213
Mitto intermedio	2.854 (59,2)	1.608 (33,4)	359 (7,4)	4.821

I risultati hanno evidenziato una marcata differenza nella percentuale di positività alla crescita microbica tra le differenti modalità di raccolta. Infatti, nei campioni, ottenuti mediante catetere urinario, oltre la metà delle urocolture (55,5%) è risultata positiva, mentre le urocolture negative rappresentavano il 28,3% del totale. Al contrario, nei campioni raccolti con mitto intermedio prevalevano le urocolture negative (59,2%), mentre quelle positive costituivano il 33,4%**.** Anche la percentuale di campioni con flora polimicrobica risultava maggiore nelle urine da catetere (16,2%) rispetto ai campioni da mitto intermedio (7,4%) (Grafico 6-7).

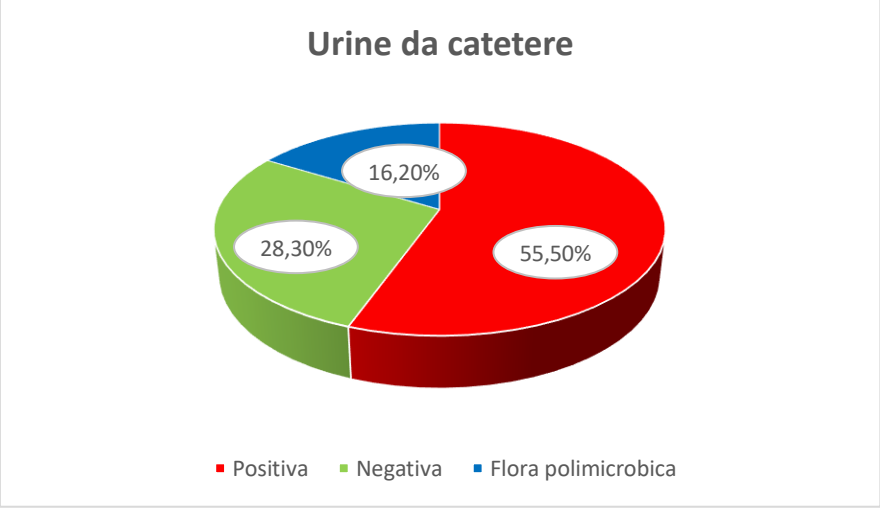

Grafico 6. Percentuale di urinocolture da catetere con esito negativo, positivo e flora polimicrobica.

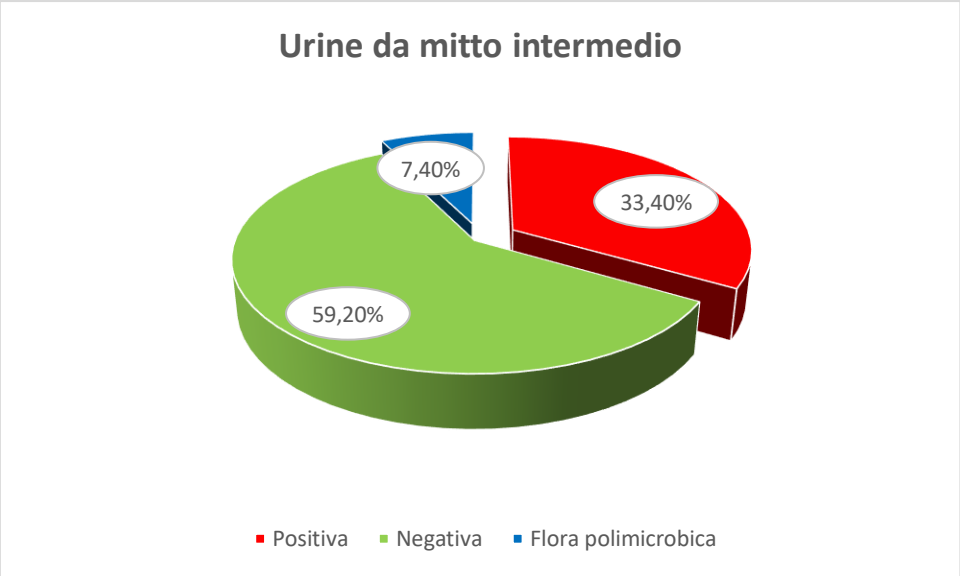

Grafico 7. Percentuale di urinocolture da mitto intermedio con esito negativo, positivo e flora polimicrobica.

Questo andamento è coerente con il contesto clinico in cui viene generalmente richiesto il prelievo da catetere urinario. I pazienti portatori di catetere rappresentano infatti una popolazione caratterizzata da un rischio più elevato di batteriuria e di infezioni correlate all'assistenza, favorito dalla formazione di biofilm sulla superficie del dispositivo, dalla permanenza prolungata del catetere e dalla frequente presenza di comorbilità e ricoveri ospedalieri. Tali condizioni favoriscono inoltre la selezione di microrganismi MDR, inclusi gli *Enterobacterales* produttori di ESBL.

Un ulteriore elemento di interesse è rappresentato dalla maggiore frequenza di campioni con flora polimicrobica nelle urine raccolte mediante catetere (16,2% rispetto al 7,4% nel mitto intermedio). La crescita di più microrganismi può riflettere la complessità della colonizzazione del tratto urinario nei pazienti cateterizzati, spesso associata alla presenza di biofilm microbici. Tuttavia, è necessario interpretare questo dato con cautela, poiché una flora mista può anche derivare da contaminazione del campione o da difficoltà nell'interpretazione microbiologica, rendendo spesso necessario un nuovo prelievo qualora il quadro clinico lo richieda.

Al contrario, nei campioni da mitto intermedio la maggiore percentuale di urocolture negative può essere spiegata dal fatto che questa modalità di raccolta è utilizzata prevalentemente nei pazienti con sospetta infezione urinaria al ricovero, nei quali la sintomatologia urinaria non sempre è sostenuta da una reale infezione batterica. Inoltre, l'eventuale assunzione di antibiotici prima dell'esecuzione dell'esame può ridurre la probabilità di isolamento microbiologico.

I risultati evidenziano quindi come la modalità di raccolta del campione rappresenti un elemento fondamentale nell'interpretazione degli esiti microbiologici. La corretta interpretazione dei risultati deve essere affiancata da un’attenta gestione della fase preanalitica, che assume un ruolo cruciale per

l'affidabilità diagnostica. Errori nella raccolta, conservazione o trasporto del campione possono compromettere significativamente il risultato microbiologico. Tale aspetto diventa ancora più rilevante nei moderni modelli organizzativi basati sulla centralizzazione delle attività di laboratorio, come nel caso del Core Laboratory. Tale organizzazione è presente nella realtà dell'Istituto Maugeri, e la maggiore complessità logistica richiede procedure standardizzate, formazione continua degli operatori e sistemi efficaci di tracciabilità. Pertanto, la qualità dell'esito microbiologico dipende non solo dall'accuratezza delle metodiche analitiche, ma anche dal mantenimento dell'integrità del campione durante tutte le fasi preanalitiche.

Identificazione dei microrganismi responsabili delle infezioni alle vie urinarie.

Tra le N. 7.034 urocolture analizzate, N. 2.837 (40,3%) sono risultate positive alla crescita microbica. Da queste sono stati complessivamente isolati N. 3.019 microrganismi, perché alcune urocolture presentavano la crescita di due patogeni clinicamente significativi. I risultati delle colture sono stati analizzati retrospettivamente tramite il sistema automatizzato dell'istituto, escludendo i ceppi isolati più volte dallo stesso paziente nell'arco di 7 giorni e le crescite polimicrobiche. Il valore percentuale è stato utilizzato per le valutazioni descrittive.

L'analisi microbiologica ha evidenziato una netta predominanza dei batteri Gram-negativi, che rappresentavano N. 2.928 isolati (97,0%), mentre i batteri Gram-positivi sono risultati pari a N. 91 isolati (3,0%) (Grafico 8). Tale distribuzione risulta coerente con quanto ampiamente riportato in letteratura, dove i batteri Gram-negativi costituiscono i principali agenti eziologici delle infezioni delle vie urinarie, essendo responsabili della maggior parte delle infezioni sia comunitarie sia nosocomiali [94].

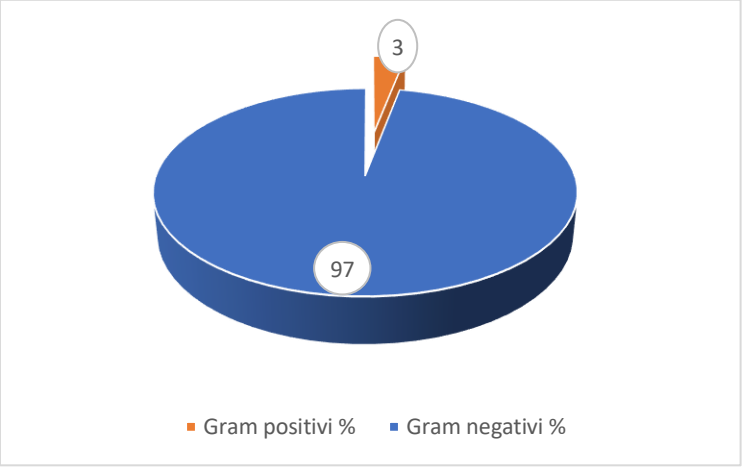

Grafico 8. Percentuale di microrganismi isolati dopo il processamento delle urocolture.

La predominanza dei batteri Gram-negativi apparteneva all'ordine delle *Enterobacterales*, in particolare alla specie *E. coli*, che rappresenta il principale uropatogeno [94]. Questo dato assume

particolare rilevanza nel presente studio, focalizzato sugli Enterobatteri produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), microrganismi associati a un progressivo incremento delle resistenze antimicrobiche e a importanti problematiche terapeutiche [41].

La ridotta quota di batteri Gram-positivi osservata conferma il ruolo secondario di tali microrganismi nelle infezioni urinarie rispetto ai Gram-negativi, pur mantenendo un'importanza clinica in specifiche categorie di pazienti, quali soggetti anziani, portatori di catetere urinario o pazienti con infezioni complicate [95].

Nel complesso, i risultati ottenuti confermano il ruolo predominante dei batteri Gram-negativi e tali evidenze giustificano l'attenzione rivolta alla valutazione dei profili di sensibilità antibiotica, soprattutto in considerazione della crescente diffusione di ceppi MDR. In questo contesto, la fosfomicina mantiene un ruolo di notevole interesse terapeutico grazie al suo ampio spettro d'azione e alla buona attività nei confronti di numerosi isolati di *Enterobacterales* produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL). Diversi studi hanno infatti documentato elevati tassi di suscettibilità alla fosfomicina anche in ceppi caratterizzati da resistenza multipla ad altre classi antibiotiche, rendendola una valida opzione nel trattamento delle infezioni urinarie non complicate e, in specifiche circostanze cliniche, anche di quelle sostenute da microrganismi MDR. L'attuale situazione epidemiologica e la diffusione di cloni multiresistenti agli antibiotici (MDR) in ambito ospedaliero e comunitario, resistenti alle più importanti classi di antibiotici orali, stanno inducendo i medici dell'Istituto Maugeri a riconsiderare antibiotici più datati, come la fosfomicina trometamolo, per il trattamento delle infezioni del tratto urinario (ITU) causate da uropatogeni MDR [96,97].

Inoltre, questi dati sottolineano come la conoscenza dell'epidemiologia locale degli uropatogeni rappresenti uno strumento essenziale per orientare la terapia antibiotica empirica e per monitorare l'evoluzione dei fenomeni di antibiotico-resistenza, contribuendo all'implementazione di efficaci programmi di antimicrobial stewardship. (Tabella 4)

Tabella 4: Elenco dei microrganismi isolati dal processamento delle urocolture.

Microrganismo	**N.assoluto**	**Percentuale**
E. coli	1415	46.9
K. pneumoniae	757	25.1
P. mirabilis	350	11.6
P. aeruginosa	215	7.1
***Citrobacter* spp.**	81	2.7
***Enterobacter* spp.**	56	1.9
***Providencia* spp.**	42	1.4
***Serratia* spp.**	12	0.4
***Enterococus* spp.**	75	2.5
S. aureus	16	0.5
Totale	**3019**	

L'analisi di N. 3.019 microrganismi isolati dalle N. 2.837 urocolture positive ha evidenziato una netta predominanza di *Enterobacterales,* con *E. coli* che rappresenta il microrganismo più frequentemente isolato (n = 1.415; 46,9%), seguito da *K. pneumoniae* (n = 757; 25,1%) e *P. mirabilis* (n = 350; 11,6%).

Complessivamente, queste tre specie costituiscono oltre l'80% degli isolati, confermando il loro ruolo predominante nell'eziologia delle infezioni delle vie urinarie. La predominanza di *E. coli* è attesa come già sottolineato, considerando che questo microrganismo rappresenta il principale uropatogeno grazie alla presenza di numerosi fattori di virulenza, tra cui fimbrie adesive, siderofori, tossine e capacità di formare biofilm, che ne favoriscono la colonizzazione dell'urotelio e la persistenza nell'apparato urinario. Particolarmente rilevante è la percentuale di *K. pneumoniae* (25,1%), superiore a quella comunemente riportata negli studi condotti sulla popolazione generale (European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) [68]. Tale risultato può essere interpretato alla luce delle caratteristiche specifiche della popolazione assistita presso l'IRCCS Maugeri, una struttura che accoglie prevalentemente pazienti anziani e affetti da pluripatologie croniche, spesso sottoposti a frequenti ricoveri ospedalieri e a ripetuti trattamenti antibiotici. Questi fattori determinano una maggiore pressione selettiva sui microrganismi, favorendo la colonizzazione e la successiva infezione da batteri opportunisti come *K. pneumoniae*. Inoltre, la presenza di dispositivi invasivi, quali cateteri urinari, e le condizioni di fragilità clinica tipiche di questa popolazione rappresentano ulteriori fattori predisponenti allo sviluppo di infezioni sostenute da tale patogeno. La maggiore prevalenza osservata nel presente studio potrebbe dunque riflettere l'influenza del contesto assistenziale e delle

caratteristiche epidemiologiche della popolazione esaminata, differenti rispetto a quelle riscontrabili nella comunità generale.

Inoltre, *K. pneumoniae* riveste un ruolo di particolare interesse clinico per la crescente diffusione di ceppi produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e carbapenemasi, responsabili di un progressivo incremento delle resistenze antimicrobiche. Anche *P. mirabilis* (11,6%) rappresenta un patogeno di rilievo, soprattutto nei pazienti portatori di catetere urinario o con anomalie anatomiche e funzionali delle vie urinarie. Tra gli altri Gram-negativi isolati figurano *P. aeruginosa* (N. = 215; 7,1%), *Citrobacter* spp. (N. = 81; 2,7%), *Enterobacter* spp. (N. = 56; 1,9%), *Providencia* spp. (N. = 42; 1,4%) e *Serratia* spp. (N. = 12; 0,4%). Sebbene meno frequenti, tali microrganismi sono spesso associati a infezioni urinarie complicate, alla presenza di cateteri urinari e a pazienti con prolungata esposizione all'ambiente ospedaliero [98].

Per quanto riguarda i batteri Gram-positivi, sono stati identificati N.75 isolati di *Enterococcus* spp. (2,5%) e N.16 isolati di *S. aureus* (0,5%). Tuttavia, gli Enterococchi mantengono un ruolo rilevante nei pazienti ospedalizzati e cateterizzati, nei quali possono essere responsabili di infezioni persistenti e presentare profili di resistenza particolarmente complessi, inclusa la resistenza ai glicopeptidi.

Nel complesso, la distribuzione microbiologica osservata risulta in linea con i principali dati epidemiologici europei, confermando il predominio dei batteri Gram-negativi nelle infezioni urinarie.

Identificazione di isolati clinici di *Enterobacterales* produttori di ESBL.

Tra i N. 2.713 Enterobatteri isolati dai campioni urinari analizzati, N. 713 sono risultati produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), corrispondenti al 26,3% del totale degli Enterobatteri isolati. Nella Tabella 5 è riportata la distribuzione nello specifico degli isolati produttori di ESBL.

Tabella 5. Distribuzione degli isolati produttori di ESBL per specie batterica (numero assoluto).

	E. coli **ESBL**	***K. pneumoniae*** **ESBL**	***P. mirabilis*** **ESBL**	***Citrobacter*** **spp. ESBL**
N.assoluto	364	232	86	31

Tale dato evidenzia una prevalenza significativa di ceppi ESBL-produttori nella popolazione studiata, confermando il crescente impatto epidemiologico di questi microrganismi nelle infezioni delle vie urinarie. (Grafico 9)

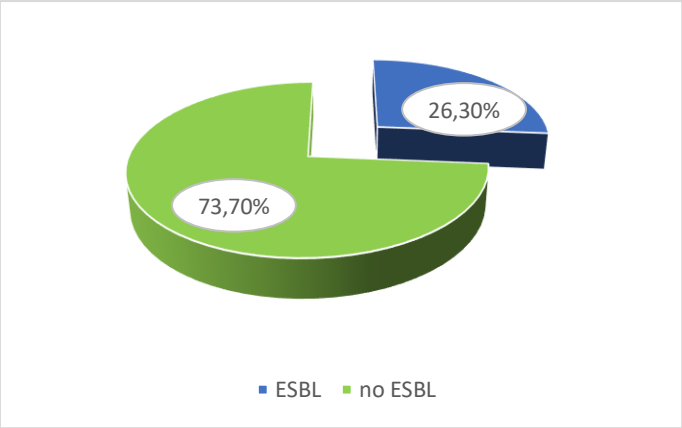

Grafico 9. Rappresentazione in percentuale degli isolati ESBL e non ESBL.

I meccanismi di resistenza agli antibiotici-β-lattamici sono stati identificati mediante test fenotipici utilizzando lo strumento Microscan e il meccanismo di resistenza "ESBL" è stato ulteriormente confermato tramite un test immunoenzimatico a flusso laterale (LFIA: NG-Test CTXM Multi), ottenendo una completa concordanza. I test fenotipici da noi utilizzati e applicati tramite Microscan si basano sulla capacità di vari inibitori (es. clavulanato) di ripristinare la sensibilità alle cefalosporine. Il test NG-Test CTX-M MULTI ha mostrato una sensibilità del 100% e ha rilevato correttamente tutti i produttori di CTX-M (ESBL) identificati dallo strumento automatizzato (Microscan). Complessivamente, N. 713 isolati appartenenti all'ordine *Enterobacterales* sono stati classificati come produttori di ESBL mediante il sistema MicroScan e la presenza di β-lattamasi (tipo CTX-M) è stata successivamente confermata mediante NG-Test CTX-M MULTI. (Tabella 6)

Tabella 6. Numero di Enterobacterales produttori di ESBL identificati dal sistema MicroScan e confermati mediante NG-Test CTX-M MULTI.

Parametro	N. isolati
Enterobacterales classificati come ESBL mediante MicroScan	713
Enterobacterales confermati mediante NG-Test CTX-M MULTI	713

La diffusione di *Enterobacterales* ESBL-produttori rappresenta una delle principali problematiche della moderna microbiologia clinica, poiché tali enzimi conferiscono resistenza alla maggior parte delle penicilline, delle cefalosporine di terza generazione e all'aztreonam, limitando considerevolmente le opzioni terapeutiche disponibili. Negli ultimi anni, la prevalenza di ceppi ESBL è aumentata sia in ambito ospedaliero sia nella comunità, in particolare per *E. coli* e *K. pneumoniae*,

le specie maggiormente coinvolte nella diffusione di questi meccanismi di resistenza [99]. Uno dei motivi è che si trovano comunemente nel sistema digerente e facilitano la contaminazione dell'uretra fornendo una colonizzazione naturale del perineo. Il monitoraggio a livello locale di questo fenomeno può contribuire a caratterizzare il problema e focalizzare l'attenzione sull'attività degli antibiotici utilizzabili nella terapia delle infezioni sostenute da questi microrganismi. Infatti, le linee guida dell'Associazione Europea di Urologia sulle infezioni urologiche suggeriscono che il monitoraggio dei tassi di sensibilità locali è essenziale nel trattamento empirico delle infezioni del tratto urinario.
Per quanto riguarda il sesso, N. 370 ceppi produttori di ESBL provenivano da pazienti di sesso femminile e N. 343 da quelli di sesso maschile. (Tabella 7)

Tabella 7. Distribuzione degli isolati ESBL in base al sesso del paziente.

	Donne (N.)	**Uomini (N.)**
ESBL	370	343

<u>Profilo di resistenza agli antibiotici degli isolati clinici produttori di ESBL.</u>

I dati di sensibilità antimicrobica dei ceppi produttori di ESBL sono stati ottenuti mediante consultazione del Laboratory Information System (LIS) del laboratorio di Microbiologia. Essi comprendono sia i risultati generati nell'ambito della routine diagnostica quotidiana del laboratorio, sia quelli relativi agli isolati processati direttamente durante il periodo di internato e attività sperimentale. Per quanto riguarda la sensibilità agli agenti antimicrobici, determinate con lo strumento automatico Microscan, non sono state volontariamente considerate quelle molecole che hanno una resistenza naturale nei confronti dei ceppi ESBL-produttori [100]. In Tabella 8 vengono evidenziati i risultati ottenuti considerando i breakpoint estrapolati da EUCAST nella versione corrente, ricordando che per la fosfomicina sono presenti i breakpoint solo esclusivamente per *E. coli*. Questa limitazione non ci permette di categorizzare come Sensibile o Resistenti tutte le altre *Enterbacterales.*

Tabella 8. Sensibilità di isolati ESBL nei confronti degli antibiotici considerati.

	***E. coli* ESBL**		***K. pneumoniae* ESBL**		***P. mirabilis* ESBL**		***Citrobacter* ESBL**	
	S %	R %	S	R	S	R	S	R
Amikacina	88.9	11.1	95.1	4.9	94	6	93	7
Gentamicina	33.9	66.1	67.5	32.5	65	35	60	40
Tobramicina	53	47	67.5	32.5	65	35	62	38
Ertapenem	100	0	100	0	100	0	100	0
Imipenem	100	0	100	0	100	0	100	0
Meropenem	100	0	100	0	100	0	100	0
Ciprofloxacina	10	90	6	94	8	92	10	90
Levofloxacina	98.9	1.1	95	5	90	10	89	11
Piperacillina/Tazo	88.9	11.1	63.2	36.8	63	37	64	36
Fosfomicina	89.9	11.1	-	-	-	-	-	-
Sulfa/Trimeth	44.9	55.1	22.5	77.4	22.5	77.5	25	75

Si evidenzia per tutti i ceppi ESBL testati (*E. coli* ESBL, *K. pneumoniae* ESBL, *P. mirabilis* ESBL, *Citrobacter* ESBL), la totale sensibilità ai carbapenemi (ertapenem, imipenem, meropenem :100%). I carbapenemi sono infatti considerati il trattamento di riferimento per le infezioni gravi sostenute da *Enterobacterales* produttori di ESBL, grazie alla loro stabilità nei confronti dell'idrolisi enzimatica mediata da tali β-lattamasi [101]. Per quanto riguarda gli altri antibiotici testati, è stata osservata una notevole variabilità nei tassi di sensibilità. Gli di isolati di *E. coli* ESBL presentano i seguenti profili di resistenza:

- ✓ Penicilline
  - 11.1% risultavano resistenti a piperacillina/tazobactam.
- ✓ Fluorochinoloni
  - 90% risultavano resistenti a ciprofloxacina.
  - 1.1% risultavano resistenti a levofloxacina.
- ✓ Aminoglicosidi
  - 47% risultavano resistenti a tobramicina.
  - 66.1% risultavano resistenti a gentamicina.
  - 11.1% risultavano resistenti a amikacina.
- ✓ Sulfamidici
  - 55.1% risultavano resistenti a trimetoprim/sulfametossazolo.
- ✓ Fosfomicina
  - 11.1% risultavano resistenti.

È stato valutato il profilo di resistenza ad antibiotici appartenenti alle principali classi degli isolati di *K.pneumoniae* ESBL:

- ✓ Penicilline

- 36.8% risultavano resistenti a piperacillina/tazobactam.

✓ Fluorochinoloni
- 94% risultavano resistenti a ciprofloxacina.
- 5% risultavano resistenti a levofloxacina.

✓ Aminoglicosidi
- 32.5% risultavano resistenti a tobramicina.
- 32.5% risultavano resistenti a gentamicina.
- 4.9% risultavano resistenti a amikacina.

✓ Sulfamidici
- 77.4% risultavano resistenti a trimetoprim/sulfametossazolo.

Gli isolati di *P. mirabilis* ESBL mostravano il seguente profilo di resistenza:

✓ Penicilline
- 37% risultavano resistenti a piperacillina/tazobactam.

✓ Fluorochinoloni
- 92% risultavano resistenti a ciprofloxacina.
- 10% risultavano resistenti a levofloxacina.

✓ Aminoglicosidi
- 35% risultavano resistenti a tobramicina.
- 35% risultavano resistenti a gentamicina.
- 6% risultavano resistenti a amikacina.

✓ Sulfamidici
- 77.5% risultavano resistenti a trimetoprim/sulfametossazolo.

Gli isolati di *Citrobacter* ESBL presentano le seguenti percentuali di resistenza:

✓ Penicilline
- 36% risultavano resistenti a piperacillina/tazobactam.

✓ Fluorochinoloni
- 90% risultavano resistenti a ciprofloxacina.
- 11% risultavano resistenti a levofloxacina.

✓ Aminoglicosidi
- 38% risultavano resistenti a tobramicina.
- 40% risultavano resistenti a gentamicina.
- 7% risultavano resistenti a amikacina.

✓ Sulfamidici
- 75% risultavano resistenti a trimetoprim/sulfametossazolo.

L'analisi dei profili di resistenza di *Enterobacterales* produttori di ESBL ha evidenziato la presenza di elevati livelli di multiresistenza nei confronti di diverse classi antibiotiche. In tutte le specie ESBL studiate (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *Citrobacter* spp.) è stata osservata una marcata resistenza ai fluorochinoloni, con percentuali di resistenza alla ciprofloxacina comprese tra il 90% e il 94%. Anche trimetoprim/sulfametossazolo ha mostrato percentuali di resistenza elevate, particolarmente in *K. pneumoniae* (77,4%), *P. mirabilis* (77,5%) e *Citrobacter* spp. (75%), mentre *E. coli* ha presentato valori inferiori ma comunque rilevanti (55,1%). Per quanto riguarda gli aminoglicosidi, sono emerse differenze tra le specie. Gli isolati di *E. coli* hanno mostrato i livelli di resistenza più elevati verso gentamicina (66,1%) e tobramicina (47%), mentre *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *Citrobacter* spp. hanno evidenziato percentuali più contenute, generalmente comprese tra il 32% e il 40%. Al contrario, l'amikacina ha mantenuto un'elevata attività nei confronti di tutte le specie analizzate, con tassi di resistenza inferiori al 12%, confermandosi una delle molecole più efficaci contro gli *Enterobacterales* produttori di ESBL. La resistenza a piperacillina/tazobactam è risultata variabile tra le diverse specie. *E. coli* ha mostrato la percentuale più bassa di resistenza (11,1%), mentre *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *Citrobacter* spp. hanno evidenziato valori simili, compresi tra il 36% e il 37%. Questo dato suggerisce una migliore conservazione dell'attività di piperacillina/tazobactam nei confronti di *E. coli* rispetto agli altri *Enterobacterales* ESBL. La fosfomicina ha mantenuto una buona attività in vitro negli isolati di *E. coli* ESBL (percentuale di resistenza pari a 11.1%). Tale evidenza supporta il suo ruolo come valida opzione terapeutica, in particolare nelle infezioni urinarie non complicate causate. Complessivamente, i dati evidenziano come gli isolati ESBL esaminati presentino un fenotipo di multiresistenza caratterizzato dall'elevata resistenza a fluorochinoloni e trimetoprim/sulfametossazolo. Al contrario, amikacina e fosfomicina hanno dimostrato di conservare una buona attività nei confronti della maggior parte degli isolati, mentre l'efficacia di piperacillina/tazobactam appare specie-dipendente, risultando più favorevole per *E. coli* rispetto a *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *Citrobacter* spp. Questi risultati sottolineano l'importanza dell'antibiogramma nella scelta terapeutica e confermano le limitate opzioni disponibili nel trattamento delle infezioni sostenute da *Enterobacterales* produttori di ESBL [102].

Come atteso, tutti gli isolati sono risultati sensibili ai carbapenemi. Imipenem, meropenem ed ertapenem rappresentano ancora il trattamento di riferimento per le infezioni gravi sostenute da *Enterobacterales* ESBL-produttori, grazie alla loro elevata stabilità nei confronti delle β-lattamasi. Tuttavia, il loro utilizzo deve essere limitato ai casi realmente indicati, poiché l'impiego estensivo dei carbapenemi costituisce uno dei principali fattori di selezione dei batteri produttori di carbapenemasi, con importanti implicazioni cliniche ed epidemiologiche [103].

Concordanza tra il sistema automatizzato e il metodo di riferimento per la fosfomicina.

Tra gli antibiotici utilizzabili come strategie di carbapenem – sparing la fosfomicina ha mostrato, per *E. coli* ESBL, tassi di resistenza molto bassi (11.1%) confermandosi uno degli antimicrobici più attivi nei confronti degli Enterobatteri ESBL isolati nel presente studio.

Solo N. 40 isolati di *E. coli* ESBL sono stati categorizzati tramite Microscan come Resistenti alla fosfomicina presentando una MIC superiore ai breakpoints definiti da EUCAST (>8 ng/ml). (Tabella 8) Poiché il metodo di riferimento ufficiale raccomandato da EUCAST per determinare la sensibilità è la diluizione in agar con l'aggiunta di 50 mg/L di glucosio-6-fosfato nel terreno agar Mueller-Hinton, tali isolati sono stati successivamente ritestati mediante il metodo di riferimento raccomandato utilizzando il test AD FOSFO (Liofilchem Srl), metodo che ha confermato la resistenza in soli N.23 isolati. (Tabella 9 -10)

Tabella 9. Confronto tra MicroScan e agar diluizione per la determinazione della resistenza alla fosfomicina negli isolati di E. coli ESBL.

Isolati di *E. coli* ESBL resistenti alla fosfomicina mediante MicroScan	**Confermati resistenti mediante agar diluizione**	**Non confermati (sensibili mediante agar diluizione)**
40	23	17

Tabella 10. Distribuzione degli isolati di E. coli ESBL secondo il profilo di sensibilità alla fosfomicina determinato mediante agar diluizione.

Risultato agar diluizione	**N. isolati *E.coli* ESBL**	**%**
Resistenti	23	57,5
Sensibili	17	42,5
Totale	40	100,0

L'analisi mediante agar diluizione ha confermato la resistenza alla fosfomicina in 23 dei 40 isolati di *E. coli* ESBL inizialmente classificati come resistenti da MicroScan (57,5%). Nei restanti 17 isolati (42,5%), il test di riferimento ha invece evidenziato sensibilità all'antibiotico. I risultati mostrano una concordanza non ottimale tra le due metodiche nella valutazione della sensibilità alla fosfomicina suggerendo una tendenza del sistema automatizzato a sovrastimare la resistenza a questo antibiotico. Tale osservazione è di particolare rilevanza clinica, poiché potrebbe comportare l'esclusione di una valida opzione terapeutica in pazienti affetti da infezioni urinarie sostenute da microrganismi MDR. La discrepanza osservata tra i due approcci metodologici evidenzia l'importanza della conferma dei risultati di antibiotico-sensibilità ottenuti mediante sistemi automatizzati, soprattutto per molecole caratterizzate da particolari criticità interpretative come la fosfomicina.

Il sistema MicroScan, pur rappresentando uno strumento affidabile e ampiamente utilizzato nella routine microbiologica, può generare risultati discordanti rispetto ai metodi di riferimento in presenza di specifiche combinazioni microrganismo-antibiotico, rendendo necessario il ricorso a metodiche standardizzate nei casi dubbi o di particolare rilevanza clinica.

La determinazione della sensibilità alla fosfomicina rappresenta infatti una delle problematiche più complesse dell'antibiogramma. Diversi studi hanno evidenziato come i sistemi automatizzati possano presentare limitazioni nell'identificazione accurata della resistenza, soprattutto in presenza di MIC prossime ai breakpoint clinici. Per questo motivo, sia le linee guida dell'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing sia numerosi lavori scientifici indicano l'agar diluizione come metodo di riferimento ("gold standard") per la determinazione della sensibilità alla fosfomicina negli *Enterobacterales* [104]. Questi risultati suggeriscono che l'impiego del solo sistema MicroScan potrebbe portare a una sottostima del potenziale utilizzo clinico della fosfomicina nei confronti degli Enterobatteri ESBL-produttori. Al contrario, il metodo di riferimento evidenzia una quota significativa di isolati potenzialmente trattabili. Pertanto, i dati ottenuti sottolineano l'importanza di utilizzare metodiche standardizzate e validate per la determinazione della sensibilità alla fosfomicina, al fine di evitare errori interpretativi che potrebbero influenzare in modo rilevante la scelta terapeutica.

5. CONCLUSIONI

Lo studio condotto presso il Laboratorio di Microbiologia dell'IRCCS Maugeri di Pavia ha consentito di definire in modo integrato il profilo epidemiologico e microbiologico delle infezioni delle vie urinarie sostenute da *Enterobacterales*, con particolare riferimento ai ceppi produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e alla loro suscettibilità alla fosfomicina.

L'analisi dei dati ha evidenziato una significativa rappresentazione di soggetti portatori di catetere urinario, popolazione caratterizzata da un elevato rischio di colonizzazione e infezioni da microrganismi opportunisti. La modalità di raccolta del campione si è dimostrata un elemento rilevante nell'interpretazione del dato microbiologico, con una percentuale di positività superiore nei campioni ottenuti da catetere rispetto a quelli raccolti mediante mitto intermedio.

L'analisi di N.7.034 urocolture ha evidenziato una netta predominanza di campioni provenienti da popolazione anziana, confermando l'età avanzata come principale fattore predisponente alle infezioni urinarie. La distribuzione per sesso ha mostrato una maggiore incidenza complessiva nel sesso femminile, con una parziale inversione del rapporto nelle fasce intermedie, verosimilmente correlata alla maggiore prevalenza di patologie urologiche e condizioni predisponenti nel sesso maschile.

Dal punto di vista microbiologico, gli isolati urinari erano prevalentemente di batteri Gram-negativi, con netta predominanza di *Enterobacterales. E. coli* si è confermato il microrganismo principale seguito da *K. pneumoniae e P. mirabilis*. L'elevata frequenza di isolamento di *K. pneumoniae* osservata nella presente casistica appare particolarmente rilevante e potrebbe essere correlata alle caratteristiche clinico-assistenziali della popolazione studiata, costituita da pazienti anziani, con pluripatologie, ospedalizzazioni prolungate e frequente esposizione a procedure invasive.

Un aspetto di particolare interesse emerso dallo studio è rappresentato dall'elevata prevalenza di *Enterobacterales* produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL).

Sono stati identificati:

- N. 364 isolati di *E. coli* ESBL.
- N. 232 isolati di *K. pneumoniae* ESBL.
- N .86 isolati di *P. mirabilis* ESBL.
- N. 31 isolati di *Citrobacter spp.* ESBL.

Gli isolati ESBL-produttori hanno mostrato il tipico fenotipo MDR, con completa inefficacia delle cefalosporine di terza e quarta generazione e di aztreonam, mentre i carbapenemi hanno mantenuto un'attività. Tuttavia, il loro impiego deve essere rigorosamente limitato ai casi appropriati, nell'ambito di strategie strutturate di antimicrobial stewardship, al fine di prevenire la selezione di ulteriori meccanismi di resistenza.

Tra le opzioni terapeutiche alternative, la fosfomicina ha mostrato un'elevata attività *in vitro*, confermandosi una molecola di grande rilevanza clinica nel trattamento delle infezioni urinarie sostenute da Enterobatteri MDR. Anche amikacina e piperacillina/tazobactam hanno evidenziato buoni livelli di sensibilità, mentre fluorochinoloni, trimetoprim/sulfametossazolo e gentamicina hanno mostrato una significativa riduzione di attività, limitandone l'utilizzo empirico.

Il confronto tra metodiche diagnostiche ha evidenziato una discrepanza significativa tra il sistema automatizzato MicroScan e il metodo di riferimento dell'agar diluizione nella valutazione della sensibilità alla fosfomicina, con una tendenza alla sovrastima della resistenza da parte del sistema automatizzato. Tale evidenza sottolinea l'importanza di utilizzare metodiche standardizzate e validate per garantire un'interpretazione corretta dei dati di sensibilità, soprattutto per molecole critiche come la fosfomicina.

In conclusione, i risultati ottenuti confermano il rilevante impatto clinico ed epidemiologico delle infezioni urinarie da *Enterobacterales* ESBL-produttori, in particolare nella popolazione anziana e nei pazienti fragili o assistiti. La fosfomicina si conferma una valida opzione terapeutica nell'ambito delle strategie di contenimento dell'impiego dei carbapenemi, purché supportata da una corretta valutazione microbiologica.

Infine, il presente lavoro evidenzia la necessità di un approccio integrato basato su sorveglianza microbiologica continua, accuratezza metodologica e programmi di antimicrobial stewardship, elementi imprescindibili per contrastare la diffusione dei microrganismi multiresistenti e preservare l'efficacia delle opzioni terapeutiche ancora disponibili.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] Ryan KJ, Ray CG. *Sherris Microbiologia medica*. 5th ed. Casoria: EMSI; 2013.

[2] Antonelli G, Clementi M, Pozzi G, Rossolini GM. *Principi di microbiologia medica*. 4th ed. Bologna: Casa Editrice Ambrosiana; 2022.

[3] Janda JM, Abbott SL. The Changing Face of the Family *Enterobacteriaceae* (Order: "*Enterobacterales*"): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. Clin Microbiol Rev 2021;34:e00174-20. https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20.

[4] Farmer JJ 3rd, Farmer MK, Holmes B. Gli Enterobacteriaceae: caratteristiche generali. In: Borriello SP, Murray PR, Funke G, editors. IMicrobiologia E Infez. Microbiche Topley Wilson I, vol. 2. 10th ed., Londra: Hodder Arnold; 2005, p. 1317–59.

[5] La Placa M. *Principi di Microbiologia medica*. 10th ed. Società Editrice Esculapio; 2005.

[6] Oliveira J, Reygaert WC. Gram-Negative Bacteria. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

[7] Kim S, Covington A, Pamer EG. The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens 2017;279:90–105. https://doi.org/10.1111/imr.12563.

[8] Xu Y, Liu Y, Liu Y, Pei J, Yao S, Cheng C. Bacteriophage therapy against Enterobacteriaceae. Virol Sin 2015;30:11–8. https://doi.org/10.1007/s12250-014-3543-6.

[9] Yin Q, da Silva AC, Zorrilla F, Almeida AS, Patil KR, Almeida A. Ecological dynamics of Enterobacteriaceae in the human gut microbiome across global populations. Nat Microbiol 2025;10:541–53. https://doi.org/10.1038/s41564-024-01912-6.

[10] Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. eLife 2015;4:e05826. https://doi.org/10.7554/eLife.05826.

[11] Bäckhed, F, Ley, R. E, Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A, Gordon, J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. Science 2005;307:1915–20. https://doi.org/10.1126/science.1104816.

[12] Eckburg, P. B, Bik, E. M, Bernstein, C. N, ., Purdom, E., Dethlefsen, L, Sargent, M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. Science 2005;308:1635–8. https://doi.org/10.1126/science.1110591.

[13] Claesson, M. J, O'Sullivan, O, Wang, Q, Nikkilä, J, Marchesi, J. R, ., Smidt, H, et al. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. PloS One 2009;4:e6669. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669.

[14] Tenaillon, O, Skurnik, D, Picard, B, Denamur, E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2010;8:207–17. https://doi.org/10.1038/nrmicro2298.

[15] Chang, J. T., Morton, S. C, Rubenstein, L. Z, ., Mojica, W. A, Maglione, M, Suttorp, M. J, et al. Interventions for the prevention of falls in older adults: systematic review and meta-analysis of randomised clinical trials. BMJ 2004;328:680. https://doi.org/10.1136/bmj.328.7441.680.

[16] Sack RB. The discovery of cholera - like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. Indian J Med Res 2011;133:171–80.

[17] von Mentzer A, Svennerholm AM. Colonization factors of human and animal-specific enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Trends Microbiol 2024;32:448–64. https://doi.org/10.1016/j.tim.2023.11.001.

[18] Hu J, Torres AG. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? Clin Microbiol Infect 2015;21:729–34. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.015.

[19] Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004;2:123–40. https://doi.org/10.1038/nrmicro818.

[20] Manges AR, Geum HM, Guo A, Edens TJ, Fibke CD, Pitout JDD. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. Clin Microbiol Rev 2019;32:e00135-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00135-18.

[21] Zhou Y, Zhou Z, Zheng L, Gong Z, Li Y, Jin Y, et al. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. Int J Mol Sci 2023;24:10537. https://doi.org/10.3390/ijms241310537.

[22] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Medica*. 6th ed., Elsevier; 2010.

[23] Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol 2018;8:4. https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004.

[24] Pan T, Li Q. Mobile genetic elements in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol 2025;207:e0001225. https://doi.org/10.1128/jb.00012-25.

[25] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. I*Brock Biol. Dei Microrganismi*, Casa Editrice Ambrosiana; 2005.

[26] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980;289:321–31. https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049.

[27] Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev MMBR 2000;64:672–93. https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.672-693.2000.

[28] Roger T, Froidevaux C, Le Roy D, Reymond MK, Chanson A-L, Mauri D, et al. Protection from lethal gram-negative bacterial sepsis by targeting Toll-like receptor 4. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:2348–52. https://doi.org/10.1073/pnas.0808146106.

[29] Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. BMC Microbiol 2010;10:179. https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-179.

[30] Smith KD. Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated iroA gene cluster. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:1776–80. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.003.

[31] Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:3677–82. https://doi.org/10.1073/pnas.0737682100.

[32] Arato V, Raso MM, Gasperini G, Berlanda Scorza F, Micoli F. Prophylaxis and Treatment against *Klebsiella pneumoniae*: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. Int J Mol Sci 2021;22:4042. https://doi.org/10.3390/ijms22084042.

[33] Moradigaravand D, Martin V, Peacock SJ, Parkhill J. Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. mBio 2017;8:e01976-16. https://doi.org/10.1128/mBio.01976-16.

[34] Rózalski A, Sidorczyk Z, Kotełko K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. Microbiol Mol Biol Rev MMBR 1997;61:65–89. https://doi.org/10.1128/mmbr.61.1.65-89.1997.

[35] Jacobsen SM, Stickler DJ, Mobley HLT, Shirtliff ME. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. Clin Microbiol Rev 2008;21:26–59. https://doi.org/10.1128/CMR.00019-07.

[36] Schaffer JN, Pearson MM. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. Microbiol Spectr 2015;3. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013.

[37] Dattelbaum JD, Lockatell CV, Johnson DE, Mobley HLT. UreR, the transcriptional activator of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster, is required for urease activity and virulence in experimental urinary tract infections. Infect Immun 2003;71:1026–30. https://doi.org/10.1128/IAI.71.2.1026-1030.2003.

[38] Coker C, Poore CA, Li X, Mobley HL. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. Microbes Infect 2000;2:1497–505. https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01304-6.

[39] Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933–51, table of contents. https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.

[40] Rodríguez-Baño J, Pascual A. Clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases. Expert Rev Anti Infect Ther 2008;6:671–83. https://doi.org/10.1586/14787210.6.5.671.

[41] Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005;18:657–86. https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.

[42] Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. Nature 1965;208:239–41. https://doi.org/10.1038/208239a0.

[43] Jacoby GA, Medeiros AA. More extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991;35:1697–704. https://doi.org/10.1128/AAC.35.9.1697.

[44] Mugnier P, Dubrous P, Casin I, Arlet G, Collatz E. A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1996;40:2488–93. https://doi.org/10.1128/AAC.40.11.2488.

[45] Hsu AJ, Tamma PD. Treatment of Multidrug-Resistant Gram-Negative Infections in Children. Clin Infect Dis 2014;58:1439–48. https://doi.org/10.1093/cid/ciu069.

[46] Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:2700–6. https://doi.org/10.1128/AAC.00068-06.

[47] Barthélémy M, Péduzzi J, Bernard H, Tancrède C, Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella* oxytoca. Biochim Biophys Acta 1992;1122:15–22. https://doi.org/10.1016/0167-4838(92)90121-s.

[48] Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Infection 1990;18:294–8. https://doi.org/10.1007/BF01647010.

[49] Carattoli A, García-Fernández A, Varesi P, Fortini D, Gerardi S, Penni A, et al. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. J Clin Microbiol 2008;46:103–8. https://doi.org/10.1128/JCM.01542-07.

[50] Giufrè M, Mazzolini E, Cerquetti M, Brusaferro S, CCM2015 One-Health ESBL-producing *Escherichia coli* Study Group. Extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* from extraintestinal infections in humans and from food-producing animals in Italy: a "One Health" study. Int J Antimicrob Agents 2021;58:106433. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106433.

[51] Bonardi S, Cabassi CS, Fiaccadori E, Cavirani S, Parisi A, Bacci C, et al. Detection of carbapenemase- and ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* from bovine bulk milk and comparison with clinical human isolates in Italy. Int J Food Microbiol 2023;387:110049. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.110049.

[52] AMCLI ETS. Percorso Diagnostico- Infezioni vie urinarie. 2024.

[53] Tamadonfar KO, Omattage NS, Spaulding CN, Hultgren SJ. Reaching the End of the Line: Urinary Tract Infections. Microbiol Spectr 2019;7. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0014-2019.

[54] Saint S, Chenoweth CE. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. Infect Dis Clin North Am 2003;17:411–32. https://doi.org/10.1016/s0891-5520(03)00011-4.

[55] Hutchings MI, Truman AW, Wilkinson B. Antibiotics: past, present and future. Curr Opin Microbiol 2019;51:72–80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008.

[56] Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. Front Vet Sci 2017;4:126. https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126.

[57] Barlow G, Nathwani D. Is antibiotic resistance a problem? A practical guide for hospital clinicians. Postgrad Med J 2005;81:680–92. https://doi.org/10.1136/pgmj.2005.035113.

[58] Cardoso, T, Almeida, M, Friedman, N. D, Aragão, I, Costa-Pereira, A, Sarmento, A. E, et al. Classification of healthcare-associated infection: a systematic review 10 years after the first proposal. BMC Med 2014;12:40. https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-40.

[59] van Duijkeren E, Schink A-K, Roberts MC, Wang Y, Schwarz S. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. Microbiol Spectr 2018;6. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0019-2017.

[60] Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med 2006;119:S3-10; discussion S62-70. https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.011.

[61] Nelson RR. Intrinsically vancomycin-resistant gram-positive organisms: clinical relevance and implications for infection control. J Hosp Infect 1999;42:275–82. https://doi.org/10.1053/jhin.1998.0605.

[62] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat Rev Microbiol 2015;13:42–51. https://doi.org/10.1038/nrmicro3380.

[63] Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. Biomed Res Int 2018;2018:9519718. https://doi.org/10.1155/2018/9519718.

[64] Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:969–76. https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09.

[65] Abbas A, Barkhouse A, Hackenberger D, Wright GD. Antibiotic resistance: A key microbial survival mechanism that threatens public health. Cell Host Microbe 2024;32:837–51. https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.05.015.

[66] Sharma S, Chauhan A, Ranjan A, Mathkor DM, Haque S, Ramniwas S, et al. Emerging challenges in antimicrobial resistance: implications for pathogenic microorganisms, novel

antibiotics, and their impact on sustainability. Front Microbiol 2024;15:1403168. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1403168.

[67] Hocquet D, Vogne C, El Garch F, Vejux A, Gotoh N, Lee A, et al. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. Antimicrob Agents Chemother 2003;47:1371–5. https://doi.org/10.1128/AAC.47.4.1371-1375.2003.

[68] European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net)- Annual Epidemiological Report for 2024. Stockholm: ECDC; 2025.

[69] Kaushik A, Kest H, Sood M, Steussy BW, Thieman C, Gupta S. Biofilm Producing Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Infections in Humans: Clinical Implications and Management. Pathogens 2024;13:76. https://doi.org/10.3390/pathogens13010076.

[70] Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, Eichenberger EM, Shah PP, Carugati M, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an overview of basic and clinical research. Nat Rev Microbiol 2019;17:203–18. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0147-4.

[71] Ministero della Salute. Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025. Roma: Ministero della Salute; 2023.

[72] Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G, Vardakas KZ. Fosfomycin. Clin Microbiol Rev 2016;29:321–47. https://doi.org/10.1128/CMR.00068-15.

[73] Candel FJ, Cantón R. Current approach to fosfomycin: From bench to bedside. Enferm Infecc Microbiol Clin 2019;37:1–3. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2018.10.002.

[74] Díez-Aguilar M, Cantón R. New microbiological aspects of fosfomycin. Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter 2019;32 Suppl 1:8–18.

[75] López-Montesinos I, Horcajada JP. Oral and intravenous fosfomycin in complicated urinary tract infections. Rev Espanola Quimioter Publicacion Of Soc Espanola Quimioter 2019;32 Suppl 1:37–44.

[76] De Smet KAL, Kempsell KE, Gallagher A, Duncan K, Young DB. Alteration of a single amino acid residue reverses fosfomycin resistance of recombinant MurA from *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology 1999;145 (Pt 11):3177–84. https://doi.org/10.1099/00221287-145-11-3177.

[77] Borisova M, Gisin J, Mayer C. Blocking peptidoglycan recycling in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates intrinsic resistance to fosfomycin. Microb Drug Resist 2014;20:231–7. https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0036.

[78] Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, et al. Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents 2010;35:333–7. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.011.

[79] Paladin Labs. Monurol package insert. Paladin Labs; 2007.

[80] MacLeod DL, Barker LM, Sutherland JL, Moss SC, Gurgel JL, Kenney TF, et al. Antibacterial activities of a fosfomycin/tobramycin combination: a novel inhaled antibiotic for bronchiectasis J Antimicrob Chem 2009;64:829–36. https://doi.org/10.1093/jac/dkp282.

[81] Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches 2014;15:1351–70. https://doi.org/10.1517/14656566.2014.914172.

[82] Bendirdjian JP, Morin JP, Foucher B, Fillastre JP. [The effect of fosfomycin on the respiration of rat kidney motochondria]. Minerva Med 1978;69:4079–86.

[83] Carlone NA, Borsotto M, Cuffini AM, Savoia D. Effect of fosfomycin trometamol on bacterial adhesion in comparison with other chemotherapeutic agents. Eur Urol 1987;13 Suppl 1:86–91. https://doi.org/10.1159/000472869.

[84] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Clinical Breakpoint Tables v.16.0. EUCAST; 2026.

[85] European Association of Urology. EAU Guidelines on Urological Infections. Arnhem: European Association of Urology; 2025.

[86] Ong A, Mahobia N, Browning D, Schembri M, Somani BK. Trends in antibiotic resistance for over 700,000 *Escherichia coli* positive urinary tract infections over six years (2014-2019) from a university teaching hospital. Cent Eur J Urol 2021;74:249–54.

[87] Auer S, Wojna A, Hell M. Oral Treatment Options for Ambulatory Patients with Urinary Tract Infections Caused by Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4006–8. https://doi.org/10.1128/AAC.01760-09.

[88] Kass EH, Finland M. Asymptomatic infections of the urinary tract. J Urol 2002;168:420–4.

[89] Brubaker L, Chai TC, Horsley H, Khasriya R, Moreland RB, Wolfe AJ. Tarnished gold—the "standard" urine culture: reassessing the characteristics of a criterion standard for detecting urinary microbes. Front Urol 2023;3:1206046. https://doi.org/10.3389/fruro.2023.1206046.

[90] Daves M, Jani E, Panella R, Buonocore R, Pastori S, Roccaforte V. The urine examination: a modern technological test with a very ancient history. Adv Lab Med 2025;7:10–5. https://doi.org/10.1515/almed-2025-0121.

[91] Amaral G, Lo CK-F, Ritchie G, Bilawka J, Lowe CF, Romney MG, et al. Evaluation of the NG-Test® CTX-M MULTI lateral flow immunoassay and genomic discovery of a blaCTX-M-27 variant with a premature stop codon. Diagn Microbiol Infect Dis 2025;113:117034. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2025.117034.

[92] Valiquette L. Urinary tract infections in women. Can J Urol 2001;8 Suppl 1:6–12.

[93] Kranz J, Bartoletti R, Bruyère F, Cai T, Geerlings S, Köves B, et al. European Association of Urology Guidelines on Urological Infections: Summary of the 2024 Guidelines. Eur Urol 2024;86:27–41. https://doi.org/10.1016/j.eururo.2024.03.035.

[94] Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol 2015;13:269–84. https://doi.org/10.1038/nrmicro3432.

[95] Sansone S, Ramos Y, Segal S, Asfaw TS, Morales DK. Uncovering Surface Penetration by Enterococci From Urinary Tract Infection Patients. Urogynecology Phila 2024;30:320–9. https://doi.org/10.1097/SPV.0000000000001476.

[96] Keating GM. Fosfomycin trometamol: a review of its use as a single-dose oral treatment for patients with acute lower urinary tract infections and pregnant women with asymptomatic bacteriuria. Drugs 2013;73. https://doi.org/10.1007/s40265-013-0143-y.

[97] Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu X -h., Falagas ME. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. J Antimicrob Chemother 2012;67:255–68. https://doi.org/10.1093/jac/dkr466.

[98] Nicolle LE. Catheter associated urinary tract infections. Antimicrob Resist Infect Control 2014;3:23. https://doi.org/10.1186/2047-2994-3-23.

[99] Woerther P-L, Burdet C, Chachaty E, Andremont A. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β-Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. Clin Microbiol Rev 2013;26:744–58. https://doi.org/10.1128/CMR.00023-13.

[100] Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. Curr Opin Pharmacol. Curr Opin Pharmacol 2007;7:459–69. https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.08.003.

[101] Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, Van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β-lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR- *P. aeruginosa*). Clin Infect Dis 2021;72:1109–16. https://doi.org/10.1093/cid/ciab295.

[102] McDonald KL, Garland S, Carson CA, Gibbens K, Parmley EJ, Finley R, et al. Measures used to assess the burden of ESBL-producing *Escherichia coli* infections in humans: a scoping review. JAC-Antimicrob Resist 2021;3:dlaa104. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlaa104.

[103] Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2011;17:1791–8. https://doi.org/10.3201/eid1710.110655.

[104] Pullukcu H, Tasbakan M, Sipahi OR, Yamazhan T, Aydemir S, Ulusoy S. Fosfomycin in the treatment of extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*-related lower urinary tract infections. Int J Antimicrob Agents 2007;29:62–5. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.08.039.