

UNIVERSITÀ
DI PAVIA

Dipartimento di Biologia e Biotecnologie "L. Spallanzani"

Laurea Magistrale in Biologia Sperimentale e Applicata

Fondazione Salvatore Maugeri IRCCS

Approccio integrato alla diagnostica microbiologica dell'emocoltura: aspetti tecnici, clinici ed epidemiologici

Relatore:
Prof.ssa Maria Rosalia Pasca

Correlatore:
Dott.ssa Antonella Rezzani

Tesi Sperimentale di
Greta Ballestra

Anno Accademico 2025/2026

INDICE

1.Introduzione 1

1.1. Definizione e importanza clinica delle emocolture 1

1.2. Patogenesi della sepsi 2

1.3. Principali microrganismi coinvolti nelle infezioni del flusso sanguigno 4

1.3.1. Staphylococcus aureus 5

1.3.2. Stafilococchi coagulasi-negativi, in particolare Staphylococcus epidermidis 6

1.3.3. Streptococcus pyogenes 7

1.3.4. Escherichia coli 8

1.3.5. Klebsiella pneumoniae 9

1.3.6. Acinetobacter baumannii 11

1.3.7. Pseudomonas aeruginosa 13

1.3.8. Candida spp. 14

1.4. Differenziazione tra contaminazione e infezione vera 14

1.5. Epidemiologia delle infezioni ematiche 16

1.6. Antibiotico-resistenza 19

1.7. Meccanismi di resistenza agli antibiotici 22

1.7.1. Meccanismi di resistenza ai β-lattamici 25

1.7.2. Resistenza alla colistina 29

2. Scopo del lavoro 30

3. Materiali e metodi 32

3.1. Descrizione del contesto dello studio 32

3.2. Gestione e tracciabilità informatica 33

3.3. Modalità di raccolta e trasporto dei campioni di sangue 33

3.4. Trasporto dei campioni 34

3.5. Sistema di emocoltura utilizzato e condizioni di incubazione 34

3.6. Gestione delle emocolture positive alla crescita microbica: esame microscopico 36

3.7. Processamento delle emocolture sui terreni agarizzati 38

3.8. Lettura e interpretazione delle piastre colturali 42

3.9. Metodo di identificazione microbica e antibiogramma per la valutazione della sensibilità agli antibiotici 44

3.10. Antibiogramma da colonia giovane 48

3.11. Determinazione dei meccanismi di resistenza agli antibiotici 48

3.11.1. Determinazione della produzione di ESBL 48

3.11.2. Caratterizzazione delle carbapenemasi 50

3.12. Identificazione dei miceti 51

3.13. Antimicogramma 52

4. Risultati e Discussione 54

4.1. Premessa 54

4.2. Distribuzione delle emocolture processate 55

4.3. Emocolture solitarie 58

4.4. Distribuzione per età e sesso 61

4.5. Emocolture positive alla crescita microbica 63

4.5.1. Analisi dei tempi di positivizzazione alla crescita microbica dei flaconi 64

4.6. Esame microscopico a partire dalle emocolture positive alla crescita microbica 66

4.7. Identificazione dei Microrganismi responsabili di batteriemie 67

4.7.1. Discriminazione della contaminazione delle emocolture 69

4.7.2. Profilo di antibiotico-resistenza degli isolati clinici resistenti ai carbapenemi (CPE) ... 71

5. Conclusioni 75

6. Bibliografia 78

1.Introduzione

1.1. Definizione e importanza clinica delle emocolture

Le infezioni del flusso sanguigno (Bloodstream Infection, BSI) sono una delle principali cause di morbilità e mortalità nei pazienti ospedalizzati in tutto il mondo. L'emocoltura è lo strumento principale per determinare se un paziente ha una BSI, consentendo l'identificazione dell'agente eziologico responsabile e fornisce indicazioni fondamentali per l'impostazione di una terapia antibiotica mirata [1]. Questa tecnica è la più vantaggiosa in termini di rapporto costo/efficacia, in quanto consente l'isolamento, l'identificazione e la valutazione della sensibilità agli antimicrobici di batteri e funghi presenti nel sangue. Nel sospetto di un'infezione del torrente ematico, l'esecuzione dell'emocoltura deve essere effettuata tempestivamente, non appena si manifesta il sospetto clinico, in particolare nei pazienti con sepsi o shock settico. L'esecuzione dell'esame non richiede l'attesa della comparsa del picco febbrile o di brividi, poiché la batteriemia può essere presente anche in assenza di tali manifestazioni cliniche. La richiesta di emocoltura si basa pertanto su un sospetto clinico di batteriemia e risulta indicata non solo nei quadri di sepsi, ma anche in corso di infezioni focali potenzialmente associate a disseminazione ematica, quali polmonite, meningite, osteomielite e altre patologie infettive sistemiche. Segni clinici che possono giustificare l'esame includono febbre, ipotermia, brividi, tachicardia, ipotensione, alterazioni respiratorie o dello stato di coscienza, e segni di infezione localizzata con possibile coinvolgimento sistemico. Al momento non esiste ancora un consenso univoco sul timing ideale per eseguire il prelievo, sebbene questo incida sulla sensibilità diagnostica.

Tuttavia, si raccomanda di:

- Effettuare l'esame appena vi sia un sospetto clinico;
- Non attendere brividi o febbre per eseguire il prelievo.

Per aumentare la sensibilità diagnostica, è raccomandata l'esecuzione di 2–3 prelievi ematici da microcircoli diversi fatti in completa sterilità, ciascuno costituito da un flacone per aerobi e uno per anaerobi, per un totale complessivo di 4–6 flaconi. In ogni flacone dovrebbero essere inoculati circa 8 ml di sangue, senza superare i 10 mL, raggiungendo così un volume totale compreso tra 20 e 30 mL [2].

1.2. Patogenesi della sepsi

Un'infezione sistemica si verifica quando microrganismi patogeni, quali batteri, virus o funghi, entrano nel circolo sanguigno e si diffondono nell'organismo. A differenza delle infezioni localizzate, circoscritte a una specifica sede anatomica, le infezioni sistemiche coinvolgono più organi o apparati, compromettendo lo stato di salute generale del paziente [3].

Le infezioni del torrente ematico vengono definite con il termine batteriemia, che indica la presenza di batteri in circolo [4]. La classificazione delle batteriemie in base all'andamento temporale descrive la modalità e la frequenza con cui i microrganismi raggiungono il circolo ematico. Tale distinzione riveste un ruolo di particolare importanza clinica, poiché consente di orientare il percorso diagnostico e di impostare in modo appropriato la strategia terapeutica.

- Batteriemia transitoria: È caratterizzata dalla presenza di batteri nel sangue per un intervallo di tempo limitato, generalmente compreso tra pochi minuti e alcune ore. Questa condizione si osserva frequentemente in seguito a procedure che comportano la manipolazione di tessuti infetti o di superfici mucose fisiologicamente colonizzate da microrganismi, come interventi odontoiatrici, cateterismo urinario o procedure chirurgiche minori.
- Batteriemia intermittente: Si verifica quando i batteri compaiono nel circolo sanguigno in modo discontinuo, con episodi che possono presentarsi a intervalli regolari oppure irregolari. Tale forma è tipicamente associata alla presenza di focolai infettivi localizzati non adeguatamente drenati, che rilasciano periodicamente microrganismi nel torrente ematico. Esempi frequenti sono rappresentati da ascessi, colangiti e polmoniti.
- Batteriemia continua o persistente: È definita dalla presenza costante di batteri nel sangue e rappresenta una caratteristica tipica delle infezioni intravascolari endogene. Questa condizione si riscontra soprattutto nell'endocardite batterica, negli aneurismi infetti e nelle infezioni correlate a dispositivi intravascolari, come protesi vascolari o cateteri venosi centrali a permanenza.

La distinzione tra batteriemia transitoria, intermittente e continua è fondamentale nella pratica clinica, poiché fornisce indicazioni rilevanti sull'origine dell'infezione, sul tipo di accertamenti microbiologici da eseguire e sulla scelta del trattamento antibiotico più appropriato [5].

È fondamentale, inoltre distinguere il concetto di batteriemia da quello di sepsi, termini spesso utilizzati impropriamente come sinonimi ma riferiti a condizioni cliniche differenti. La batteriemia è definita come la presenza di batteri vitali nel circolo sanguigno, generalmente documentata mediante emocoltura positiva [6,7]. Questa condizione non è necessariamente associata a manifestazioni cliniche significative. In molti casi, infatti, l'organismo è in grado di eliminare rapidamente i microrganismi dal sangue attraverso i meccanismi di difesa immunitaria, senza che si sviluppi una

risposta patologica di rilievo [7]. La sepsi, invece, rappresenta una condizione clinica complessa, definita come una disfunzione d'organo potenzialmente letale causata da una risposta disregolata dell'ospite a un'infezione [8]. Tale condizione deriva dall'attivazione incontrollata di processi immunitari e infiammatori che possono determinare danno tissutale, alterazioni emodinamiche e insufficienza multiorgano. È importante sottolineare che non tutte le batteriemie evolvono in sepsi. Ad esempio, una batteriemia transitoria conseguente a procedure odontoiatriche o ad altre manovre invasive può risolversi spontaneamente senza provocare conseguenze cliniche. Allo stesso modo, non tutte le sepsi sono associate a una batteriemia documentabile, poiché l'infezione può rimanere confinata in un focolaio localizzato oppure le emocolture possono risultare negative nonostante la presenza di una grave infezione sistemica [8,9]. La distinzione tra batteriemia e sepsi riveste pertanto un ruolo fondamentale nella pratica clinica, poiché consente una corretta interpretazione dei risultati microbiologici e contribuisce alla valutazione prognostica e all'impostazione del trattamento terapeutico.

Il sangue e gli organi deputati alla filtrazione del sangue sono fisiologicamente sterili. Pertanto, la presenza di microrganismi nel sangue può derivare dalla disseminazione di patogeni a partire da un focolaio primario di infezione, attraverso il superamento delle barriere anatomiche e immunologiche dell'ospite [10]. L'accesso dei microrganismi al circolo sanguigno può avvenire attraverso diverse modalità, tra cui la disseminazione a partire da un focolaio infettivo, il passaggio da siti di colonizzazione asintomatica dell'ospite e l'introduzione diretta attraverso dispositivi intravascolari (es. cateteri venosi centrali) o procedure invasive, ma derivare anche direttamente dall'ambiente esterno. Le modalità di ingresso dipendono dal microrganismo coinvolto e dal sito di origine dell'infezione. Una volta raggiunto il torrente ematico, i patogeni devono adattarsi a un microambiente caratterizzato da condizioni differenti rispetto al loro habitat originario e fronteggiare i meccanismi di difesa dell'ospite. La capacità di raggiungere e persistere nel circolo sanguigno dipende dall'interazione tra le caratteristiche del microrganismo e le difese dell'ospite. I patogeni possono utilizzare diversi meccanismi per superare le barriere anatomiche, acquisire nutrienti essenziali e contrastare la risposta immunitaria. Queste strategie variano in funzione della specie microbica e contribuiscono alla capacità di causare infezioni del torrente ematico [10].

La sepsi non consiste esclusivamente in una risposta infiammatoria sistemica o un disturbo immunitario, ma comporta alterazioni della funzione di molteplici organi del corpo. A livello cellulare e molecolare, la sua patogenesi è estremamente complessa e comprende squilibri nella risposta infiammatoria, disfunzione immunitaria, danno mitocondriale, coagulopatia, anomalie della rete neuroendocrina immunitaria, stress del reticolo endoplasmatico, autofagia e altri processi fisiopatologici, che in ultima analisi portano a disfunzione d'organo. Lo squilibrio della risposta infiammatoria rappresenta la fase più critica della patogenesi della sepsi e si verifica durante l'intero

processo della sepsi. I patogeni che scatenano la risposta possono essere batteri, funghi, parassiti e virus. Durante la risposta acuta iniziale dell'ospite ai patogeni si verifica l'inglobamento dei patogeni da parte dei macrofagi e la produzione di una serie di citochine pro-infiammatorie. Questo processo può innescare tempeste di citochine e attivare il sistema immunitario innato [11]. Parallelamente all'attivazione della risposta infiammatoria si sviluppano importanti meccanismi immunosoppressivi. I pazienti con sepsi quasi sempre sono linfopenici, con uno stato generale di immunosoppressione. Un ruolo centrale è svolto dall'endotelio vascolare, che subisce alterazioni strutturali e funzionali con aumento della permeabilità capillare, edema tissutale e compromissione della microcircolazione. L'infiammazione, inoltre, attiva la cascata della coagulazione, favorendo la formazione di microtrombi nei piccoli vasi sanguigni (immunotrombosi). Questo fenomeno riduce ulteriormente la perfusione dei tessuti e contribuisce al danno d'organo. Nei casi più gravi può svilupparsi una coagulazione intravascolare disseminata (CID).

Le alterazioni della microcircolazione e la disfunzione mitocondriale causano una ridotta utilizzazione dell'ossigeno da parte delle cellule, determinando il progressivo sviluppo della sindrome da disfunzione multiorgano (MODS), che può coinvolgere polmoni, reni, fegato, cuore e sistema nervoso centrale [12].

1.3. Principali microrganismi coinvolti nelle infezioni del flusso sanguigno

I principali microrganismi coinvolti nelle BSI includono batteri Gram-positivi e Gram-negativi. Tra i batteri Gram-positivi i più comunemente isolati in caso di sepsi e batteriemia sono: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* e Stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS). Tra i Gram-negativi si riscontrano: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumanni.* Le BSI possono essere causate da una singola specie microbica o da infezioni polimicrobiche, avere origine da diversi siti primari, portare a infezioni secondarie e innescare risposte dell'ospite di gravità variabile [10]. Storicamente, si riteneva che i batteri Gram-negativi fossero i principali responsabili della sepsi; tuttavia, negli ultimi 25 anni è emerso che i batteri Gram-positivi rappresentano attualmente la causa più frequente [13].

I batteri patogeni producono i fattori di virulenza che promuovono la patogenesi, favorendo l'instaurarsi e il mantenimento della malattia. [4].

I fattori di virulenza prodotti dalle principali specie microbiche coinvolte nelle infezioni del torrente ematico sono: adesine, tossine, sistemi di acquisizione del ferro e meccanismi che consentono di eludere le difese immunitarie. Di seguito sono descritti i principali batteri patogeni con i relativi fattori di virulenza prodotti.

1.3.1. Staphylococcus aureus

I membri del genere *Staphylococcus* sono in grado di raggiungere elevate cariche batteriche durante le infezioni endovascolari grazie alla formazione di focolai aderenti alle pareti dei vasi sanguigni [10]. Tra gli Stafilococchi la specie patogena per eccellenza è *S. aureus*, uno dei più comuni e importanti in ambito comunitario e ospedaliero. È la principale causa di morte a livello mondiale con un tasso di letalità va dal 15% al 30%, con una stima di 300.000 decessi all'anno. Si trova specialmente nel tratto respiratorio superiore (gola, naso), ma anche nella cute e per questo motivo che la loro diffusione è comune e responsabile di molte infezioni contratte in ospedale. È responsabile di infezioni cutanee (foruncoli) e di infezioni organo-specifiche come polmoniti, osteomeliti, infezione da ferita chirurgica e batteriemie primarie e secondarie. I principali fattori di rischio sono i dispositivi intravascolari (dispositivi cardiaci impiantabili e cateteri vascolari per dialisi), le procedure chirurgiche recenti, l'uso di farmaci per iniezione, diabete e precedenti infezioni da *S. aureus*. La batteriemia prolungata da *S. aureus*, superiore a 48 ore, è associata a un rischio di mortalità del 39% dopo 90 giorni [4,14].

S. aureus produce numerosi fattori di virulenza:

- Capsula: è di natura polisaccaridica e poco sviluppata. Svolge una funzione protettiva nei confronti della fagocitosi [4].
- Proteina A: è localizzata nella parete cellulare e lega il frammento Fc delle immunoglobuline, soprattutto delle IgG, interferendo con l'opsonizzazione mediata dalle immunoglobuline [4,15].
- Adesine: sono in grado di legarsi a macromolecole dell'ospite, come fibronectina, laminina e collagene.[4].
- Catalasi: è un enzima che scinde il perossido di idrogeno in acqua e ossigeno. Svolge un ruolo importante nel consentire alle cellule batteriche di moltiplicarsi all'interno dei fagociti dell'ospite [4].
- Enzimi extracellulari: dopo essersi legato alla cellula ospite, il batterio produce diversi enzimi extracellulari, tra cui la coagulasi, che induce la coagulazione del plasma favorendo la conversione del fibrinogeno in fibrina, e l'ialuronidasi, che facilita la diffusione nei tessuti degradando l'acido ialuronico, un polisaccaride che contribuisce a mantenere unite le componenti dei tessuti [4].

Un ruolo particolare è svolto dalla coagulasi (Coa) e dalla proteina legante il fattore di von Willebrand (vWbp), che attivano la protrombina e favoriscono la conversione del fibrinogeno in fibrina. Questi fattori possono contribuire alla protezione del batterio dalle difese dell'ospite e alla sua persistenza nei tessuti infetti. Il legame del batterio al fibrinogeno o alla fibrina contribuisce alla patogenesi della malattia, favorendo la formazione di ascessi e la persistenza batterica nei tessuti dell'ospite, e può

contribuire allo sviluppo di sepsi letale. Gli stafilococchi intrappolati nella rete di fibrina sono protetti dalla clearance opsonofagocitica da parte delle cellule immunitarie dell'ospite e, favorirne la disseminazione attraverso lesioni tromboemboliche.

A differenza della coagulazione mediata dalla trombina dell'ospite, quella indotta dalle coagulasi stafilococciche presenta caratteristiche specifiche che possono favorire l'evasione delle difese immunitarie. Questi meccanismi rendono le coagulasi potenziali bersagli terapeutici per contrastare le infezioni invasive da *S. aureus*, comprese quelle causate da ceppi resistenti agli antibiotici [15].

1.3.2. Stafilococchi coagulasi-negativi, in particolare Staphylococcus epidermidis

Dal punto di vista epidemiologico, gli stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS) rappresentano i principali agenti responsabili delle BSI, con una prevalenza stimata del 17,4%, seguiti da *S. aureus* (12,3%), *E. coli* (10,9%) e *K. pneumoniae* (9,4%). I ceppi di CoNS comprendono specie quali *S. epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus hominis*. Tuttavia, i CoNS rappresentano anche il contaminante più comune delle emocolture; pertanto, per distinguere una vera batteriemia dalla contaminazione, è fondamentale eseguire più serie di colture ematiche per paziente, raccolte in momenti diversi mediante venipunture separate. L'isolamento dello stesso microrganismo, con lo stesso antibiotipo, in più campioni consente di differenziare i falsi positivi dai veri casi di infezione, aspetto essenziale per una corretta gestione clinica e per la sorveglianza epidemiologica [16]. A livello clinico la specie di *S. epidermidis* è la più importante e diffusa a livello cutaneo; è un patogeno opportunista coinvolto principalmente in infezioni ospedaliere, soprattutto in pazienti immunocompromessi. Le infezioni ospedaliere sono legate alla colonizzazione di cateteri vascolari, per la capacità del batterio di aderire a supporti di plastica attraverso la formazione di biofilm. È per questo uno dei patogeni maggiormente isolati nelle emocolture, andando a indurre complicazioni emboliche e tromboflebitiche [4].

I CoNS, soprattutto *S. epidermidis*, hanno la capacità di aderire alle superfici polimeriche dei dispositivi medici impiantati o permanenti e di formare biofilm. Il biofilm favorisce la persistenza batterica sulle superfici intravascolari e riduce l'efficacia delle difese immunitarie e del trattamento antimicrobico [17].

1.3.3. Streptococcus pyogenes

S. pyogenes, appartiene agli streptococchi del gruppo A, è un batterio Gram-positivo, aerobio facoltativo. Lo spettro delle infezioni causate da *S. pyogenes* è ampio, spaziando dalle infezioni delle vie respiratorie, artrite settica, sepsi puerperale e fascite necrotizzante fino alla sindrome da shock tossico. Tutte queste forme della malattia possono essere complicate dalla batteriemia. Le infezioni da streptococco sono altamente contagiose e la trasmissione avviene da persona a persona, sia tramite aereosol sia per contatto diretto, raramente tramite alimenti contaminati, portando allo sviluppo di focolai della malattia. Nel 75% dei casi la forma più comune di infezione invasiva di *S. pyogenes* è la batteriemia. Le infezioni localizzate senza batteriemia o fascite necrotizzante si verificano meno frequentemente (19% e 7%). Questo patogeno è responsabile soltanto dell'8% delle batteriemie rispetto ad altri microrganismi ma ha una mortalità più alta, posizionandosi al quinto posto, dopo *E. coli, K. pneumoniae, S. aureus* e *P. aeruginosa*. Questa sua elevata mortalità richiede una diagnosi rapida e una terapia antibiotica appropriata il prima possibile [18].

S. pyogenes produce diversi fattori di virulenza che contribuiscono all'adesione, alla diffusione nei tessuti e all'evasione immunitaria.

Tra questi rientra la capsula, dotata di attività antifagocitaria e costituita da acido ialuronico. Quest'ultimo è presente anche nell'ospite ed è pertanto immunologicamente tollerato. Il principale determinante della patogenicità è la proteina M, una proteina di superficie che esercita una marcata attività proinfiammatoria. In particolare, la proteina M1 favorisce l'attivazione di piastrine, neutrofili e monociti, amplificando la risposta infiammatoria [19]. La proteina M è, inoltre, responsabile dell'inibizione della via alternativa del complemento e contrasta la fagocitosi [4].

S. pyogenes secerne diverse proteine extracellulari dotate di attività emolitica e citolitica, tra cui le streptolisine O e S. Queste esotossine svolgono attività emolitica e citolitica. La streptolisina O esercita la propria attività citolitica attraverso la formazione di pori nella membrana cellulare, compromettendone l'integrità. È attiva su un'ampia gamma di cellule, tra cui eritrociti, leucociti, macrofagi, piastrine e cellule epiteliali. La streptolisina S (SLS), invece, è responsabile della caratteristica β-emolisi osservabile su agar sangue. È in grado di danneggiare diverse cellule dell'ospite, tra cui eritrociti, neutrofili, linfociti e cellule epiteliali, contribuendo all'evasione delle difese immunitarie e al danno tissutale [19]. Altri fattori, come streptochinasi, DNasi e proteasi, contribuiscono alla degradazione di componenti dell'ospite e alla diffusione dell'infezione [19].

Alcuni ceppi producono inoltre esotossine pirogene (SPE) con attività di superantigene, associate a risposte infiammatorie sistemiche particolarmente intense. Queste tossine sono infatti in grado di attivare i linfociti T e di indurre la produzione di diverse citochine, tra cui TNF-α, IL-1β, IL-2 e interferone gamma. Le SPE comprendono diverse varianti, tra cui SPE-A, SPE-B e SPE-C, associate a gravi manifestazioni infettive. In particolare, SPE-A è associata alla scarlattina e alla sindrome da

shock tossico, mentre SPE-B è associata alla sindrome da shock tossico [4]. *S. pyogenes* esprime anche diverse ialuronidasi, classificate come fattori di virulenza per la loro capacità di favorire la diffusione del batterio e delle sue proteine e tossine [19].

1.3.4. Escherichia coli

La batteriemia da *E. coli* è attribuita principalmente a infezioni delle vie urinarie (UTI) o del distretto gastroenterico; per esempio, l'origine può essere un'infezione intra-addominale causata da una perforazione intestinale [4]. Le infezioni urinarie e la batteriemia da *E. coli* sono strettamente collegate; per questo le UTI sono una fonte dominante di batteriemia da *E. coli* [20] e per tanto *E. coli* è la fonte più comune di UTI batteriemica [21]. I batteri possono risalire gli ureteri fino al parenchima renale e attraversare l'epitelio dei tubuli renali e l'endotelio capillare per entrare nel sangue durante le infezioni urinarie [20]. Inoltre, le infezioni del sangue causate da *E. coli* sono favorite da una patologia preesistente del paziente, come cirrosi epatica, diabete, neoplasie ed emopatie, ma anche da condizioni di immuno-compromissione. Rispetto agli adulti, i neonati sono più predisposti alla sepsi da *E. coli* dovuta alla mancanza di IgM protettive. Attualmente, questo batterio Gram-negativo è il principale patogeno responsabile di sepsi nella pratica assistenziale [4]. I tassi di mortalità per la batteriemia da *E. coli* originata da UTI sono circa il 17% inferiori rispetto a quelli per la batteriemia da *E.* coli provenienti da altre fonti [20].

Nei ceppi di *E. coli* responsabili di infezioni extraintestinali (ExPEC), inclusa la batteriemia, i principali fattori di virulenza comprendono le adesine, le tossine e i sistemi di acquisizione del ferro. Le adesine, tra cui le fimbrie P (*pap*), S (*sfa*) e F1C (*foc*), e l'adesina afimbriale Afa (*afa*), favoriscono l'adesione alle cellule dell'ospite e la colonizzazione dei siti d'infezione. Le tossine prodotte, come l'emolisina, il fattore necrotizzante citotossico e la tossina distendente citoletale, contribuiscono al danno cellulare e alla compromissione delle barriere epiteliali.

Un ulteriore elemento importante è rappresentato dai sistemi di acquisizione del ferro, essenziali per la sopravvivenza e la proliferazione batterica nell'ospite. Tra i geni coinvolti nella captazione dei siderofori figurano *iroN*, *fyuA*, *ireA* e *iutA*, mentre il sistema di trasporto Sit (*sit*) consente l'importazione di ferro e manganese.

Per sopravvivere nel flusso sanguigno, *E. coli* deve inoltre contrastare le difese immunitarie dell'ospite, in particolare il sistema del complemento e i peptidi antimicrobici. A questo scopo, può modificare la carica del lipopolisaccaride (LPS), riducendo l'efficacia dei peptidi antimicrobici con carica positiva. Inoltre, la proteasi codificata dal gene *prc* è stata associata all'inattivazione di componenti del complemento e a una maggiore resistenza all'attività battericida del siero [10].

Tutti i ceppi di *E. coli* producono l'antigene O, che rappresenta la catena polisaccaridica del lipopolisaccaride, e l'antigene H flagellare, costituito da proteine flagellari. Solo alcuni ceppi

producono anche l'antigene K, corrispondente alla capsula polisaccaridica [4]. La capsula polisaccaridica contribuisce alla capacità del batterio di eludere le difese immunitarie dell'ospite, favorendo la resistenza alla lisi mediata dal complemento e alla fagocitosi. In particolare, il polisaccaride capsulare K1, favorisce la sopravvivenza batterica nel sangue e può contribuire allo sviluppo di batteriemie ad alta carica e alla successiva invasione delle meningi. La capsula K1, costituita da acido sialico, favorisce la regolazione negativa della via alternativa del complemento attraverso il legame con il fattore H, riducendo così l'attivazione del complemento e l'opsonizzazione batterica [22].

1.3.5. Klebsiella pneumoniae

La batteriemia da *K. pneumoniae* è una complicanza clinica importante e potenzialmente grave, che può avere origine da diverse sedi di infezione. Le fonti più comuni sono la polmonite, le infezioni del tratto urinario e la colonizzazione intestinale, che rappresenta un serbatoio fondamentale per la successiva diffusione del batterio nel sangue. In ambito ospedaliero, molte batteriemie da *K. pneumoniae* sono considerate primarie e sembrano derivare dalla traslocazione del microrganismo dall'intestino al circolo sanguigno, evidenziando il ruolo centrale della colonizzazione intestinale nelle fasi iniziali dell'infezione. L'origine della batteriemia varia in base al contesto clinico; nelle infezioni correlate all'assistenza sanitaria, i casi sono più frequentemente associati a infezioni urinarie, biliari o a batteriemie primarie, mentre nelle infezioni acquisite in comunità prevalgono quelle delle vie urinarie e biliari. La polmonite rappresenta comunque una fonte comune di batteriemia in tutti i contesti, con un impatto particolarmente rilevante in ambito ospedaliero. Quando la batteriemia è associata a polmonite, il rischio di mortalità risulta elevato [23]. Un aspetto rilevante riguarda la batteriemia correlata a catetere, che presenta in genere una prognosi migliore rispetto alle forme secondarie originate da altre sedi [24]. Questo può essere spiegato dal fatto che, nelle infezioni associate ai cateteri, il batterio entra direttamente nel flusso sanguigno, mentre nelle batteriemie secondarie *K. pneumoniae* deve attraversare barriere anatomiche e superare la risposta immunitaria dell'ospite, suggerendo il coinvolgimento di ceppi più virulenti. Di fatti gli isolati di *K. pneumoniae* associati a catetere risultano meno ipermucoviscosi e quindi sono più facilmente riconosciuti e attaccati dal sistema immunitario tramite opsonizzazione [25]. Di conseguenza, le batteriemie secondarie, soprattutto quelle derivanti da polmonite, sono associate a una mortalità più elevata rispetto a quelle che originano da infezioni urinarie. Nel complesso, la colonizzazione intestinale emerge come un elemento chiave nello sviluppo delle infezioni invasive da *K. pneumoniae*. L'elevata somiglianza tra i ceppi isolati dall'intestino e quelli recuperati dal sangue, dai polmoni o dal tratto urinario supporta l'ipotesi che l'intestino rappresenti il principale punto di partenza per la disseminazione sistemica. La batteriemia da *K. pneumoniae* risulta quindi dall'interazione tra la sede

di infezione, il contesto assistenziale e le caratteristiche di virulenza del microrganismo. Tuttavia, sebbene i meccanismi coinvolti nella polmonite siano stati ampiamente studiati, restano ancora poco chiari i processi che favoriscono la diffusione ematica a partire da altre sedi, rendendo necessari ulteriori studi per migliorare la prevenzione e la gestione clinica di queste infezioni [23].

I principali fattori di virulenza studiati in *K. pneumoniae* comprendono la capsula, le fimbrie e i sistemi di acquisizione del ferro. Questi fattori contribuiscono alla virulenza del microrganismo. La presenza e l'espressione dei diversi fattori di virulenza possono tuttavia variare tra i ceppi, influenzandone il grado di patogenicità.

La capsula è una matrice polisaccaridica extracellulare che circonda la cellula batterica e rappresenta uno dei fattori di virulenza più studiati di *K. pneumoniae*. Essa contribuisce all'evasione delle difese immunitarie attraverso diversi meccanismi: ostacola la fagocitosi, l'azione dei peptidi antimicrobici e interferisce con l'attività del complemento, riducendo l'opsonizzazione e la lisi batterica.

Tra i sierotipi capsulari identificati, K1 e K2 sono frequentemente associati ai ceppi ipervirulenti e alle infezioni caratterizzate dalla formazione di ascessi epatici. Il ruolo di questi sierotipi è stato supportato da studi condotti su modelli murini, nei quali la perdita dei rispettivi determinanti capsulari è stata associata a una riduzione della capacità di provocare ascessi epatici [26]. La capsula di tipo K2 contribuisce inoltre all'evasione dei meccanismi di difesa dell'ospite, consentendo al batterio di sfuggire alla rimozione mediata dalle cellule di Kupffer residenti nel fegato [27]. Le fimbrie di tipo 1 e di tipo 3 rappresentano le principali strutture adesive di *K. pneumoniae* e sono costituite da subunità strutturali e adesive. In particolare, le subunità adesive terminali rivestono un ruolo importante nella virulenza, favorendo l'adesione del batterio alle superfici dell'ospite.

Un ulteriore fattore importante è rappresentato dalla capacità di acquisire ferro, elemento essenziale per la crescita e il metabolismo batterico. Nell'organismo umano, la disponibilità di ferro libero è limitata, poiché questo elemento è prevalentemente associato a proteine come emoglobina, aptoglobina, ferritina e transferrina. Durante un'infezione, la sua disponibilità può diminuire ulteriormente per effetto dei meccanismi di difesa dell'ospite. *K. pneumoniae* è in grado di contrastare questa limitazione attraverso i siderofori, molecole che legano il ferro con elevata affinità e ne favoriscono l'acquisizione, contribuendo così alla sopravvivenza e alla crescita del microrganismo [26].

1.3.6. Acinetobacter baumannii

A. baumannii è un patogeno Gram-negativo di grande rilevanza clinica, particolarmente implicato nello sviluppo di batteriemie in ambito sanitario, dove è associato a un rischio di mortalità elevato, stimato tra il 20 e il 39% [23]. Tale mortalità appare strettamente legata alla frequente insorgenza dell'infezione nei pazienti ricoverati in terapia intensiva e alla presenza di patologie concomitanti. Le infezioni da *A. baumannii* sono fortemente correlate all'ambiente ospedaliero, con un rischio che cresce all'aumentare della durata del ricovero [28]. Gli ospedali rappresentano infatti un importante serbatoio per questo microrganismo, che è stato isolato da numerose superfici e dispositivi, incluse apparecchiature mediche portatili, materassi e lavandini [29,30]. La capacità di *A. baumannii* di colonizzare la cute e le vie respiratorie superiori, insieme alla somiglianza genetica tra i ceppi isolati dai pazienti e quelli presenti nell'ambiente, indica che l'ospedale svolge un ruolo fondamentale nella sua trasmissione [29,31]. Non è però ancora chiaro se questa colonizzazione sia solo temporanea o se favorisca in modo significativo la diffusione del batterio anche al di fuori dell'ambiente ospedaliero [29,30]. Sebbene *A. baumannii* sia responsabile di una percentuale relativamente bassa di batteriemie, il suo impatto clinico è rilevante a causa della diffusione globale di ceppi resistenti a molti antibiotici [32]. La polmonite costituisce una fonte comune di batteriemia nei casi acquisiti in comunità, mentre nelle infezioni associate all'assistenza sanitaria un ruolo centrale è svolto dai dispositivi invasivi e dalle infezioni del sito chirurgico. Le infezioni del tratto urinario mostrano invece una probabilità simile di evolvere in batteriemia sia nei contesti comunitari sia in quelli sanitari. Un elemento chiave della persistenza di *A. baumannii* in ambito ospedaliero è la sua straordinaria capacità di sopravvivere su superfici inanimate e di formare biofilm resistenti. Queste caratteristiche favoriscono la contaminazione di dispositivi medici residenti e spiegano l'elevata frequenza di infezioni opportunistiche nei pazienti ospedalizzati, spesso precedute da una fase di colonizzazione. In particolare, la colonizzazione nasale risulta estremamente comune nei pazienti sottoposti a cure prolungate, con prevalenze molto elevate riportate in diversi contesti geografici. Nel complesso, la batteriemia da *A. baumannii* si configura prevalentemente come un'infezione secondaria associata all'assistenza sanitaria, sostenuta da fattori ambientali, uso di dispositivi invasivi e pressione antibiotica. Tuttavia, il successo delle strategie di prevenzione e controllo delle infezioni nel ridurre l'incidenza di queste batteriemie dimostra che interventi mirati e continuativi possono avere un impatto significativo nel contenimento del carico di malattia associato a questo patogeno altamente adattabile [23].

Tra i fattori di virulenza di *A. baumannii* figurano la capsula polisaccaridica, le strutture coinvolte nell'adesione e nella formazione del biofilm e la proteina della membrana esterna OmpA.

OmpA è una proteina integrale della membrana esterna che funziona come una porina, promuovendo il passaggio di piccole molecole tra l'esterno e lo spazio periplasmico. Una volta entrata nella cellula

dell'ospite, può traslocare nei mitocondri e nel nucleo, dove provoca l'apoptosi cellulare. È inoltre coinvolta nell'adesione del batterio alle cellule epiteliali, un processo che sembra essere mediato dal legame con la fibronectina e che favorisce l'invasione batterica [4].

Un altro fattore di virulenza è rappresentato dalla capsula, che contribuisce a proteggere il batterio dalla fagocitosi e dall'azione del complemento [33]. Essa avvolge il batterio formando uno strato protettivo di spessore variabile, che lo difende dalle diverse condizioni ambientali e dalla presenza di antimicrobici. Questo contribuisce alla prolungata sopravvivenza di *A. baumannii* sulle superfici ospedaliere, come letti, mobili e apparecchiature mediche [4].

La persistenza e la sopravvivenza in ambito ospedaliero sono sostenute anche dalla capacità del microrganismo di sviluppare biofilm, sia sulle cellule epiteliali dell'ospite, durante le infezioni respiratorie, sia sui dispositivi medici, come cateteri e tubi endotracheali, e sugli arredi ospedalieri [4].

Sono stati identificati anche altri fattori di virulenza, tra cui il lipooligosaccaride (LOS), i pili, come i pili Csu, e le adesine. Il LOS, costituito dal lipide A e da un nucleo oligosaccaridico, è privo dell'antigene O, costituito da unità polisaccaridiche ripetute. Stimola la risposta immunitaria innata attraverso l'attivazione del recettore TLR4 (*Toll-like receptor 4*) e favorisce la resistenza ai peptidi antimicrobici cationici e alla disidratazione. I pili Csu e le proteine associate al biofilm favoriscono invece l'adesione e la persistenza sulle superfici, comprese quelle dei dispositivi sanitari. Sono inoltre importanti i sistemi di acquisizione del ferro, che sostengono la crescita batterica in condizioni di limitata disponibilità di questo elemento. In *A. baumannii* sono stati identificati quattro sistemi di secrezione proteica (di tipo I, II, V e VI), coinvolti nella virulenza. Questi sistemi contribuiscono alla patogenicità attraverso il rilascio di proteine effettrici, tra cui tossine, lipasi, proteasi e adesine, che favoriscono l'adesione alle cellule dell'ospite, la formazione del biofilm e la colonizzazione dei tessuti. In particolare, il sistema di secrezione di tipo II rilascia enzimi come la lipasi LipA e la metalloproteasi CpaA, che contribuiscono alla capacità infettiva del batterio. Il sistema di tipo VI è invece implicato soprattutto nella competizione con altri microrganismi, ma può contribuire anche all'infezione, favorendo la colonizzazione e interferendo con le cellule e le difese dell'ospite [33].

1.3.7. Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa è comune nelle infezioni associate all'assistenza sanitaria e ai dispositivi medici (strumenti medico-chirurgici e le apparecchiature per la nebulizzazione, per la respirazione assistita e per la dialisi). Infatti, nei reparti di terapia intensiva, *P. aeruginosa* è diventato uno dei patogeni Gram-negativi più comuni [4,34]. Questo è dovuto al fatto che tale batterio è principalmente un contaminante e colonizzatore di superfici; pertanto, il suo isolamento da dispositivi medici è strettamente legato dalle circostanze, dal sito di prelievo e dalla situazione clinica del paziente. È responsabile di infezioni opportunistiche che possono evolvere in batteriemia, come infezioni delle ustioni, delle ferite, del tratto urinario, della cute, dell'occhio, dell'orecchio e del tratto respiratorio. *P. aeruginosa* è responsabile anche di polmoniti che possono avere un decorso rapido e aggressivo, soprattutto in pazienti con granulocitopenia, con conseguenze di necrosi alveolare, invasione vascolare, infarti e batteriemia. In alcuni rari casi di batteriemia, *P. aeruginosa* può causare l'ectima gangrenoso, che si manifesta con papule cutanee che progrediscono in ulcere necrotiche nere. Questa condizione è causata dall'invasione diretta e dalla distruzione delle pareti dei vasi sanguigni da parte del microrganismo [35].

P. aeruginosa possiede numerosi fattori di virulenza che contribuiscono alla sua capacità di aderire alle cellule dell'ospite, colonizzare i tessuti e instaurare infezioni persistenti.

L'adesione è mediata da diversi componenti della superficie batterica, tra cui flagelli, pili di tipo IV ed esopolisaccaridi. Il batterio è dotato di un singolo flagello e di diverse appendici corte chiamate pili di tipo IV. Il flagello è importante sia per la motilità sia per l'adesione alle cellule epiteliali. I pili di tipo IV, invece, rappresentano importanti adesine e sono essenziali nelle fasi iniziali del processo infettivo. Queste strutture possono legarsi al glicolipide asialoGM1, presente sulla superficie delle cellule epiteliali, in particolare dell'epitelio respiratorio. Svolgono inoltre un ruolo nella formazione del biofilm e, insieme ai flagelli, sono in grado di stimolare la risposta infiammatoria dell'ospite.

Come negli altri batteri Gram-negativi, il lipopolisaccaride (LPS) di *P. aeruginosa* è costituito dal lipide A, responsabile dell'attività endotossica, dal core oligosaccaridico e dal polisaccaride O, che comprende una componente comune e una O-specifica. La componente comune è un omopolimero del ramnosio e induce una risposta anticorpale relativamente debole, mentre quella O-specifica è un eteropolimero la cui composizione varia tra i diversi ceppi e stimola una risposta anticorpale più intensa [4].

Una volta stabilitosi nel sito d'infezione, *P. aeruginosa* produce diverse esotossine. Attraverso il sistema di secrezione di tipo III, inietta le tossine ExoU, ExoS, ExoT ed ExoY, che causano morte cellulare e ostacolano la riparazione dei tessuti. In particolare, utilizza questo sistema di secrezione per eludere la difese immunitarie dell'ospite. ExoS inibisce la polimerizzazione dell'actina nei neutrofili, mentre ExoU compromette l'internalizzazione del batterio. Inoltre, produce altre tossine,

come ExoA, che interferiscono con la sintesi proteica e ritardano la guarigione dell'epitelio, oltre a proteasi (es. LasB) che alterano le giunzioni cellulari (tight junction). Un ruolo importante è svolto anche dai siderofori, molecole che permettono ai batteri di sottrarre ferro all'ospite [10].
Il batterio può inoltre degradare componenti del complemento o impedirne il deposito sulla propria superficie, ostacolando così la formazione del complesso di attacco alla membrana. La produzione di esopolisaccaridi, come l'alginato, contribuisce ulteriormente a mascherare i batteri, riducendo l'opsonizzazione e la fagocitosi[10].

1.3.8. Candida spp.

Anche i microrganismi fungini, come le specie del genere *Candida*, mostrano una notevole adattabilità. Possono crescere in diverse forme, come lievito o forma filamentosa, e formare biofilm, inducendo risposte immunitarie differenti. *Candida albicans*, ad esempio, può indurre la morte dei neutrofili attraverso la formazione di trappole extracellulari dei neutrofili (NET), ma la capacità di indurre o inibire questo processo dipende dalla sua morfologia [10]. Altre specie, come *Candida auris*, sono in grado di inibire efficacemente la NETosi e di resistere alla distruzione da parte dei neutrofili più efficacemente rispetto a *C. albicans*, aumentando così la propria sopravvivenza [36].

1.4. Differenziazione tra contaminazione e infezione vera

Le emocolture rappresentano il cardine diagnostico per identificare le infezioni del torrente ematico (bloodstream infections, BSI), poiché consentono l'identificazione microbiologica del patogeno responsabile e guidano la terapia antimicrobica mirata. Tuttavia, un positivo segnale di crescita microbica in una emocoltura non sempre equivale a una vera infezione sistemica, ciò può derivare da contaminazione del campione, ovvero l'introduzione di microrganismi dall'esterno durante la raccolta o la manipolazione, che non erano presenti nel sangue del paziente. Principalmente i microrganismi possono accedere al flusso sanguigno attraverso la cute dei pazienti, l'ambiente, le mani degli operatori sanitari e l'attrezzatura utilizzata per le trasfusioni di sangue e per il prelievo [1]. Per questo motivo, le linee guida del *Clinical and Laboratory Standards Institute*, raccomandano che il tasso di contaminazione delle emocolture negli adulti non dovrebbe superare il 3% del totale dei campioni. Tuttavia, diversi studi riportano valori compresi tra lo 0,6% e il 6%, evidenziando come il problema sia ancora rilevante. Le contaminazioni comportano conseguenze importanti: prescrizioni antibiotiche non necessarie, ulteriori test e procedure di laboratorio, prolungamento della degenza ospedaliera fino a circa 5 giorni e aumento dei costi (il 20% in più per indagini diagnostiche e il 40% in più per la spesa antimicrobica) [37,38]. Il termine di Infezione vera si riferisce alla presenza di microrganismi patogeni nel sangue associata a segni clinici di infezione (febbre e ipotensione) e frequentemente confermata da più set di emocolture positivi alla presenza dello stesso agente [39]. I

fattori che influenzano i tassi di contaminazione includono diverse variabili ed è fondamentale agire sulle cause, in particolare migliorando le tecniche di prelievo. Quindi, per evitare possibili contaminazioni, durante il campionamento è importante adottare precauzioni, come mantenere condizioni asettiche, utilizzare adeguatamente i flaconi e correttamente i guanti. È altrettanto indispensabile che il sito di prelievo venga correttamente disinfettato e che il disinfettante venga lasciato agire per un tempo sufficiente senza essere più toccato dopo la preparazione, per evitare il trasferimento di microrganismi cutanei nel campione [37]. Le emocolture contaminate rappresentano da decenni una problematica rilevante e rendono complessa l'interpretazione dei risultati positivi: il clinico deve distinguere tra una vera infezione, associata a elevata morbilità e mortalità, e un falso positivo privo di significato clinico. Nonostante i limiti, l'emocoltura rimane il gold standard per la diagnosi di batteriemia e la sua corretta interpretazione è essenziale sia per la gestione del paziente sia per il controllo delle infezioni ospedaliere. La distinzione tra contaminazione e infezione reale è difficile e si basa su più fattori: tipo di microrganismo, numero di set e di flaconi positivi, tempo di crescita e dati clinico-laboratoristici. Alcuni patogeni, come *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, sono indicativi quasi sempre di infezione vera quando isolati dal sangue. Al contrario, altri microrganismi, tra cui i CoNS, *Corynebacterium* spp. e *Bacillus* spp. (non *anthracis*) sono frequentemente contaminanti, ma possono comunque causare infezioni anche gravi se sottovalutati. I CoNS rappresentano il caso più emblematico: costituiscono circa il 70–80% delle emocolture contaminate, ma sono responsabili di una quota non trascurabile di vere batteriemie, soprattutto nei pazienti con cateteri o dispositivi protesici. Studi riportano che solo il 10–26,4% degli isolati è clinicamente significativo, mentre in alcune casistiche circa il 72–73% dei casi è attribuibile a contaminazione. Anche altri microrganismi mostrano una variabilità interpretativa: gli enterococchi risultano patogeni in circa il 70% dei casi, gli streptococchi viridanti nel 38%, mentre *Clostridium perfringens* è contaminante nel 77% dei casi, a differenza di altre specie di *Clostridium* che sono patogene nell'80% dei casi. Quindi i clinici non possono fare affidamento esclusivamente sull'identità dell'organismo per differenziare le infezioni vere da contaminazioni. Infine, sebbene le batteriemie siano spesso monomicrobiche, tra il 6% e il 21% dei casi è polimicrobico, soprattutto nei pazienti ad alto rischio. Pertanto, la presenza di più microrganismi in un'emocoltura non consente di escludere automaticamente una vera infezione [39].

A complicare ulteriormente la questione è l'uso crescente di cateteri venosi centrali (CVC) e di altri accessi vascolari, indispensabili per la somministrazione di fluidi, farmaci, emoderivati e nutrizione parenterale, nonché per il monitoraggio emodinamico e per l'emodialisi. Tuttavia, questi dispositivi possono essere colonizzati e aumentare il rischio di infezioni del circolo ematico catetere-correlate (catheter-related bloodstream infections, CRBSI), associate a un aumento di morbidità, mortalità e costi sanitari [40]. Si stima che il 15–30% delle batteriemie nosocomiali sia attribuibile alla presenza

di cateteri intravascolari. Il sospetto clinico di CRBSI deve essere posto nei pazienti portatori di catetere che presentino febbre, brividi, segni di sepsi, infezioni metastatiche o batteriemie persistenti o ricorrenti. I principali microrganismi coinvolti fanno parte della flora cutanea e sono i CoNS, *Cutibacterium* spp., *Bacillus* spp. e la maggior parte dei *Corynebacterium* spp. [2]. La colonizzazione può avvenire per migrazione dei microrganismi dalla cute lungo la superficie esterna del dispositivo durante l'inserimento del catetere o, nei cateteri a lunga permanenza, attraverso la contaminazione dell'hub (punto di connessione) e la successiva diffusione nel lume del catetere con lo sviluppo di biofilm. Più raramente, l'infezione può derivare dall'infusione di soluzioni contaminate o dalla disseminazione ematica di microrganismi provenienti da altri focolai infettivi [39]. Il tasso di contaminazione delle emocolture dovrebbe essere inferiore al 3% e monitorato periodicamente dai laboratori. L'isolamento di un microrganismo da un solo flacone o set, nell'ambito di più set di prelievo, può suggerire una contaminazione, ma deve essere sempre interpretato nel contesto clinico. In caso di sospetta contaminazione, il microrganismo viene identificato e, soltanto su richiesta del clinico si esegue l'antibiogramma. L'isolato viene pertanto conservato per 7 giorni e nel referto viene indicato il suo possibile significato di contaminante [2]. In conclusione, le emocolture sono il metodo più importante per diagnosticare la batteriemia, ma i risultati non vanno interpretati da soli. È necessario considerare insieme diversi fattori clinici e di laboratorio. Distinguere tra contaminazione e vera infezione è difficile, ma fondamentale, perché influisce direttamente sulla cura del paziente, sull'uso corretto degli antibiotici, sulla prevenzione delle infezioni ospedaliere e sui costi sanitari.

1.5. Epidemiologia delle infezioni ematiche

Le infezioni del flusso sanguigno (BSI) sono condizioni potenzialmente letali con alta prevalenza a livello globale. Si stima che ogni anno vengano segnalati circa 250.000 casi di BSI in ambito ospedaliero e i tassi sono in aumento. Circa la metà delle infezioni nosocomiali da BSI si verifica nelle unità di terapia intensiva, sebbene tali infezioni siano frequentemente riportate anche in altri contesti assistenziali, tra cui reparti di medicina interna, chirurgia e pediatria. L'incidenza annua è stimata intorno a 150 casi per 100.000 abitanti, mentre la mortalità si attesta intorno al 17%, considerando il decesso entro 30 giorni da una emocoltura positiva alla crescita microbica. Inoltre, le BSI risultano strettamente correlate ad altre infezioni, come le polmoniti e le infezioni del tratto urinario, e sono fortemente influenzate dal crescente fenomeno della resistenza antimicrobica, oltre a essere direttamente associate allo sviluppo di sepsi; per tali motivi, esse costituiscono una rilevante problematica di sanità pubblica [10]. A livello epidemiologico, la batteriemia è in costante aumento, soprattutto nei Paesi ad alto reddito, come Nord America ed Europa, dove l'incidenza raggiunge rispettivamente circa 113 e 204 casi ogni 100.000 abitanti, valori paragonabili a patologie molto diffuse quali ictus e trombosi venosa. Un aspetto particolarmente rilevante è che una quota

significativa delle BSI, compresa tra il 30% e il 50%, è rappresentata da infezioni nosocomiali, evidenziando il ruolo cruciale dell'assistenza sanitaria come fattore di rischio per lo sviluppo di tali infezioni [41]. Sebbene la mortalità delle infezioni del torrente ematico sia stimata tra il 12% e il 34%, essa risulta estremamente variabile in relazione a diversi fattori, tra cui il contesto di acquisizione, le caratteristiche della popolazione, il tipo di patogeno coinvolto, i livelli di resistenza antimicrobica e l'area geografica. In particolare, le BSI acquisite in ambito ospedaliero presentano generalmente una mortalità più elevata rispetto a quelle acquisite in comunità [42]. Lo studio retrospettivo condotto da Mun et al. (2022) ha messo in evidenza questi aspetti, con l'obiettivo di valutare come i patogeni coinvolti e le caratteristiche cliniche varino in base al contesto di acquisizione dell'infezione, distinguendo tra forme comunitarie (CA), associate all'assistenza sanitaria (HCA) e ospedaliere (HA). L'analisi ha incluso 1849 pazienti deceduti in due ospedali universitari, evidenziando che 280, cioè il 15,1 % dei pazienti avevano sviluppato una BSI nelle due settimane precedenti al decesso. Dei 280 pazienti deceduti, 71 presentavano CA-BSI, 53 con HCA-BSI e 156 con HA-BSI; quindi, da questi dati possiamo notare come le infezioni del torrente ematico ospedaliere sono responsabili di una mortalità più elevata rispetto a quelle acquisite in comunità e in assistenza sanitaria [42]. Dal punto di vista microbiologico, diversi patogeni emergono come responsabili principali delle BSI a livello globale, come *E. coli* che risulta frequentemente il microrganismo più isolato, mentre *S. aureus*, *Klebsiella* spp. e *P. aeruginosa* sono tra quelli maggiormente associati a esiti gravi e mortalità. È importante sottolineare come lo spettro dei patogeni vari in base al contesto: nelle infezioni comunitarie prevalgono microrganismi come *E. coli* e streptococchi, mentre nelle infezioni correlate all'assistenza sanitaria dominano stafilococchi e *Pseudomonas* spp. [41]. Questi risultati sono coerenti con quanto riportato nello studio di Mun et al. (2022), i cui patogeni più frequentemente isolati sono risultati 5: *K. pneumoniae* (17,1%), *E. coli* (16,4%), *S. aureus* (11,4%), *A. baumannii* (10,8 %) e *Candida* spp. (9,2%). Tuttavia, sono emerse importanti differenze epidemiologiche: nelle infezioni comunitarie (CA-BSI) e associate all'assistenza sanitaria (HCA-BSI) predominavano *E. coli* e *K. pneumoniae*, mentre nelle forme ospedaliere (HA-BSI) si osservava una maggiore prevalenza di patogeni opportunisti e multiresistenti agli antibiotici (MDR), in particolare *A. baumannii* e specie di *Candida* [42]. Nei pazienti critici ricoverati in terapia intensiva, il rischio di sviluppare una BSI è elevato e rappresenta una delle complicanze più gravi. In questo contesto, la mortalità può superare il 40%, con una significativa proporzione di pazienti che evolve verso sepsi o shock settico. L'elevato rischio è legato sia alla compromissione dello stato immunitario sia all'esposizione a numerose procedure invasive [43]. Tra i principali fattori di rischio nei pazienti critici, un ruolo centrale è svolto dai dispositivi invasivi, in particolare i cateteri venosi centrali. Le infezioni correlate a questi dispositivi, note come CLABSI (Central-line-associated BSI), rappresentano una delle principali cause di BSI in ambito ospedaliero e costituiscono un importante

indicatore di qualità dell'assistenza [43]. Anche lo studio di Mun et al. (2022) ha evidenziato come le HA-BSI fossero associate a condizioni cliniche severe; il 54,5% dei pazienti con HA-BSI presentava un catetere venoso centrale, mentre il 37,2% era ricoverato in terapia intensiva al momento dell'insorgenza della BSI. Inoltre, il 26,3% dei pazienti ha sviluppato una HCA-BSI durante il trattamento con carbapenemi e/o vancomicina. Il patogeno più comunemente isolato durante la terapia con carbapenemi è stato *A. baumannii* [42]. Le differenze epidemiologiche risultano evidenti anche a livello geografico; nei Paesi ad alto reddito si osserva una maggiore prevalenza di batteri Gram-positivi, mentre in molte aree di Europa, Asia e America Latina predominano i Gram-negativi [43]. Nei Paesi a basso reddito, patogeni come *Salmonella enterica* possono rappresentare una causa molto frequente di BSI, arrivando in alcune aree a costituire fino al 50% degli isolati. Questo dato evidenzia come le condizioni socio-economiche, l'accesso alle cure e la diffusione di altre patologie (come malaria o HIV) influenzino profondamente l'epidemiologia delle infezioni [41]. La diffusione di isolati clinici MDR, appartenenti di *Enterobacterales* resistenti ai carbapenemi (CRE), *A. baumannii* e *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA), costituisce oggi uno dei principali ostacoli nella gestione delle BSI. Tali infezioni risultano associate a tassi di mortalità particolarmente elevati, spesso superiori al 40–50%, soprattutto a causa della difficoltà nel garantire una terapia antibiotica empirica iniziale appropriata e tempestiva [43]. Analogamente, lo studio condotto da Mun et al. ha evidenziato come le HA-BSI presentino i livelli più elevati di resistenza antimicrobica. In particolare, i Gram-negativi resistenti ai carbapenemi risultavano assenti nelle CA-BSI, presenti nel 6,9% delle HCA-BSI e raggiungevano il 21,9% delle HA-BSI. Gli autori sottolineano inoltre il ruolo di *A baumannii*, identificato come più frequentemente associato a isolati clinici carbapenemi-resistenti. Nei casi di batteriemia da *A. baumannii* carbapeneme-resistente (CRAB), la colistina rappresentava spesso l'unica opzione terapeutica disponibile, sebbene con efficacia limitata. Un ulteriore aspetto rilevante riguarda la diffusione di isolati di *Enterobacterales* produttori di ESBL (extended-spectrum β-lactamases), tradizionalmente associati alle infezioni ospedaliere ma oggi sempre più frequentemente isolati anche nelle infezioni comunitarie. Nello studio di Mun et al., i ceppi di *Enterobacterales* resistenti al cefotaxime rappresentano infatti il pattern di resistenza più comune, soprattutto nelle CA-BSI [42].

In conclusione, le infezioni del torrente ematico rappresentano una problematica rilevante in ambito sanitario per la loro frequenza, la gravità clinica e l'elevata mortalità associata. La loro epidemiologia varia in base al contesto di acquisizione, ai patogeni coinvolti e alla presenza di fattori di rischio come i dispositivi invasivi. Inoltre, la crescente diffusione di microrganismi MDR rende la gestione delle BSI sempre più complessa. Per questi motivi, risultano fondamentali la prevenzione delle infezioni, il corretto utilizzo dei dispositivi intravascolari e una gestione appropriata della terapia antibiotica.

1.6. Antibiotico-resistenza

Gli antimicrobici, comunemente definiti antibiotici, sono farmaci impiegati per eliminare i batteri o inibirne la crescita e la diffusione. Il loro utilizzo è ampiamente diffuso sia in ambito umano sia veterinario per il trattamento delle infezioni batteriche; in alcuni casi, gli stessi principi attivi o classi farmacologiche vengono utilizzati in entrambe le specie [44]. Si tratta di sostanze di origine naturale o sintetica capaci di esercitare un'azione batteriostatica, inibendo la crescita batterica, oppure battericida, determinando la morte dei microrganismi. La loro efficacia si basa sul principio di tossicità selettiva, che consente di colpire specifici bersagli batterici, differenti o assenti nelle cellule dell'ospite, riducendo così gli effetti collaterali [35]. Il XX secolo ha rappresentato un punto di svolta nella storia della medicina grazie alla scoperta e all'introduzione degli antibiotici nella pratica clinica. Il primo composto con attività antimicrobica fu il salvarsan nel 1910, ma fu la scoperta della penicillina nel 1928 a segnare l'inizio della cosiddetta "età dell'oro" degli antibiotici [45]. Con la loro introduzione a metà del secolo scorso, gli antibiotici furono considerati una vera e propria rivoluzione terapeutica, arrivando a definirli "farmaci miracolosi", poiché fino ad allora le infezioni batteriche gravi venivano trattate principalmente mediante drenaggio chirurgico o utilizzando sostanze spesso tossiche come composti arsenicali e a base di argento. Nei decenni successivi sono state sviluppate numerose classi di antibiotici efficaci contro i patogeni più comuni, tra cui sulfonamidi, penicilline, cefalosporine, cloramfenicolo, tetracicline, colistine, macrolidi, lincosamidi, streptogramine, rifamicine, glicopeptidi, aminoglicosidi, fluorochinoloni, ossazolidinoni, glicilglicine e lipoglicopeptidi [46]. La disponibilità di tali farmaci ha rivoluzionato la medicina moderna, rendendo possibili interventi complessi come i trapianti d'organo e migliorando significativamente la gestione dei pazienti immunocompromessi in ambiti quali oncologia e reumatologia, contribuendo inoltre alla riduzione della mortalità infantile e all'aumento dell'aspettativa di vita [47]. Gli antibiotici trovano impiego in molteplici ambiti, tra cui:

- Medicina umana (uso terapeutico/profilattico);
- Veterinaria (uso terapeutico/profilattico);
- Acquacoltura (uso terapeutico/profilattico);
- Agricoltura (controllo dei parassiti/clonazione di piante), industria (clonazione e selezione in ambito di ricerca e industria);
- Prodotti per l'igiene personale e della casa (uso di biocidi).

Tuttavia, l'uso terapeutico umano rappresenta meno della metà del consumo complessivo di antibiotici prodotti a livello globale [48].

Per lungo tempo si è diffusa l'idea che gli antibiotici potessero rappresentare una soluzione quasi universale per le infezioni batteriche. Tuttavia, già nei primi anni successivi all'introduzione della penicillina, alcuni microrganismi hanno sviluppato meccanismi di adattamento che consentono loro

di sopravvivere e proliferare anche in presenza del farmaco. Questo fenomeno, oggi noto come antibiotico-resistenza o antimicrobial resistance (AMR), rappresenta una problematica di rilevanza globale [44]. L'insorgenza e la diffusione della resistenza antimicrobica sono strettamente correlate a un uso inappropriato degli antibiotici, che include sovra-prescrizione, somministrazione di dosaggi non adeguati, insufficiente durata del trattamento e diagnosi non corrette. Tali pratiche hanno contribuito all'aumento di microrganismi resistenti agli antibiotici, sia Gram-positivi sia Gram-negativi [49]. Un contributo rilevante all'evoluzione della antibiotico-resistenza è legato anche alla tolleranza batterica e alla formazione di biofilm, soprattutto in associazione all'uso crescente di dispositivi medici impiantabili, come protesi e valvole artificiali. La tolleranza consente ai batteri di sopravvivere all'esposizione agli antibiotici pur risultando sensibili nei test microbiologici standard; studi sperimentali indicano che la tolleranza può precedere la resistenza e favorire una più rapida evoluzione di ceppi resistenti. Pertanto, per contrastare efficacemente l'antibiotico-resistenza è necessario comprendere non solo i meccanismi di resistenza, ma anche quelli alla base della tolleranza batterica [47]. Già nel 1945, durante la cerimonia di conferimento del premio Nobel per la scoperta della penicillina, Alexander Fleming aveva evidenziato il rischio di sviluppo di resistenze in caso di uso improprio degli antibiotici, in particolare se impiegati a dosaggi insufficienti o senza reale necessità. Questa previsione si è rivelata fondata ed è oggi confermata anche dall'Organizzazione Mondiale della Sanità nell'ambito delle iniziative di sensibilizzazione globale [50]. Per raccogliere e confrontare in modo affidabile i dati di sorveglianza epidemiologica, i batteri resistenti vengono classificati in base al loro profilo di resistenza:

- Multidrug-resistant (MDR) risultano non sensibili ad almeno tre classi di antimicrobici;
- Extensively drug-resistant (XDR) mantengono sensibilità solo verso una o due classi;
- Pandrug-resistant (PDR**)** sono resistenti a tutte le classi disponibili di antibiotici [51].

In funzione della probabilità di successo terapeutico, l'EUCAST definisce le categorie di sensibilità clinica in: sensibile (S), sensibile a esposizione aumentata (I) e resistente (R) [52]. L'impatto clinico della resistenza antimicrobica si manifesta a due livelli principali: da un lato riduce l'efficacia delle terapie per il trattamento delle infezioni, dall'altro compromette la sicurezza di procedure mediche che richiedono immunosoppressione o profilassi antibiotica, come trapianti, chemioterapia, intubazioni, cateterizzazioni e interventi chirurgici complessi [53]. Per decenni il problema è stato mitigato dall'introduzione di nuovi antibiotici, ma negli ultimi anni lo sviluppo di nuove molecole ha subito un forte rallentamento, in parte perché l'industria farmaceutica si concentra prevalentemente su malattie croniche (cancro, disturbi metabolici e cardiovascolari) non infettive [47,53]. Ciò rende ancora più urgente preservare l'efficacia degli antibiotici attualmente disponibili [54]. Le proiezioni epidemiologiche indicano che entro il 2050 circa 1,91 milioni di persone potrebbero morire direttamente a causa dell'AMR, con un incremento annuo stimato di quasi il 70% rispetto al 2022;

nello stesso periodo, i decessi in cui i batteri resistenti avranno un ruolo determinante potrebbero aumentare del 75%, passando da 4,71 milioni a 8,22 milioni all'anno, evidenziando la portata globale e la progressiva espansione del fenomeno [55]. Le infezioni sostenute da batteri antibiotico-resistenti non incidono soltanto sulla salute umana, ma influenzano negativamente anche quella animale e vegetale, riducono la produttività agricola e mettono a rischio la sicurezza alimentare, con un impatto economico rilevante sui sistemi sanitari e sulle economie nazionali. Le popolazioni vulnerabili e i Paesi con risorse limitate risultano i più colpiti. Tra i principali fattori che contribuiscono alla diffusione della resistenza figurano condizioni igienico-sanitarie inadeguate, insufficienti misure di prevenzione e controllo delle infezioni, scarsa consapevolezza del problema e applicazione inefficace delle normative esistenti. I dati del Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) mostrano tassi di resistenza particolarmente preoccupanti nelle infezioni batteriche comuni: in 76 Paesi analizzati, il 35% delle infezioni da *S. aureus* risulta resistente alla meticillina, mentre il 42% delle infezioni da *E. coli* presenta resistenza alle cefalosporine di terza generazione, rendendo sempre più complessa la gestione terapeutica delle infezioni di frequente riscontro clinico [55]. In Europa, la diffusione della resistenza antimicrobica varia in funzione del microrganismo, del tipo di antibiotico e dell'area geografica. È stata osservata una tendenza crescente da nord a sud, con livelli più bassi nei Paesi dell'Europa settentrionale rispetto a quelli dell'Europa meridionale, probabilmente in relazione a differenze nel consumo di antimicrobici [56]. Si è osservato anche che la scarsa conoscenza degli antimicrobici rappresenta un fattore rilevante nella diffusione della AMR. Indagini condotte sulla popolazione generale evidenziano infatti una comprensione spesso incompleta o errata dell'utilizzo degli antibiotici. Un sondaggio realizzato da Public Health England nel 2017 ha mostrato che, sebbene la maggior parte dei partecipanti (83%) fosse consapevole dell'efficacia degli antibiotici contro i batteri, una quota significativa (35%) riteneva erroneamente che questi farmaci potessero essere utilizzati anche per trattare infezioni virali. Tuttavia, rispetto a un'indagine precedente del 2014, si è osservato un miglioramento nel livello di conoscenza, suggerendo una crescente sensibilizzazione della popolazione. In contesti differenti, il livello di consapevolezza appare ancora più limitato: ad esempio, uno studio condotto in India ha evidenziato che il 49% degli intervistati credeva che gli antibiotici fossero efficaci contro le infezioni virali e il 45% li utilizzava per trattare patologie comuni come il raffreddore. Questo uso inappropriato si associa a una maggiore diffusione di infezioni sostenute da microrganismi, inclusi ceppi MDR, contribuendo all'elevata incidenza di malattie infettive osservata nel Paese [57]. Per contrastare la resistenza gli antimicrobici, è stato promosso un approccio integrato basato sul modello One Health, che riconosce l'interconnessione tra la salute umana, animale, e ambientale [58]. Tale strategia risponde alla necessità di affrontare la resistenza antimicrobica, un fenomeno rilevante anche a livello europeo, come documentato dai dati di sorveglianza dell'ECDC (2013) [59].

Un ruolo centrale nella prevenzione della resistenza è svolto dall'uso razionale degli antibiotici attraverso programmi di antimicrobial stewardship, che mirano a fornire una guida per un uso corretto degli antibiotici. Il principio generale è quello di gestire in modo empirico e successivamente personalizzare la terapia antibiotica in base ai risultati microbiologici [46]. Quindi questo concetto si basa sulla scelta del farmaco più appropriato, con dosaggio corretto e per la durata adeguata, con il fine di ottenere l'efficacia clinica, diminuendo gli eventuali eventi avversi, le pressioni selettive che favoriscono lo sviluppo delle resistenze e i costi che derivano dall'uso non corretto degli antimicrobici [46,60]. Il laboratorio di microbiologia clinica svolge un ruolo fondamentale nella stewardship, supportando la diagnosi, la sorveglianza delle resistenze e la scelta terapeutica più appropriata [61].
In conclusione, l'antibiotico-resistenza è un fenomeno naturale, ma l'uso inappropriato degli antimicrobici ne ha accelerato drasticamente la diffusione. La carenza di nuovi antibiotici rende indispensabile preservare quelli esistenti attraverso politiche di uso prudente, programmi di antimicrobial stewardship e un approccio integrato One Health. Solo attraverso interventi coordinati, multidisciplinari e sostenuti nel tempo sarà possibile contenere questa minaccia per la salute pubblica globale e garantire l'efficacia delle terapie antimicrobiche per le generazioni future.

1.7. Meccanismi di resistenza agli antibiotici

La resistenza agli antibiotici può essere classificata in due principali categorie: intrinseca e acquisita, sulla base della sua origine genetica e delle modalità di trasmissione. La resistenza intrinseca rappresenta una caratteristica naturale di una determinata specie batterica ed è geneticamente determinata. Essa è presente in tutte le cellule appartenenti a quella specie ed è stabile nel tempo. I principali meccanismi alla base della resistenza intrinseca includono:

- L'assenza del bersaglio molecolare dell'antibiotico;
- L'impermeabilità della parete o della membrana batterica;
- La produzione di enzimi inattivanti.

Un esempio tipico è rappresentato dai batteri Gram-negativi, la cui membrana esterna impedisce a molecole di grandi dimensioni, come la vancomicina, di raggiungere il sito bersaglio [62].
La resistenza acquisita si verifica quando un batterio precedentemente sensibile diventa resistente a un determinato antibiotico. Questo fenomeno può derivare da mutazioni cromosomiche spontanee, trasmesse verticalmente alle generazioni successive, oppure dall'acquisizione di geni di resistenza attraverso trasferimento genico orizzontale, mediato da elementi genetici mobili quali plasmidi, trasposoni e integroni. Quest'ultima modalità rappresenta il meccanismo epidemiologicamente più rilevante, poiché consente la rapida diffusione della resistenza anche tra specie batteriche differenti [63]. L'acquisizione di materiale genetico esterno avviene attraverso quattro meccanismi di trasferimento genico orizzontale:

- Trasformazione**:** il batterio acquisisce DNA libero presente nell'ambiente e lo integra nel proprio genoma [64].
- Trasduzione: i batteriofagi (virus dei batteri) trasportano materiale genetico da una cellula batterica a un'altra [65].
- Coniugazione: richiede il contatto diretto tra le cellule e permette il passaggio di materiale genetico tramite plasmidi o altri elementi genetici mobili. È un processo di particolare importanza per la diffusione della resistenza in ambito ospedaliero [35].
- Mobilizzazione tramite trasposoni*:* i trasposoni sono elementi genetici mobili in grado di spostarsi da una molecola di DNA a un'altra; possono quindi mobilizzare i geni di resistenza e favorirne la diffusione attraverso plasmidi e altri elementi genetici [65] (*Figura 1*).

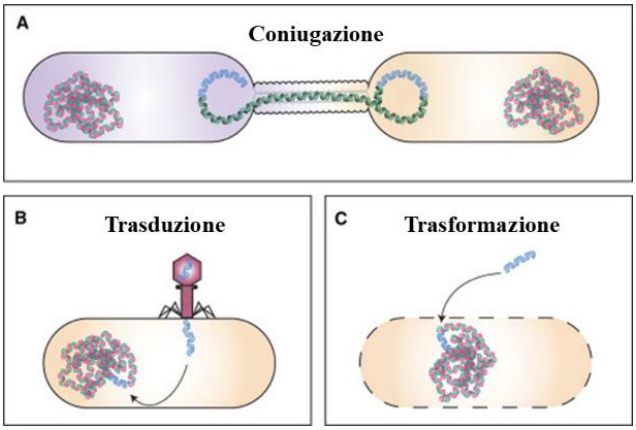

Figura 1. I meccanismi di trasferimento genico orizzontale: coniugazione (A), trasduzione (B) e trasformazione (C) [65].

Una volta acquisiti i geni di resistenza, i batteri possono mettere in atto diverse strategie per neutralizzare l'azione degli antibiotici. I principali meccanismi comprendono [54]:

- Inattivazione enzimatica: produzione di enzimi batterici in grado di inattivare gli antibiotici attraverso processi di degradazione o modificazione chimica. Tra gli esempi più noti vi sono le β-lattamasi, che idrolizzano penicilline e cefalosporine. In questo modo, il farmaco viene reso inefficace prima ancora di raggiungere il proprio bersaglio cellulare [66].
- Modificazione del sito bersaglio: i batteri possono modificare il bersaglio molecolare dell'antibiotico oppure acquisire un bersaglio alternativo in grado di svolgere la stessa funzione biologica di quello originale, ma caratterizzato da una minore affinità per il farmaco. In entrambi i casi, l'efficacia dell'antibiotico risulta ridotta [4]. Un esempio è rappresentato da *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA), che acquisisce il gene *mecA*, codificante la

proteina legante la penicillina (PBP2a), caratterizzata da una bassa affinità per gli antibiotici β-lattamici [47].

- Ridotta permeabilità della membrana: modifiche della membrana esterna o delle porine possono limitare l'ingresso dell'antibiotico nella cellula. In *P. aeruginosa*, ad esempio, la perdita della principale porina coinvolta nell'ingresso dell'imipenem può determinare resistenza a questo antibiotico (63).
- Aumento dell'efflusso attivo: Molti batteri possiedono pompe di efflusso, sistemi di trasporto che espellono attivamente l'antibiotico dalla cellula, riducendone la concentrazione intracellulare al di sotto dei livelli efficaci [47].
- Bypass o sostituzione del percorso metabolico inibito: Alcuni batteri possono eludere l'azione dell'antibiotico sviluppando vie metaboliche alternative o sovrapproducendo il bersaglio molecolare [47] (*Figura 2*).

Questi meccanismi consentono ai batteri di sopravvivere in presenza di antibiotici e favoriscono la diffusione della resistenza, complicando il trattamento delle infezioni [47].

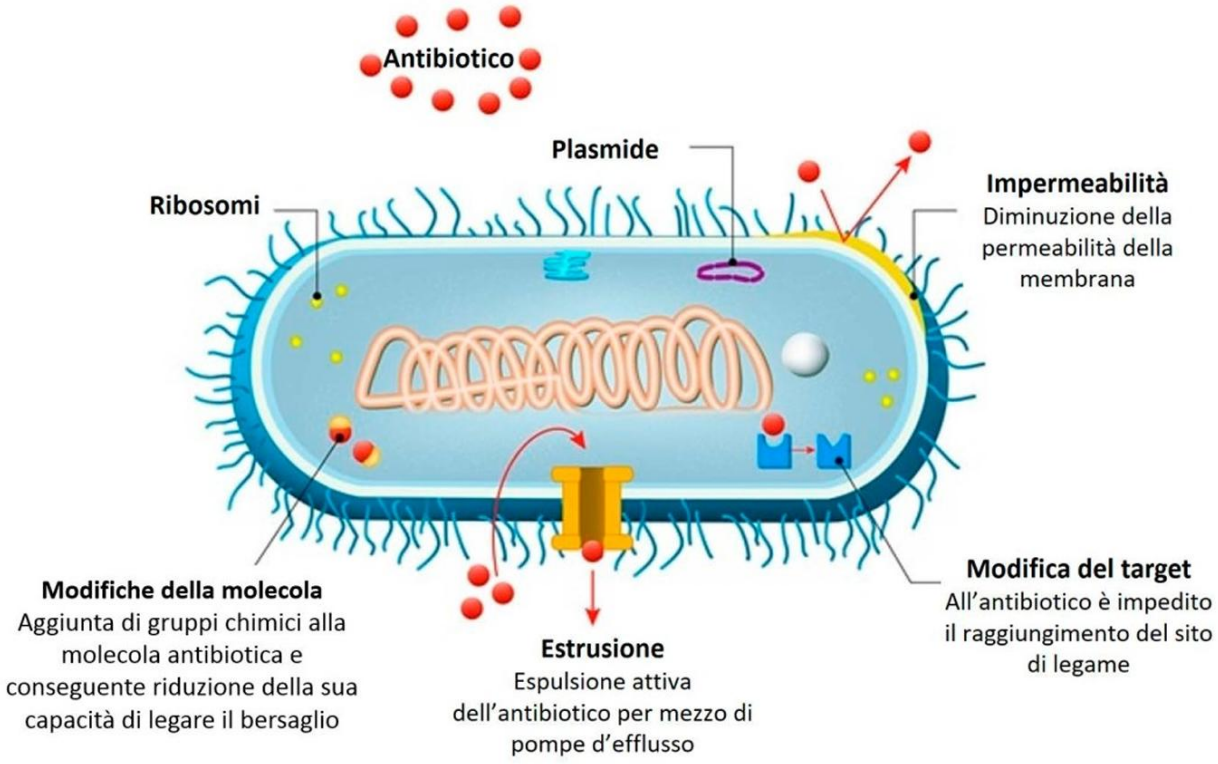

Figura 2. Meccanismi di resistenza agli antibiotici [67]

1.7.1. Meccanismi di resistenza ai β-lattamici

Un importante esempio di inattivazione enzimatica degli antibiotici è rappresentato dalle β-lattamasi, enzimi in grado di idrolizzare l'anello β-lattamico, determinando l'inattivazione di antibiotici quali penicilline e cefalosporine [35]. Le β-lattamasi si classificano in base alla struttura primaria, secondo la classificazione di Ambler, che raggruppa le β-lattamasi in 4 classi molecolari (A, B, C e D), oppure in base all'attività enzimatica e alla sensibilità agli inibitori (acido clavulanico, sulbactam, tazobactam), secondo la classificazione di Bush-Jacoby [68]. Le classi A, C e D comprendono le serina-β-lattamasi, caratterizzate dalla presenza di un residuo di serina nel sito attivo dell'enzima. La classe B, invece, comprende le metallo-β-lattamasi, che sono caratterizzate dalla presenza dello ione Zn^{2+}[69]. La classificazione funzionale di Bush, Jacoby e Medeiros divide le β-lattamasi in quattro gruppi funzionali (numerati da 1 a 4), suddivisi ulteriormente in sottogruppi (indicati con lettere) (*Figura 3*) [68].

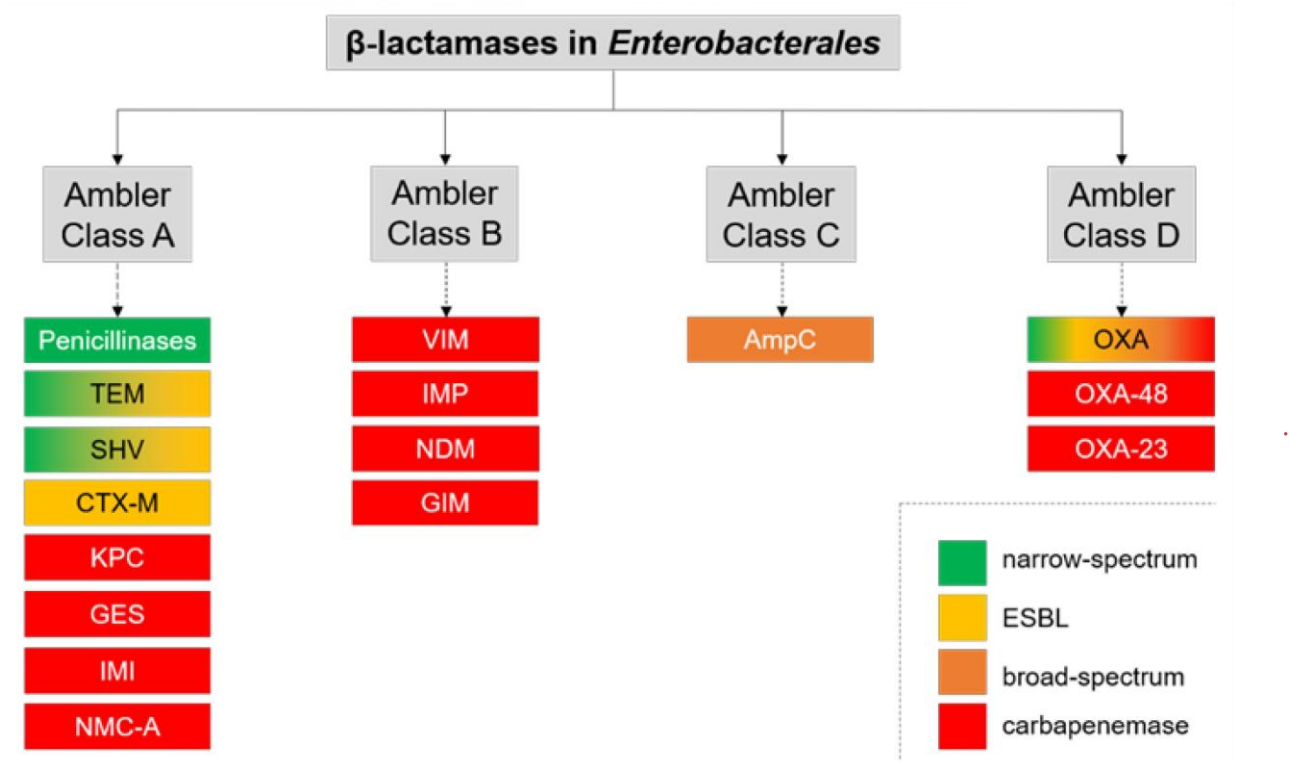

Figura 3. Classificazione di Ambler [70]

L'uso diffuso degli antibiotici β-lattamici ha esercitato una pressione selettiva favorendo la diffusione di β-lattamasi a spettro più ampio (ESBL). In particolare, l'introduzione delle cefalosporine di terza generazione ha favorito la comparsa e la diffusione di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), capaci di idrolizzare questi antibiotici [71]. I batteri Gram-negativi produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) rappresentano una delle principali cause di resistenza agli antibiotici β-lattamici. Identificate per la prima volta all'inizio degli anni '80, le ESBL si sono progressivamente diffuse a livello globale,

diventando ormai endemiche tra gli *Enterobacterales* isolati sia in ambito ospedaliero sia nelle infezioni acquisite in comunità. La loro ampia diffusione costituisce pertanto una rilevante problematica di sanità pubblica. I geni codificanti per le ESBL sono frequentemente localizzati su plasmidi e associati a trasposoni o sequenze di inserzione, elementi genetici che ne favoriscono la mobilità e contribuiscono alla loro rapida diffusione tra i batteri [72]. Le principali famiglie di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) comprendono TEM, SHV e CTX-M. Si tratta di β-lattamasi caratterizzate dalla capacità di idrolizzare le penicilline, le cefalosporine di terza generazione e l'aztreonam e, in alcuni casi, anche alcune cefalosporine di quarta generazione [73]. Le ESBL di tipo SHV e TEM derivano da β-lattamasi a spettro ristretto, come TEM-1, TEM-2 o SHV-1, che a seguito di mutazioni hanno ampliato lo spettro di substrati da idrolizzare, comprendendo cefalosporine di terza generazione (es. cefotaxime, ceftriaxone e ceftazidime) e aztreonam [68]. Sono state descritte per la prima volta agli inizi degli anni ’80 e fino agli anni ’90 sono state le ESBL predominanti, ad eccezione del Giappone e del Sud America. Questi enzimi sono prevalentemente diffusi in *K. pneumoniae*, soprattutto nei reparti di Terapia Intensiva. Gli enterobatteri possono ospitare geni che codificano per le ESBL di tipo SHV o TEM, ma le TEM sono diffuse in *E. coli, Proteus mirabilis* e *Providencia* spp., mentre le SHV risultano prevalenti in *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* [68]. Agli enzimi di tipo TEM e SHV, attualmente, si sono aggiunti gli enzimi appartenenti alla famiglia CTX-M. Le CTX-M si sono sviluppate indipendentemente dalle famiglie TEM e SHV e sono caratterizzate principalmente dalla capacità di idrolizzare il cefotaxime [74]. Le CTX-M sono cefotaximasi acquisite da plasmidi, in rapida diffusione con un significativo impatto clinico [75]. Sono state descritte per la prima volta alla fine degli anni ’80 in Argentina, Germania e Giappone. In Europa, per molto tempo questi enzimi sono rimasti rari, ma dagli anni 2000 si sono diffuse, soprattutto in *E. coli*, e anche a livello comunitario. Tra questi, CTX-M-15 è la variante maggiormente diffusa a livello mondiale, seguita da CTX-M-14, mentre CTX-M-27 è in progressiva diffusione in alcune aree geografiche. Ad oggi, *E. coli* è il produttore principale di CTX-M, seguito da *K. pneumoniae* e, in minor misura da *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Proteus* spp. e *Morganella morganii* [68]. La maggior parte di questi enzimi idrolizza oltre al cefotaxime, ceftriaxone, cefepime e ceftazidime. Però vi sono alcune varianti, in particolare CTX-M-15, che hanno acquisito una maggior attività verso ceftazidime, determinando una maggior resistenza a questo antibiotico [68]. Numerosi *Enterobacterales* producono β-lattamasi cromosomiche di classe C (conosciute come β-lattamasi di tipo AmpC). Questi enzimi inattivano penicilline, cefamicine e cefalosporine (sia a spettro ristretto sia di terza generazione, come cefotaxime, ceftriaxone e ceftazidime) e mostrano resistenza ai classici inibitori delle β-lattamasi quali acido clavulanico, sulbactam e tazobactam. La codifica di AmpC può essere cromosomica (cAmpC), tipica di specie quali *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens*, oppure plasmidica (pAmpC), trasferibile a batteri che di norma ne sono privi,

come *E. coli* o *K. pneumoniae*. Le AmpC mantengono un'attività minima verso le cefalosporine di quarta generazione (es. cefepime e cefpirome) e sono del tutto inefficaci contro i carbapenemi [76].
La diffusione delle β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e delle β-lattamasi di tipo AmpC ha contribuito alla rilevanza clinica dei carbapenemi, utilizzati nel trattamento delle infezioni sostenute da batteri multiresistenti, comprese quelle causate da microrganismi produttori di ESBL e AmpC. I batteri resistenti ai carbapenemi sono stati descritti per la prima volta nel 1996, con l'identificazione di un ceppo di *K. pneumoniae* produttore di carbapenemasi (11,23). Nell'ultimo decennio, l'emergere e la diffusione della resistenza ai carbapenemi sono aumentati a livello globale. I CRE (*carbapenem-resistant Enterobacterales*) sono definiti come *Enterobacterales* resistenti ad almeno uno degli antibiotici carbapenemici sulla base del loro profilo di sensibilità agli antibiotici, secondo una definizione di tipo fenotipico. Le infezioni sostenute da CRE si riscontrano principalmente in ambito ospedaliero; in particolare, le infezioni del flusso sanguigno causate da CRE sono associate a un elevato tasso di mortalità nella popolazione pediatrica.
Oltre che dalla produzione di carbapenemasi, la resistenza ai carbapenemi può derivare da diversi meccanismi, tra cui cambiamenti strutturali nelle proteine che legano la penicillina (PBP), la riduzione o la perdita di specifiche porine della membrana esterna, e l'attivazione di pompe di efflusso. Inoltre, la resistenza ai carbapenemi può essere acquisita mediante combinazione degli enzimi CTX-M (attività contro cefotaxime) e AmpC, permettendo una bassa resistenza ai carbapenemi. In particolare, la combinazione tra l'espressione di β-lattamasi e alterazioni delle porine può determinare una elevata resistenza ai carbapenemi, attenuando le risposte terapeutiche [77]. Tra le carbapenemasi di classe A di maggior rilevanza clinica rientrano le KPC. Il primo ceppo produttore di KPC, appartenente a *K. pneumoniae* (KPC-2), è stato identificato negli Stati Uniti nel 1996 [69]. Successivamente, i ceppi produttori di KPC si sono diffusi rapidamente a livello globale (Stati Uniti, Porto Rico, Colombia, Italia, Grecia, Israele e Cina) [78]. Gli enzimi KPC sono codificati da geni localizzati su plasmidi trasferibili, principalmente in *K. pneumoniae*, ma sono stati riscontrati anche in altri *Enterobacterales,* tra cui *Enterobacter* spp. e *Salmonella* spp. [79]. Le β-lattamasi di classe B sono metallo-β-lattamasi (MBL) caratterizzate dalla capacità di idrolizzare i carbapenemi e dalla resistenza agli inibitori delle β-lattamasi disponibili in commercio. La loro attività può invece essere inibita mediante chelazione degli ioni metallici presenti nel sito attivo [80]. Tra le principali MBL di interesse clinico rientrano IMP, VIM e NDM. Le MBL sono note come metallo-β-lattamasi, poiché utilizzano ioni metallici, generalmente zinco, come cofattori per agire sul sito attivo dell'enzima e idrolizzare l'anello β-lattamico. Tra i principali tipi di MBL rientrano la New Delhi metallo-β-lactamase (NDM), la Verona integron-encoded metallo-β-lactamase (VIM) e l'imipenemase (IMP). Questi enzimi idrolizzano tutti gli antibiotici β-lattamici attualmente disponibili, ad eccezione dei monobattami, come l'aztreonam. L'IMP è stata descritta per la prima volta in Giappone in *S.*

marcescens nei primi anni Novanta e sono state successivamente identificate oltre 85 varianti di sequenza. Le varianti IMP sono state rilevate in specie appartenenti ai generi *Acinetobacter* e *Pseudomonas*, oltre che nella famiglia *Enterobacteriaceae*. La VIM è stata successivamente identificata in *P. aeruginosa* a Verona, in Italia, alla fine del 1997, e sono state descritte oltre 69 varianti. Le varianti VIM sono principalmente presenti in specie appartenenti ai generi *Pseudomonas* e *Acinetobacter* e nella famiglia *Enterobacteriaceae*, con una distribuzione globale. La NDM è attualmente la MBL più diffusa ed è stata identificata per la prima volta in *K. pneumoniae* ed *E. coli* isolati da un paziente che aveva viaggiato dall'India alla Svezia nel 2008. Sono state descritte 29 varianti di NDM, tra le quali NDM-1 è la più diffusa. Le varianti NDM sono generalmente prevalenti in *K. pneumoniae*, *E. coli*, *A. baumannii* e *P. aeruginosa* [77]. Gli enzimi di classe B sono generalmente localizzati su plasmidi o su altri elementi genetici mobili. IMP e VIM, ad esempio, sono principalmente associate agli integroni e sono codificate da cassette geniche presenti all'interno di integroni di classe 1 o 3, che possono essere incorporate nei trasposoni e successivamente inserite nei plasmidi batterici. La NDM, invece, non è associata agli integroni ed è stata identificata in plasmidi rapidamente diffusisi a livello globale. I batteri produttori di NDM possono inoltre ospitare, su plasmidi, altre carbapenemasi, quali KPC, VIM e OXA, oltre a ESBL. L'emergenza di batteri produttori di NDM e la crescente presenza di varianti rappresentano pertanto una significativa minaccia per la salute pubblica [77]. Gli enzimi di classe D sono serina β-lattamasi note come ossacillinasi o oxacillin-hydrolyzing enzymes (OXA) e comprendono oltre 200 enzimi. Le OXA sono caratterizzate da una rapida evoluzione e da un progressivo ampliamento dello spettro di attività. Tra gli enzimi con attività di idrolisi dei carbapenemi, i più diffusi sono OXA-48 e OXA-181, con oltre 40 varianti di carbapenemasi. OXA-48 è stata identificata per la prima volta in *K. pneumoniae* in Turchia nel 2001. I plasmidi rappresentano i principali elementi genetici coinvolti nella trasmissione e nella diffusione dei geni. Per OXA-48, gli elementi più frequentemente coinvolti sono plasmidi autoconiugativi di 60–70 kb. Attualmente, le varianti OXA-48 e OXA-101 sono prevalentemente presenti in *K. pneumoniae* in Turchia, Medio Oriente, Nord Africa ed Europa. Tuttavia, i batteri produttori di OXA possono presentare una resistenza di basso livello, dovuta alla debole espressione dell'enzima, con il rischio di falsi negativi nella rilevazione e di conseguenti difficoltà nella scelta del trattamento appropriato [77]. I geni che codificano le carbapenemasi appartenenti alle β-lattamasi sono indicati con la nomenclatura *bla*, tra cui *blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaVIM* e *blaIMP*. Questi geni sono presenti in numerosi batteri, tra cui *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas*. Tali microrganismi possono essere isolati non solo nell'uomo, ma anche negli animali, negli alimenti e nelle fonti d'acqua a livello globale [77].

Una strategia per superare la resistenza dovuta alla produzione di β-lattamasi consiste nell'utilizzo di inibitori delle β-lattamasi. Questi inibitori non hanno attività antibatterica ma se somministrati in

associazione con β-lattamici permettono di proteggerli dalla degradazione di questi enzimi, mantenendoli attivi verso i batteri produttori di β-lattamasi. I primi inibitori utilizzati sono l'acido clavulanico, sulbactam e tazobactam, che sono molecole con il nucleo β-lattamico. Queste molecole inibiscono diverse serina β-lattamasi di classe A e sono utilizzate in combinazione a cefalosporine o penicilline per ampliare lo spettro di attività [4]. Recentemente sono stati sviluppati nuovi inibitori di β-lattamasi quali avibactam, relebactam e vaborbactam [72].

1.7.2. Resistenza alla colistina

Un ulteriore motivo di preoccupazione è rappresentato dalla resistenza alla colistina, un antibiotico considerato di ultima istanza per il trattamento di alcune infezioni sostenute da batteri multiresistenti ai farmaci (MDR), soprattutto per infezioni da bacilli Gram-negativi resistenti ai carbapenemi. La diffusione di ceppi resistenti alla colistina è stata associata, almeno in parte, all'impiego della colistina negli allevamenti, che ha contribuito alla selezione di microrganismi resistenti. Tale fenomeno è stato riscontrato in diverse specie batteriche, tra cui *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli* ed *Enterobacter* spp. [47,81].

2. Scopo del lavoro

L'emocoltura rappresenta un'indagine microbiologica deputata a ricercare la presenza di microrganismi nel sangue prelevato in flaconi con terreni di coltura e incubati successivamente in celle di uno strumento automatico. È classificata come un esame indispensabile per una diagnosi clinica tempestiva che permette l'identificazione dell'agente eziologico.

La rilevazione di batteriemia richiede un corretto flusso operativo dalla fase preanalitica alla fase analitica, caratterizzato dall'utilizzo di un efficiente sistema strumentale e da un sistema di gestione e di comunicazione ben organizzato che permetta una tempestiva comunicazione con i medici di reparto.

L'internato di tesi è stato svolto da settembre 2025 a marzo 2026 presso il laboratorio di Microbiologia & Virologia dell'IRCCS Maugeri-sede Pavia, sotto la supervisione della Dott.ssa Antonella Rezzani. Questo Istituto include reparti riabilitativi di lungodegenza per acuti e non e ricovera pazienti provenienti da strutture distribuite sia sul territorio nazionale sia estero. Il laboratorio di Microbiologia processa non solo i campioni biologici raccolti *in loco* ma anche provenienti da tutti gli Istituti Maugeri della Regione Lombardia.

Il presente studio si propone di valutare l'approccio integrato alla diagnostica microbiologica dell'emocoltura, analizzando gli aspetti tecnici, clinici ed epidemiologici che influenzano la qualità diagnostica delle infezioni del torrente ematico e la gestione del paziente con sospetta sepsi o batteriemia.

L'adozione di un approccio integrato e standardizzato alla diagnostica microbiologica dell'emocoltura consente di migliorare l'accuratezza diagnostica delle batteriemie, ridurre il numero di contaminazioni e ottimizzare la gestione clinico-terapeutica del paziente.

Gli obiettivi dello studio sono stati:

1. Valutare l'appropriatezza del processo preanalitico dell'emocoltura, con particolare attenzione ai seguenti punti:
    - numero di set emocolturali raccolti;
    - incidenza delle emocolture solitarie: Con il termine di emocoltura solitaria (ES) si intende il singolo set di emocolture prelevato per paziente e inviato nell'arco di 24 ore. Ciascun set di emocolture, a sua volta, si intende costituito da un flacone per aerobi e uno per anaerobi prelevato con un singolo prelievo venoso [82].
    - numero di emocolture negative e positive alla crescita microbica.
2. Determinare il tasso di contaminazione emocolturale valutato nel nostro studio mediante la rilevazione della diffusione di isolati di CoNS;

3. Valutare l'efficienza del percorso diagnostico microbiologico delle emocolture positive, con particolare riferimento ai tempi di esecuzione dell'esame microscopico diretto e alla tempestività della comunicazione dei risultati preliminari;
4. Valutare la frequenza dei microrganismi isolati dalle emocolture positive nel periodo di studio e il loro pattern di antibiotico-resistenza;
5. Analizzare l'applicazione della tecnica "Short-Term Incubation" per l'identificazione precoce dei microrganismi e l'esecuzione anticipata dell'antibiogramma mediante sistema automatizzato MicroScan, valutandone il contributo alla riduzione del turnaround time diagnostico;
6. Evidenziare il contributo del laboratorio di microbiologia al supporto delle decisioni cliniche e ai programmi di antimicrobial stewardship attraverso la fornitura di risultati microbiologici tempestivi e affidabili.

Attraverso l'integrazione dei dati microbiologici, temporali ed epidemiologici, lo studio si è proposto di fornire, quindi, una valutazione complessiva dell'impatto della diagnostica delle emocolture sulla gestione clinica delle infezioni del torrente ematico e di identificare eventuali aree di miglioramento del percorso diagnostico-assistenziale.

In particolare, è stata condotta un'analisi critica sui dati raccolti nel periodo di internato di tesi integrando e confrontandoli con i dati di periodi equivalenti degli anni precedenti.

Tutti i ceppi utilizzati in questo studio sono stati isolati nel corso della diagnostica di routine a cui ho partecipato attivamente apprendendo così le principali tecniche colturali concentrandomi sull'iter diagnostico delle emocolture.

3. Materiali e metodi

3.1. Descrizione del contesto dello studio

L'internato di tesi si è svolto dal 1° settembre 2025 al 28 febbraio 2026 presso il laboratorio di Microbiologia dell'istituto Scientifico Clinico IRCCS Maugeri-Pavia, struttura dotata di reparti di riabilitazione ad alta specialità. L'IRCCS Maugeri offre programmi di riabilitazione (cardiologica, respiratoria, ortopedica, neurologica e postcoma) e opera attraverso diverse strutture distribuite su tutto il territorio italiano. Inoltre, sono presenti reparti caratterizzati dalla più alta intensità di cura (reparto gravi cerebrolesioni, unità spinale) che accolgono pazienti con conseguenze neurologiche di cerebrolesioni acquisite di origine traumatica e compromissione permanente o temporanea delle funzioni cognitive, fisiche e psicosociali con associato stato di coscienza alterato e una possibile o dubbia probabilità di recupero funzionale e psicosociale. Nella maggior parte dei casi, questi pazienti sono ricoverati direttamente dalle unità di terapia intensiva o dai reparti subintensivi e richiedono pratiche riabilitative complesse.

Durante l'Internato di tesi, sono state apprese le tecniche relative al processamento delle emocolture, all'identificazione dei microrganismi isolati e alla determinazione dei relativi profili di sensibilità agli antibiotici, a cui si è partecipato attivamente. Al fine di confrontare la distribuzione dei patogeni identificati durante il periodo di studio con quella osservata negli anni precedenti, è stata condotta un'analisi retrospettiva dei dati relativi ai corrispondenti intervalli temporali (1° settembre-28 febbraio) dei trienni 2021–2022, 2022–2023 e 2023–2024.

Lo studio ha incluso l'estrazione e l'analisi dei dati microbiologici relativi a 4 distinte unità operative di degenza ospedaliera:

- 3 Unità afferenti all'IRCCS Maugeri-Pavia (U.O. Neurologia Riabilitativa, U.O. Riabilitazione Specialistica Spinale, U.O. Gravi Cerebrolesioni);
- 1 Unità afferente all'IRCCS Maugeri-Milano (U.O. Cure Sub acute).

Le suddette unità operative sono state selezionate in virtù della loro rappresentatività epidemiologica e della consistenza dei dati microbiologici disponibili, elementi ritenuti imprescindibili per garantire solidità e attendibilità dell'analisi retrospettiva.

3.2. Gestione e tracciabilità informatica

Il prelievo, effettuato in reparto, è stato eseguito con l'idoneo device a circuito in 2 flaconi, uno per aerobiosi, uno per anaerobiosi facendo riferimento alle procedure di disinfezione del protocollo aziendale che prevede l'utilizzo di ammonio quaternario in soluzione alcolica. La statistica dei dati a cui ci siamo riferiti è stata estrapolata utilizzando i dati estratti dal LIS (Laboratory Information System) che ha anche permesso di effettuare l'elaborazione epidemiologica degli isolati. Il sistema informatizzato del laboratorio ha assicurato la gestione integrata e la tracciabilità completa di tutte le fasi dell'intero processo microbiologico permettendo di validare e archiviare i risultati in modo sicuro e standardizzato. Sono stati esclusi i duplicati, considerando duplicati due campioni positivi alla crescita microbica in un intervallo di 7 giorni.

3.3. Modalità di raccolta e trasporto dei campioni di sangue

Il prelievo ematico per l'esecuzione dell'emocoltura viene effettuato, quando possibile, prima dell'inizio della terapia antibiotica, poiché la presenza dell'antimicrobico nel sangue potrebbe inibire la crescita dei microrganismi e determinare risultati falsamente negativi. Nei pazienti già in trattamento, il campione viene generalmente raccolto immediatamente prima della successiva somministrazione dell'antibiotico, momento in cui la concentrazione del farmaco nel circolo ematico è più bassa.

Per l'esecuzione dell'esame sono stati utilizzati flaconi contenenti terreni di coltura liquidi arricchiti, progettati per favorire la crescita dei microrganismi eventualmente presenti nel sangue. Ogni set di emocoltura è costituito da due flaconi: uno per la ricerca di microrganismi aerobi e uno per quelli anaerobi. Nella pratica clinica, il prelievo viene eseguito principalmente mediante venipuntura periferica; tuttavia, quando vi è il sospetto di una batteriemia correlata a catetere venoso centrale (CVC), il campionamento viene effettuato contemporaneamente sia dal catetere sia da una vena periferica, raccogliendo in entrambi i casi i flaconi per aerobi e anaerobi. La prima quantità di sangue raccolta tramite catetere non va scartato, poiché presenta la massima concentrazione di microrganismi e ottimizza le probabilità di isolamento del patogeno [2].

Uno degli aspetti più importanti dell'emocoltura è il volume di sangue raccolto, considerato il principale determinante della sensibilità diagnostica dell'esame. Le linee guida raccomandano infatti di prelevare complessivamente almeno 30-40 mL di sangue, distribuiti in due o tre set completi di emocolture. L'esecuzione di più set aumenta la probabilità di isolare il microrganismo responsabile dell'infezione e consente di distinguere una vera batteriemia da un'eventuale contaminazione del campione. Per garantire l'accuratezza dei risultati, ogni flacone deve essere inoculato con circa 8-10 mL di sangue [2]. A tale scopo, sui flaconi è presente un indicatore del livello di riempimento che deve essere rispettato: un volume insufficiente può ridurre la sensibilità dell'esame, mentre un

eccesso di sangue può alterare il corretto rapporto tra campione e terreno di coltura, compromettendo la crescita microbica.

La qualità del risultato dipende inoltre dalla corretta esecuzione del prelievo. Per questo motivo, la procedura deve essere effettuata da personale adeguatamente formato e secondo protocolli standardizzati. Prima della raccolta del campione è indispensabile eseguire un'accurata antisepsi delle mani dell'operatore, della cute del paziente e dei tappi dei flaconi mediante idonei disinfettanti, al fine di ridurre il rischio di contaminazione e garantire l'affidabilità dell'esame [2].

3.4. Trasporto dei campioni

Una volta completato il prelievo, i flaconi vengono inviati al laboratorio di microbiologia nel più breve tempo possibile, preferibilmente entro due ore per permettere al personale tecnico l'avvio tempestivo delle procedure diagnostiche. I flaconi, per accorciare i tempi di trasferimento manuale tra piani differenti, sono stati inviati in bossoli tramite un sistema di posta pneumatica, alimentato da compressori d'aria e costituito da una rete di tubi che collega differenti stazioni di invio allocate nei reparti. I bossoli di trasporto sono realizzati con un corpo trasparente in modo da poter identificare visivamente il contenuto (*Figura 4*). Questo sistema ha permesso di velocizzare il trasporto dei campioni e un migliore utilizzo delle risorse umane.

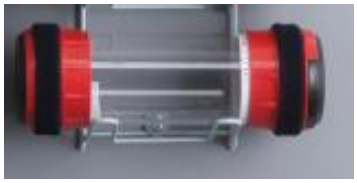

Figura 4. Rappresentazione di un bossolo utilizzato presso la struttura Maugeri.

3.5. Sistema di emocoltura utilizzato e condizioni di incubazione

I campioni dopo il loro arrivo in laboratorio sono stati incubati nel sistema automatizzato BACT/ALERT. Il sistema BACT/ALERT (*Figura 5*) è progettato per automatizzare l'intero processo di analisi e consente di gestire simultaneamente l'incubazione, l'agitazione e il monitoraggio continuo dei flaconi di emocoltura. Ogni flacone monouso è dotato di un sensore colorimetrico a emulsione liquida (LES, Liquid Emulsion Sensor) posizionato sul fondo, in grado di rilevare le variazioni di pH associate alla produzione di anidride carbonica (CO_2) derivante dalla crescita microbica. Durante il metabolismo, i microrganismi presenti nel campione utilizzano i substrati nutritivi del terreno di coltura e rilasciano CO_2 come prodotto metabolico. L'accumulo di questo gas determina una diminuzione del pH del terreno e il conseguente viraggio cromatico del sensore, che passa da verde scuro a giallo (*Figura 6*). Tale variazione viene rilevata da un sistema ottico costituito da un

reflettometro elettrico situato alla base di ciascuna cella di lettura in cui viene inserito il flacone. Il segnale viene quindi convertito e trasmesso al software dello strumento, che lo elabora mediante specifici algoritmi in grado di generare una curva di crescita microbica. Quando la produzione di CO_2 supera una soglia critica, il sistema classifica automaticamente il flacone come positivo. In tal caso, viene emessa una segnalazione visiva sul monitor accompagnata da un allarme acustico, consentendo al personale di laboratorio di procedere tempestivamente con le analisi successive.

I campioni risultati positivi sono stati sottoposti a esame microscopico mediante colorazione di Gram e a subcoltura su terreni solidi, al fine di ottenere l'isolamento in colonia singola del microrganismo responsabile, la sua identificazione e la successiva valutazione della sensibilità agli antimicrobici.

In assenza di segnale di positività, i flaconi rimangono in incubazione e sotto monitoraggio continuo per un periodo massimo di cinque giorni, secondo il protocollo standard in uso presso il laboratorio di Microbiologia. Durante tale intervallo, il sistema controlla costantemente ogni campione per rilevare eventuali segni di crescita microbica. Qualora, al termine del periodo di incubazione, non vengano evidenziate variazioni, il campione viene considerato negativo e segnalato dal sistema come pronto per la rimozione. Solo a questo punto viene emesso il referto definitivo di negatività che viene inviato direttamente al sistema informatico di validazione denominato BASE.



Figura 5. Rappresentazione dello strumento BACT/ALERT.

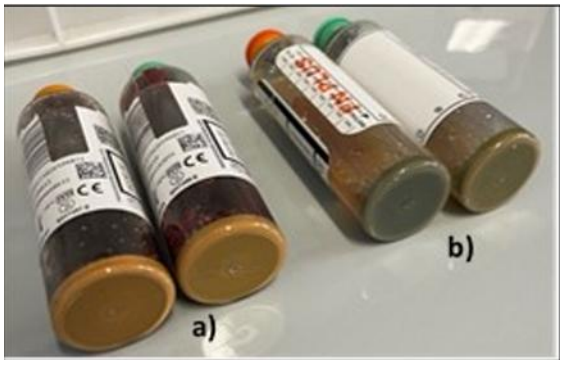

Figura 6. Flaconi aerobi (tappo verde) e flaconi anaerobi (tappo arancio): a) fondo giallo=positivo; b) fondo verde=negativo.

3.6. Gestione delle emocolture positive alla crescita microbica: esame microscopico

In caso di positività, rilevata dallo strumento BACT/ALERT, si è proceduto all'esame microscopico. Questo è consistito nell'allestimento e l'osservazione al microscopio ottico di uno striscio sottile di campione di sangue sottoposto a colorazione di Gram, una tecnica fondamentale per differenziare i microrganismi in base alle caratteristiche strutturali della loro parete cellulare.

Durante l'internato di tesi si è utilizzato per la colorazione, il coloritore BASO AS 316 (*Figura 7*) che è un sistema a ciclo chiuso progettato per la colorazione di Gram su preparati biologici per garantire elevati standard di sicurezza, impedendo completamente la dispersione di aerosol durante il processo di colorazione. La presenza di linee idrauliche separate e indipendenti ha eliminato il rischio di contaminazione crociata tra reagenti, coloranti e fissativi. Inoltre, il rischio di contaminazione tra campioni è stato eliminato grazie all'isolamento dei singoli vetrini in appositi pozzetti dedicati, nei quali i reagenti utilizzati non erano condivisi con altri preparati.

Prima di procedere con la colorazione, i vetrini sono stati fissati in metanolo per 15 minuti e poi inseriti in specifici rotori; successivamente lo strumento ha eseguito automaticamente, secondo un protocollo standardizzato, tutte le fasi previste dalla metodica di Gram. In particolare:

1. il preparato è stato inizialmente trattato con cristal-violetto per 1 minuto e successivamente risciacquato con acqua per rimuovere il colorante in eccesso;
2. È seguita la fase di mordenzatura mediante applicazione della soluzione di Lugol (iodio e ioduro di potassio 0,4% in acqua) per 1 minuto, anch'essa seguita da un risciacquo;
3. il preparato è stato quindi sottoposto a decolorazione mediante una soluzione a base di alcool etilico per circa 10 secondi e nuovamente risciacquato per eliminare il decolorante residuo.
4. successivamente è stata effettuata la contro-colorazione con safranina (colore rosso) per 1 minuto, seguita da un ultimo lavaggio con acqua.



Figura 7. Coloritore BASO AS 316.

Al termine del processo di colorazione, il vetrino è stato sottoposto a osservazione microscopica per la valutazione delle caratteristiche morfologiche e tintoriali dei microrganismi presenti. Infatti, la Colorazione Gram è differenziale permettendo di distinguere i batteri Gram-negativi e Gram-positivi. Dall'osservazione microscopica è stato possibile ottenere un orientamento diagnostico immediato e cruciale per la terapia empirica del paziente. Oltre a distinguere i batteri Gram-positivi e Gram-negativi, l'analisi della morfologia (cocchi, bacilli o lieviti) e della loro disposizione spaziale ha permesso di formulare le seguenti ipotesi presuntive:

- Cocchi Gram-positivi a grappolo: orientano fortemente verso il genere *Staphylococcus*. In questo contesto è fondamentale distinguere tra *S. aureus* (patogeno critico) e i CoNS, come *S. epidermidis*, che spesso rappresentano contaminanti della flora cutanea se isolati in un solo set.
- Cocchi Gram-positivi a catene**:** indirizzano verso il genere *Streptococcus* o *Enterococcus* (generalmente disposti in catene corte o coppie).
- Diplococchi Gram-positivi: la tipica disposizione a coppie (spesso a forma di fiamma o lanciolata) è fortemente indicativa di *S. pneumoniae* (pneumococco), causa comune di sepsi secondaria a polmonite o meningite.
- Bacilli Gram-negativi: rappresentano un reperto critico (sospetto di sepsi severa o shock settico). La sola morfologia non permette di differenziarli, potendo trattarsi sia di enterobatteri (quali *E. coli* o *K. pneumoniae*) sia di batteri non fermentanti (come *P. aeruginosa*).
- Lieviti: si rivelano alla colorazione Gram come grosse cellule ovali o rotondeggianti (nettamente maggiori dei batteri) ed intensamente colorate di blue. La presenza di gemmazioni o pseudoife orienta verso una candidemia (es. *Candida* spp.), un'infezione sistemica ad alta mortalità che richiede un tempestivo trattamento antimicotico (*Figura 8*).

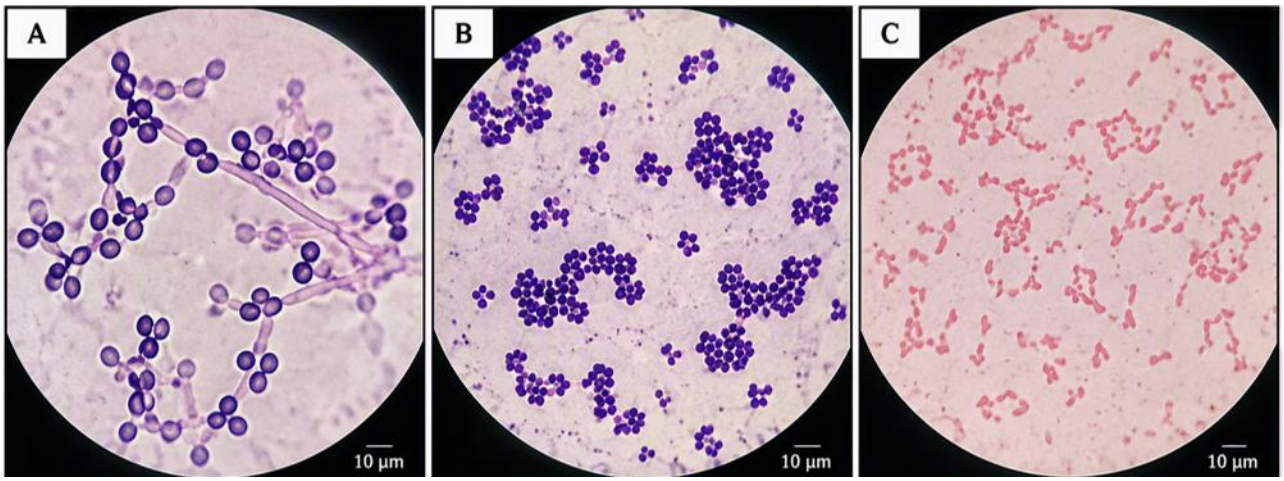

Figura 8. Osservazione microscopica mediante colorazione di Gram di differenti microrganismi.

A) Candida spp., con evidenza di blastoconidi, cellule gemmanti e pseudoife.

B) Batteri Gram-positivi (cocchi), caratterizzati dalla colorazione viola.

C) Batteri Gram-negativi (bacilli), caratterizzati dalla colorazione rosa-rossastra.

Immagini ottenute durante l'attività sperimentale svolta presso il Laboratorio di Microbiologia.

3.7. Processamento delle emocolture sui terreni agarizzati

Tutti i flaconi di emocoltura segnalati positivi alla crescita microbica dallo strumento sono stati sottoposti a subcoltura. Dopo aver perforato il tappo in gomma del flacone con una siringa, si è prelevata una goccia del contenuto, che è stata depositata su idonee piastre colturali. La semina è stata effettuata con un'ansa calibrata da 10 µL, utilizzando la tecnica dei tre quadranti, al fine di ottenere l'isolamento di colonie singole (*Figura 9*).

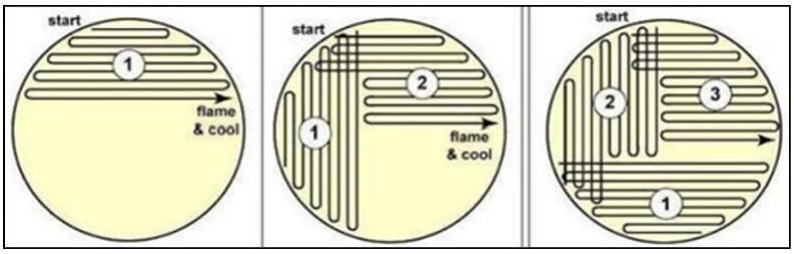

Figura 9. Tecnica dei tre quadranti.

I terreni di coltura selettivi, differenziali e arricchiti, sono stati scelti in funzione delle caratteristiche microbiologiche dei microrganismi di interesse, al fine di favorirne l'isolamento e l'identificazione. Per i flaconi aerobi si sono utilizzati i terreni seguenti:

- Agar sangue (COS): è un terreno molto nutriente, non selettivo che permette la crescita della maggior parte dei batteri. Contiene il 5% di sangue di montone o cavallo e per questo è utilizzato per evidenziare la capacità di emolisi dei batteri, distinguendoli in:
    - Batteri beta-emolitici: emolisi completa degli eritrociti, che si manifesta con la formazione di un alone trasparente intorno alla colonia (es. *S. pyogenes*).
    - Batteri alfa-emolitici**:** emolisi parziale degli eritrociti dando luogo alla formazione di un alone verde intorno alla colonia per la degradazione della bilirubina a biliverdina (es. *S. pneumoniae*).
    - Batteri gamma-emolitici: mancanza di emolisi, non si osserva nessun alone intorno alla colonia (es. *E. faecalis* ed *E. faecium*).

  Le piastre sono state incubate a 35°C in aerobiosi per 24-48 ore (B).
- Agar cioccolato (PVX): è un terreno arricchito, non selettivo, contenente sangue (montone o cavallo) cotto e fattori di crescita, importanti per lo sviluppo di batteri esigenti quali *Neisseria* spp*., Haemophilus* spp. La cottura provoca la lisi dei globuli rossi e la liberazione dei fattori di crescita, conferendo al terreno il caratteristico colore marrone simile al cioccolato. Il terreno ha richiesto un'incubazione a 35°C in atmosfera con il 5% di CO_2 per 24-48 ore (A).
- MacConkey agar (MCK): è un terreno selettivo e differenziale per identificare i batteri Gram-negativi. La presenza di sali biliari e cristal-violetto inibisce la crescita dei Gram-positivi; mentre la presenza di lattosio e rosso fenolo (indicatore di pH) differenzia i Gram-negativi fermentanti (*E. coli, K. pneumoniae,* colonie rosse) da quelli non fermentanti (*Salmonella* e *Shigella*, colonie bianche). Il terreno è stato incubato a 35°C in aerobiosi per 24 ore (C).
- Mannitol salt agar (MSA2): è un terreno selettivo e differenziale, utilizzato per l'isolamento degli Stafilococchi (Gram-positivi). Esso contiene mannitolo (1%) e sodio cloruro (NaCl 7,5%). La sua selettività è dovuta alle alte concentrazioni di NaCl che permette solo la crescita di microrganismi alofili. È differenziale in quanto grazie alla fermentazione del mannitolo attuata dai CoNS, si ha la produzione di acidi che provocano una variazione del pH e un viraggio del colore da rosso a giallo, questo è dovuto alla presenza nel terreno di un indicatore, rosso fenolo. In particolare, *S. aureus* produce colonie gialle accompagnate dall'ingiallimento del terreno circostante, mentre i CoNS formano colonie rosa senza modificare il colore del terreno. Il terreno è stato incubato a 35°C in aerobiosi per 24-48 ore (D).
- Sabouraud agar con cloramfenicolo (SGC2): è un terreno selettivo, utilizzato per la ricerca e isolamento dei miceti. È caratterizzato da un'elevata concentrazione di destrosio e da un pH acido, condizioni che favoriscono la crescita fungina limitando quella batterica. I peptoni presenti nel terreno forniscono inoltre nutrienti essenziali per lo sviluppo dei microrganismi. L'aggiunta di cloramfenicolo incrementa ulteriormente l'inibizione batterica e facilita il

recupero dei funghi patogeni. Il terreno è stato incubato a 35°C in aerobiosi per 48 ore (E) (*Figura 10*).

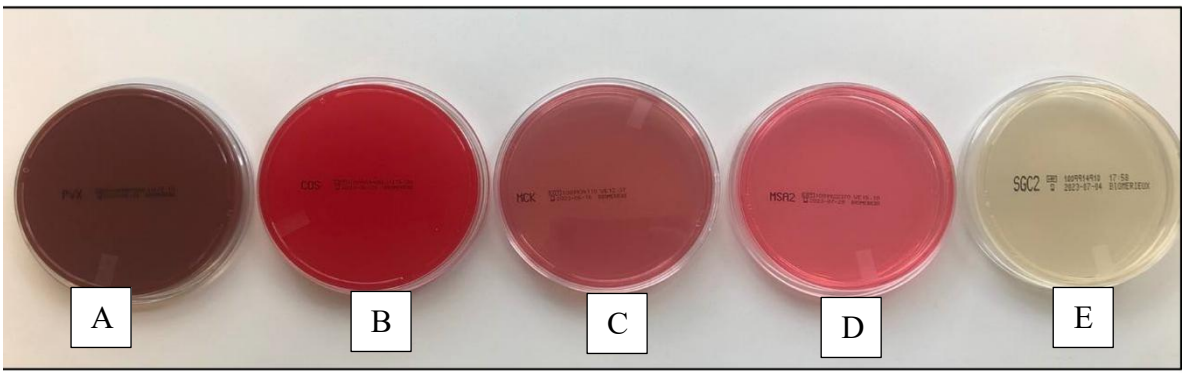

Figura 10. Terreni utilizzati per la crescita dei microrganismi aerobi presso il laboratorio Microbiologia IRCCS Maugeri. (A: Agar cioccolato, B:Agar sangue, C: MacConkey agar, D: Mannitol salt agar, E: Agar Saboraud).

Per i flaconi anaerobi sono stati utilizzati i seguenti terreni:

- Agar sangue (COS)
- MacConkey agar (MCK)
- Mannitol salt agar (MSA2)
- Agar cioccolato (PVX)
- Agar Schaedler (SCS**)** (*Figura 11*), un terreno altamente nutritivo utilizzato per l'isolamento e la coltivazione dei batteri anaerobi. La presenza di emina e sangue di montone fornisce fattori di crescita essenziali, tra cui l'eme, necessari per lo sviluppo di numerose specie anaerobie strette. Sebbene particolarmente indicato per questi microrganismi, il terreno non è strettamente selettivo e può consentire anche la crescita di batteri anaerobi facoltativi. Per tale motivo, in presenza di colture miste, i risultati ottenuti dalle piastre incubate in anaerobiosi sono stati confrontati con quelli delle colture incubate in aerobiosi. Il terreno è stato incubato a 35°C in atmosfera anaerobica per almeno 24-48 ore.

.



Figura 11. Terreno Schaedler utilizzato per la crescita dei microrganismi anaerobi, presso il laboratorio Microbiologia IRCCS Maugeri.

Se all'osservazione microscopica si evidenziano cocchi Gram-positivi disposti a catenelle, si ipotizzava la presenza di *Streptococcus* spp. In questi casi si procedeva anche alla semina su terreno CNA (Columbia Nalidixic Acid Agar), selettivo per i batteri Gram-positivi. Qualora, invece, si osservassero ife fungine compatibili con *Candida* spp., la semina veniva effettuata su un terreno cromogeno (CAND), consentendo una differenziazione e un'identificazione presuntiva delle principali specie di *Candida* sulla base della colorazione delle colonie. Di seguito sono descritti in dettaglio i terreni utilizzati in questi ultimi casi:

- CNA **(**Columbia nalidixic acid): è un terreno selettivo per Cocchi Gram-positivi. Si tratta di un terreno agar-sangue in cui sono presenti gli antibiotici colistina e acido nalidixico che inibiscono la crescita dei Gram-negativi. Il terreno è stato incubato a 35°C in atmosfera al 5% di CO_2 per 24-48 ore.
- Brilliance Candida Agar: utilizzato per la ricerca di lieviti del genere *Candida*, è stato incubato a 35°C in aerobiosi per 48 ore. Si tratta di un terreno cromogenico che consente l'identificazione presuntiva delle principali specie di *Candida* di interesse clinico. Il terreno contiene substrati cromogenici che vengono idrolizzati da specifici enzimi prodotti da alcune specie di *Candida*. L'idrolisi dei substrati determina l'accumulo di pigmenti all'interno delle colonie, che assumono una colorazione caratteristica in funzione del profilo enzimatico della specie isolata, come di seguito specificato:
    - *C. albicans* e *Candida dubliniensis* producono generalmente colonie di colore verde;
    - *Candida tropicalis* sviluppa colonie di colore blu scuro;
    - *Candida krusei* forma colonie di colore marrone o rosa;
    - *Candida glabrata*, *Candida kefyr* e *Candida parapsilosis* producono colonie con tonalità variabili dal beige al marrone o al giallo.

L'impiego combinato di questi terreni di coltura ha consentito l'isolamento e la differenziazione dei principali batteri e miceti responsabili delle infezioni del torrente ematico, permettendo le successive procedure di identificazione biochimica e valutazione della sensibilità agli agenti antimicrobici.

3.8. Lettura e interpretazione delle piastre colturali

Al termine dell'incubazione, le piastre ottenute dalla subcoltura delle emocolture positive sono state sottoposte a una prima valutazione microbiologica finalizzata all'identificazione preliminare del microrganismo responsabile dell'infezione.

Questa prima lettura è stata generalmente effettuata dopo circa 24 ore di incubazione, al fine di verificare l'eventuale presenza di crescita microbica e, quando possibile, accelerare le successive procedure diagnostiche. Le piastre sono state quindi reincubate e sottoposte a una lettura definitiva nelle successive 24 ore, così da consentire un adeguato sviluppo delle colonie e una corretta interpretazione delle loro caratteristiche morfologiche. La reincubazione è risultata particolarmente utile per quei microrganismi che crescono più lentamente. Ad esempio, *S. aureus* può mostrare una pigmentazione gialla e una più evidente attività emolitica sull'agar sangue dopo un'incubazione prolungata.

L'osservazione delle caratteristiche macroscopiche delle colonie ha rappresentato una fase fondamentale del processo diagnostico, poiché alcuni microrganismi presentavano aspetti colturali caratteristici che consentivano un orientamento identificativo preliminare. Di seguito sono dettagliati alcuni esempi:

- *E. coli* produce tipicamente colonie lattosio-fermentanti di colore rosa-rosso su agar MacConkey, talvolta circondate da un alone di precipitazione dei sali biliari dovuto all'intensa fermentazione del lattosio.
- *P. mirabilis* manifesta il caratteristico fenomeno dello sciamaggio (*swarming*), dovuto alla differenziazione delle cellule in forme altamente mobili che migrano concentricamente sulla superficie dei terreni non selettivi, come l'agar sangue.
- *S. aureus* cresce sul terreno Mannitol Salt Agar formando colonie gialle con viraggio del terreno al giallo, conseguenza della fermentazione del mannitolo. Sull'agar sangue produce generalmente colonie associate a β-emolisi.
- I CoNS crescono sul Mannitol Salt Agar formando generalmente colonie rosa e non fermentano il mannitolo; il terreno pertanto mantiene il colore rosso-rosato, consentendo la distinzione da *S. aureus*.
- *K. pneumoniae* cresce generalmente su MacConkey agar formando colonie rosa, lisce e marcatamente mucoidi, grazie all'abbondante produzione della capsula polisaccaridica (*Figura 12-13*).



Figura 12. Crescita di S. aureus (A) e S. epidermidis (B) su terreno Mannitol Salt Agar. S. aureus fermenta il mannitolo determinando il viraggio del terreno al giallo, mentre S. epidermidis non fermenta il mannitolo e mantiene inalterata la colorazione del terreno. (piastre seminate e interpretate nel periodo di internato di tesi).



Figura 13. Piastra di Agar Sangue con crescita di due batteri diversi nello stesso campione. Si possono distinguere: 1.Colonie piccole e grigie con un alone di α-emolisi (emolisi parziale), identificate come Enterococcus spp*. 2.Colonie più grandi e gialle con un alone di β-emolisi (emolisi completa), identificate come S. aureus. (piastre seminate e interpretate nel periodo di internato di tesi).*

Prima di procedere con i sistemi automatizzati di identificazione, sono stati eseguiti alcuni test biochimici rapidi direttamente sulle colonie isolate, utili per orientare precocemente l'identificazione del microrganismo:

- Test della catalasi: ha consentito di distinguere gli stafilococchi (catalasi-positivi) dagli streptococchi e dagli enterococchi (catalasi-negativi).
- Test della coagulasi: ha permesso di identificare rapidamente *S. aureus*, coagulasi-positivo, distinguendolo dagli CoNS.

- Test dell'ossidasi: è stato impiegato per l'orientamento preliminare dei bacilli Gram-negativi non fermentanti:
    - ossidasi-positivi: ad esempio *P. aeruginosa*;
    - ossidasi-negativi: ad esempio *Acinetobacter* spp.

3.9. Metodo di identificazione microbica e antibiogramma per la valutazione della sensibilità agli antibiotici

Dopo la lettura delle piastre colturali e l'interpretazione preliminare dei risultati, i microrganismi isolati sono stati sottoposti a identificazione di specie e determinazione della suscettibilità agli antimicrobici mediante il sistema automatizzato MicroScan WalkAway Plus (Beckman Coulter, USA). Tale piattaforma ha consentito l'esecuzione simultanea dei test di identificazione (ID) e antibiogramma (AST), garantendo elevati livelli di accuratezza (fino al 99%) e un'elevata standardizzazione delle analisi microbiologiche. La preparazione dell'inoculo batterico è stata effettuata utilizzando il sistema Prompt D, impiegato per ottenere una sospensione standardizzata con torbidità pari a 0,5 McFarland (circa $1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Il dispositivo è costituito da un puntale sterile in polipropilene dotato di collare rimovibile e da un flacone contenente 30 mL di diluente pronto all'uso. La preparazione della sospensione batterica è stata eseguita secondo le seguenti fasi (*Figura 14*):

1. Prelievo di tre colonie isolate da coltura pura mediante il puntale di inoculo, mantenuto perpendicolare alla superficie dell'agar senza penetrarlo (A).
2. Rimozione del collare di sicurezza fino alla separazione dallo stelo del puntale (B/C).
3. Apertura del flacone contenente il diluente sterile (fornito dalla ditta) (D).
4. Inserimento del puntale nel flacone e chiusura mediante pressione e rotazione (E).
5. Omogeneizzazione della sospensione mediante agitazione manuale e successivo vortex, al fine di garantire il completo distacco e la dispersione delle cellule batteriche nel diluente (F).

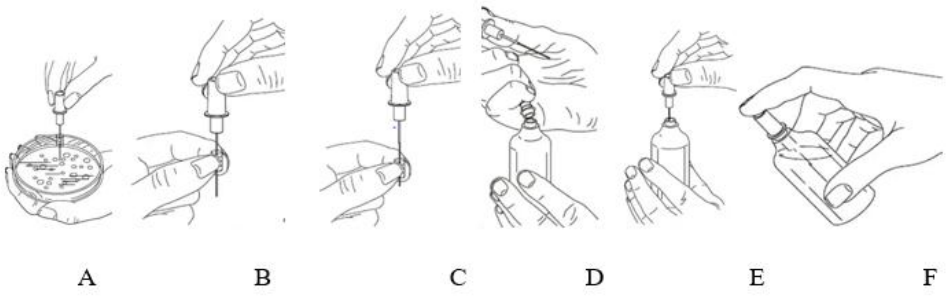

Figura 14. Fasi della preparazione sospensione batterica.

I flaconi contenenti le sospensioni standardizzate sono stati successivamente inseriti in un apposito rotore, posizionando il codice a barre verso l'esterno in modo da consentirne la corretta lettura da parte del sistema laser. Nella parte superiore del rotore sono stati inoltre collocati i puntali necessari per la fase di inoculo. Successivamente, il rotore con i pannelli destinati all'identificazione e all'antibiogramma, preventivamente etichettati, sono stati introdotti nel sistema automatizzato di inoculazione SH-2000. Dopo la lettura dei codici a barre associati ai campioni e ai pannelli, lo strumento ha provveduto automaticamente all'abbinamento dei campioni e alla distribuzione di 115 µL di sospensione batterica nei pozzetti contenenti substrati biochimici e antibiotici disidratati (*Figura 15*).



Figura 15. Rappresentazione dei flaconi nel rotore, del sistema automatizzato di inoculazione SH-2000 e del sistema Microscan WalkAway.

Al termine dell'inoculo, i pannelli sono stati sigillati mediante apposito coperchio e trasferiti nel sistema MicroScan WalkAway Plus, prestando attenzione a non toccare il fondo dei pozzetti per evitare interferenze ottiche e possibili risultati falsamente positivi. I pannelli inoculati sono stati quindi incubati automaticamente per un periodo compreso tra 16 e 20 ore. I pannelli utilizzati sono stati selezionati in base alle caratteristiche microbiologiche degli isolati e alle esigenze diagnostiche. In particolare, sono stati impiegati i pannelli *(Figura 16)*:

- NEG COMBO 99: per l'identificazione e l'antibiogramma dei batteri Gram-negativi (da campioni non urinari).
- POS COMBO 49: per i batteri Gram-positivi (stafilococchi ed enterococchi).
- POS COMBO 6: è stato utilizzato in associazione al pannello POS COMBO 49 quando, in seguito alla lettura delle piastre di coltura, era stato isolato uno streptococco. In questo contesto, il POS COMBO 49 è stato impiegato per l'identificazione del microrganismo, mentre il POS COMBO 6, contenendo antibiotici specificamente selezionati per gli streptococchi, è stato utilizzato per l'esecuzione dell'antibiogramma.

- NEG MDR COMBO 100: per la valutazione della suscettibilità verso nuovi antibiotici β-lattamici associati a inibitori delle β-lattamasi, quali ceftazidime/avibactam e ceftolozano/tazobactam.

Ciascun pannello è costituito da 96 pozzetti contenenti substrati biochimici e concentrazioni scalari di antibiotici. Durante l'incubazione, un sistema ottico integrato ha monitorato automaticamente, a intervalli di 15 minuti, le variazioni colorimetriche e di torbidità dei pozzetti. Le reazioni biochimiche osservate sono state confrontate con quelle presenti nel database dello strumento, consentendo l'identificazione del microrganismo e l'attribuzione di una probabilità di identificazione espressa in percentuale. Nella parte superiore sinistra di ogni pannello sono presenti due pozzetti di controllo: il pozzetto "C" (controllo negativo) e il pozzetto "G" (controllo positivo). Prima di procedere all'analisi completa del pannello, lo strumento ha verificato automaticamente la correttezza di tali controlli, qualora i parametri non risultino conformi, la lettura viene interrotta.

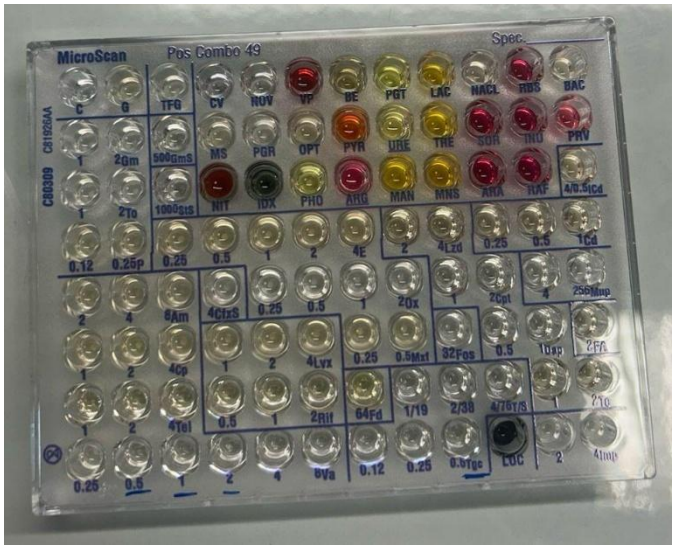

Figura 16. Piastra multipozzetto del sistema automatizzato MicroScan per Gram-positivi (pannello 49). Nella sezione superiore sono visibili i test biochimici enzimatici e di fermentazione (identificazione di specie tramite viraggio di colore), mentre nella sezione inferiore sono disposti i pozzetti per la determinazione della MIC dei singoli antibiotici (valutata tramite torbidità).

Parallelamente, all'analisi della crescita batterica nei pozzetti contenenti antibiotici, lo strumento permetteva la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC). L'interpretazione dei valori di MIC è stata effettuata secondo i breakpoint definiti dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), che classificano gli isolati nelle categorie:

- Sensibile (S): alta probabilità di successo terapeutico utilizzando un dosaggio standard;

- Sensibile con aumento dell'esposizione (I): la probabilità di successo terapeutico aumenta all'aumentare dell'esposizione dell'antibiotico;
- Resistente (R): alta probabilità di fallimento terapeutico anche con maggiore esposizione all'antibiotico.

La combinazione dei test di identificazione (ID) e di suscettibilità antimicrobica (AST), basati rispettivamente sull'analisi delle caratteristiche metaboliche e della crescita del microrganismo, ha consentito di ottenere una valutazione accurata del profilo di sensibilità antibiotica degli isolati.

Il sistema MicroScan WalkAway Plus è stato inoltre in grado di evidenziare i principali fenotipi di resistenza antimicrobica mediante algoritmi interpretativi basati sui criteri EUCAST. Tra questi rientrano i seguenti:

- La produzione di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL), identificata mediante il confronto delle MIC delle cefalosporine (ceftazidime e cefotaxime) testate da sole e in associazione con acido clavulanico, venendo confermata da una diminuzione di 3 diluizioni nella MIC dell'antibiotico combinato con acido clavulanico rispetto a quello testato da solo.
- La resistenza alla meticillina negli stafilococchi (MRSA), individuata testando la sua resistenza alla oxacillina e ad altri beta-lattamici e mediante il test di screening con cefoxitina.
- La resistenza alla vancomicina negli enterococchi (VRE) in relazione ai valori di MIC della vancomicina.

Al termine dell'incubazione, generalmente dopo circa 16 ore, le reazioni biochimiche erano state convertite in un codice numerico denominato Biocode, che era stato confrontato con quelli presenti nel database dello strumento per determinare genere e specie del microrganismo isolato. Contestualmente è stata fornita una percentuale di probabilità dell'identificazione: valori compresi tra il 96% e il 99,9% indicavano un'identificazione ottimale, mentre percentuali pari o superiori all'80% erano considerate accettabili. Valori inferiori rendevano invece l'identificazione non affidabile, richiedendo la ripetizione dell'intero processo analitico.

Uno dei principali vantaggi del sistema è l'elevato livello di automazione. Dopo l'inserimento dei pannelli inoculati, lo strumento gestisce autonomamente:

- L'incubazione;
- La lettura dei pannelli;
- L'interpretazione dei risultati e la segnalazione di eventuali risultati critici o atipici.

Nonostante ciò, rimane fondamentale la valutazione critica del microbiologo per l'identificazione di eventuali anomalie o meccanismi di resistenza non completamente espressi.

Il sistema è supportato dal software LabPro Information Manager, che consente la gestione, l'archiviazione e la validazione dei risultati, oltre all'integrazione con i sistemi informatici di laboratorio (LIS), favorendo una comunicazione rapida ed efficiente dei risultati analitici.

Il software ha permesso inoltre la segnalazione automatica di microrganismi multiresistenti agli antibiotici e l'analisi epidemiologica dei dati, contribuendo alle attività di sorveglianza e controllo delle infezioni correlate all'assistenza.

3.10. Antibiogramma da colonia giovane

Per ridurre i tempi di refertazione dell'antibiogramma e fornire indicazioni utili al clinico per modificare o confermare la terapia antibiotica empirica in atto, è stato utilizzato il sistema short-term incubation che consiste nell'allestimento dell'antibiogramma, seguendo la procedura precedentemente descritta, utilizzando le colonie cresciute dopo una breve incubazione (circa 4/6 ore) sui terreni solidi in cui è stato subcoltivato il terreno dell'emocoltura positiva. Per i microrganismi Gram-negativi le colonie sono state prelevate dalla piastra MacConkey agar, invece in presenza di batteri Gram-positivi il prelievo è stato effettuato dal terreno agar sangue.

3.11. Determinazione dei meccanismi di resistenza agli antibiotici

Gli isolati appartenenti al gruppo di *Enterobacterales* e alla specie *P. aeruginosa* che presentavano fenotipi di resistenza compatibili con la produzione di β-lattamasi sono stati sottoposti alla valutazione dei principali meccanismi di resistenza.

3.11.1. Determinazione della produzione di ESBL

Alcuni componenti della famiglia delle *Enterobacterales*, come *K. pneumoniae* ed *E. coli*, producono β-lattamasi a spettro esteso in grado di idrolizzare le cefalosporine (ceftazidime, cefotaxime e cefepime) e aztreonam.

La produzione di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL) è stata inizialmente valutata dal sistema automatico MicroScan WalkAway Plus, come descritto precedentemente. Il sistema identifica il fenotipo ESBL mediante il confronto tra i valori di MIC delle cefalosporine testate singolarmente e quelli ottenuti in presenza di acido clavulanico, considerando significativa una riduzione della MIC di almeno tre diluizioni.

Tuttavia, in alcuni casi il sistema automatico non è in grado di confermare il fenotipo ESBL, ad esempio quando la crescita batterica determina valori di MIC elevati sia per le cefalosporine sia per le rispettive combinazioni con acido clavulanico, impedendo di evidenziare il salto di 3 volte la MIC. In tali circostanze, la presenza di β-lattamasi ESBL appartenenti alla famiglia CTX-M è stata valutata mediante il test immunocromatografico rapido a flusso laterale NG-Test® CTX-M Multi (*Figura 17*), che è un saggio qualitativo in grado di rilevare le β-lattamasi della famiglia CTX-M prodotte dagli *Enterobacterales*.

La preparazione del campione ha previsto le seguenti fasi:

1. aggiunta di cinque gocce del tampone di estrazione fornito nel kit in una provetta Eppendorf;
2. prelievo, mediante ansa sterile da 1 µL, di tre colonie isolate ottenute da coltura pura su terreno agarizzato e sospensione del materiale batterico nel tampone di estrazione;
3. chiusura della provetta e omogeneizzazione del campione mediante vortex;
4. estrazione del dispositivo NG-Test® CTX-M dalla confezione protettiva;
5. prelievo di 100 µL della sospensione mediante pipetta Pasteur e deposizione del campione nel pozzetto S (Sample) del dispositivo;
6. incubazione a temperatura ambiente e lettura del risultato dopo 15 minuti.

Il test si basa su una metodica immunocromatografica a flusso laterale. Il campione migra per capillarità lungo una membrana di nitrocellulosa e, in presenza di enzimi CTX-M, questi vengono riconosciuti da anticorpi monoclonali specifici immobilizzati nella regione di test (T). La corretta migrazione del campione è stata verificata dalla comparsa della linea di controllo (C).

L'interpretazione dei risultati è stata effettuata secondo i seguenti criteri:

- Risultato positivo: comparsa di due bande rosse, una nella regione di test (T) e una nella regione di controllo (C), indicativa della presenza di β-lattamasi CTX-M;
- Risultato negativo: comparsa della sola banda di controllo (C), indicativa dell'assenza delle β-lattamasi CTX-M ricercate;
- Test non valido: assenza della banda di controllo (C), indipendentemente dalla presenza della banda di test; in questo caso il test è stato ripetuto.

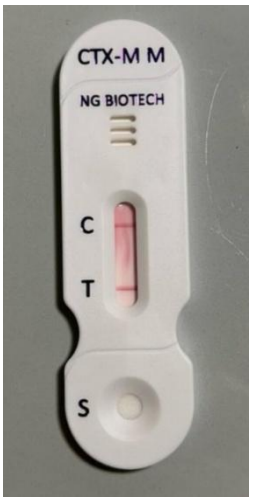

Figura 17. Risultato positivo del test immunocromatografico NG-Test® CTX-M.

3.11.2. Caratterizzazione delle carbapenemasi

Quando dall'interpretazione dell'antibiogramma eseguita dal sistema automatico MicroScan WalkAway Plus era emerso un profilo caratterizzato da ridotta sensibilità o resistenza ai carbapenemi, associato a resistenza alle cefalosporine di terza generazione, l'isolato era stato considerato sospetto produttore di carbapenemasi. Tale sospetto richiedeva una conferma mediante test specifici per la rilevazione delle carbapenemasi.

Per la conferma e la caratterizzazione delle carbapenemasi è stato utilizzato il test immunocromatografico rapido a flusso laterale NG-Test® CARBA-5 (*Figura 18*), in grado di rilevare qualitativamente le principali carbapenemasi di rilevanza clinica appartenenti alle famiglie KPC, OXA-48-like, NDM, VIM e IMP. Il test è stato applicato agli isolati appartenenti agli *Enterobacterales* e a *P. aeruginosa* che presentavano ridotta sensibilità o resistenza ai carbapenemi.

Il principio del test è basato su una metodica immunocromatografica a flusso laterale analoga a quella descritta per NG-Test® CTX-M Multi. La membrana di nitrocellulosa contiene anticorpi monoclonali specifici per ciascuna carbapenemasi ricercata, consentendo il riconoscimento selettivo degli enzimi presenti nel campione.

L'analisi è stata eseguita mediante preparazione di una sospensione batterica a partire da una coltura pura e successiva applicazione del campione nel dispositivo dopo estrazione mediante il tampone fornito dal kit. Il risultato è stato interpretato dopo 15 minuti di incubazione a temperatura ambiente:

- Risultato positivo: comparsa della banda di controllo (C) e di una o più bande nelle specifiche regioni di test, indicativa della presenza della corrispondente carbapenemasi;
- Risultato negativo: comparsa della sola banda di controllo (C), indicativa dell'assenza delle carbapenemasi ricercate;
- Test non valido: assenza della banda di controllo (C), condizione che richiede la ripetizione dell'analisi.



Figura 18. NG-Test® CARBA-5. C, controllo; K, KPC; O, OXA-48-like; V, VIM; I, IMP; N, NDM; S, pozzetto del campione. La presenza della sola banda di controllo indica un test negativo.

3.12. Identificazione dei miceti

In caso di sospetto clinico di micosi sistemica, l'iter diagnostico prevedeva due indagini principali: l'identificazione del microrganismo mediante API test e l'esecuzione dell'antimicogramma per la valutazione della sensibilità agli antifungini.

L'API test, in particolare l'API 20 C AUX, è un sistema di identificazione biochimica utilizzato per l'identificazione di lieviti, basato sulla loro capacità di assimilare differenti carboidrati. Ogni specie possiede infatti un proprio profilo metabolico caratteristico, che la distingue dalle altre in base agli zuccheri utilizzati come fonte di carbonio.

Il sistema è costituito da una galleria contenente 20 microcupole (pozzetti) con substrati differenti, prevalentemente carboidrati. Dopo l'inoculo della sospensione fungina, è stata valutata la capacità di crescita nei singoli pozzetti, che rifletteva l'utilizzo del substrato specifico.

La procedura analitica si è articolata nei seguenti passaggi:

1. Prelievo di una colonia mediante ansa sterile. È stato fondamentale operare su una coltura pura, poiché la presenza di specie miste avrebbe potuti compromettere l'accuratezza del risultato.
2. Sospensione della colonia in soluzione fisiologica e standardizzazione della torbidità mediante turbidimetro fino a raggiungere il valore di 2 McFarland.
3. Aggiunta di 100 µL della sospensione nel terreno fornito dalla ditta.
4. Inserimento di acqua distillata sul fondo della vaschetta incubatrice, evitando il contatto con i pozzetti, al fine di mantenere un'elevata umidità, prevenire l'evaporazione e garantire una crescita ottimale del lievito.
5. Posizionamento della galleria nella vaschetta di incubazione;
6. Distribuzione della sospensione nei pozzetti fino alla formazione delle relative cupole;
7. Chiusura della vaschetta con coperchio;
8. Incubazione a 37°C per 24 ore.

Dopo l'incubazione si è proceduto alla lettura dei risultati, basata sull'osservazione della crescita fungina. La crescita si è manifestata come torbidità del pozzetto, mentre l'assenza di crescita manteneva il pozzetto limpido. Ogni pozzetto è stato confrontato con il relativo controllo interno per distinguere correttamente le reazioni positive (crescita) da quelle negative (assenza di crescita).

Per l'interpretazione dei risultati, i pozzetti sono stati analizzati in gruppi di tre. A ciascun pozzetto del gruppo è stato attribuito un valore numerico (1, 2 o 4) in caso di positività, mentre è stato assegnato valore 0 in caso di negatività. La somma dei valori all'interno di ciascuna tripletta ha generato un codice numerico. Ripetendo il procedimento per tutti i gruppi si è ottenuto un profilo numerico complessivo, caratteristico della specie identificata. Il codice ottenuto è stato successivamente

inserito in un software dedicato, che ha elaborato i dati e ha restituito l'identificazione della specie con relativa percentuale di affidabilità.

3.13. Antimicogramma

Successivamente all'identificazione, si è eseguito l'antimicogramma *(Figura 19)*, che ha consentito di valutare la sensibilità dei lieviti agli antifungini e di individuare la terapia più efficace. Il test è stato eseguito mediante una card contenente pozzetti con diversi antimicotici liofilizzati, disposti a concentrazioni crescenti. La crescita del microrganismo è stata evidenziata da un viraggio cromatico del pozzetto da blu a rosa.

La procedura ha previsto i seguenti passaggi:

1. Prelievo di una colonia isolata e sua risospensione in acqua sterile;
2. Standardizzazione della sospensione a 0,5 McFarland mediante turbidimetro;
3. Aggiunta di 20 µL della sospensione in un terreno di arricchimento fornito dal produttore;
4. Distribuzione di 100 µL della sospensione in ciascun pozzetto della card tramite pipetta multicanale a 8 puntali, al fine di ottimizzare i tempi;
5. Incubazione a 37°C per 24 ore.

Prima della lettura definitiva è stato effettuato un controllo di qualità della sospensione, seminando per confluenza un campione (10 µL) su agar Sabouraud e incubandolo a 37°C per 24 ore. La presenza di circa 10–80 colonie ha indicato un controllo valido. Eventuali discrepanze tra controllo e card davano un risultato interpretabile con cautela che richiedeva la ripetizione del test.

La determinazione della sensibilità si è basata sull'osservazione del viraggio di colore: i pozzetti in cui avveniva crescita viravano da blu-viola a rosa. Per ciascun antimicotico è stata identificata la prima concentrazione in cui non si osservava crescita, corrispondente alla MIC (Minimum Inhibitory Concentration). Le MIC ottenute venivano confrontate con i breakpoint definiti dal CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), specifici per ciascuna specie di *Candida*, al fine di classificare il microrganismo come sensibile (S) o resistente (R).

I risultati sono stati registrati su appositi moduli cartacei e successivamente inseriti nel software gestionale BASE, utilizzato per l'acquisizione e l'interpretazione dei dati microbiologici.



Figura 19. Piastra a 96 pozzetti per antimicogramma. Il viraggio cromatografico dal blu-viola (inibizione del microrganismo) al rosa (crescita fungina) permette la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) dei diversi agenti antifungini testati.

4. Risultati e Discussione

4.1. Premessa

L'internato di tesi è stato condotto presso il laboratorio di Microbiologia clinica dell'IRCCS Maugeri-Pavia nel periodo 1° settembre 2025-28 febbraio 2026. Questo laboratorio è dotato di moderne tecnologie per la diagnostica microbiologica, inclusi sistemi automatizzati per emocolture. Lo studio ha carattere retrospettivo e osservazionale, analizzando tutte le emocolture pervenute durante il periodo di permanenza e i dati disponibili nel software del laboratorio al fine di effettuare un confronto dei risultati dell'ultimo quinquennio.

Al fine di confrontare la distribuzione dei patogeni identificati durante il periodo di studio con quella osservata negli anni precedenti, è stata condotta un'analisi retrospettiva dei dati relativi ai corrispondenti intervalli temporali (1° settembre-28 febbraio) dei trienni 2021–2022, 2022–2023 e 2023–2024.

Sono stati inclusi tutti i campioni di emocoltura raccolti da pazienti ricoverati con sospetto di infezione del torrente ematico. Per l'analisi microbiologica sono stati esclusi gli isolati duplicati, considerando unicamente il primo isolamento per ciascun paziente. Gli isolati successivi recuperati entro 7 giorni, appartenenti alla stessa specie microbica e caratterizzati da un antibiogramma invariato rispetto al primo isolamento, sono stati considerati riferibili al medesimo episodio infettivo e pertanto non inclusi nelle elaborazioni statistiche. Si precisa che, nel corso dell'internato, ho preso parte alle attività diagnostiche routinarie del laboratorio, contribuendo al processamento delle emocolture insieme al personale dedicato. L'analisi riportata in questa tesi ha tuttavia riguardato l'intero set di dati disponibile nel periodo di studio e comprende quindi anche campioni e risultati ottenuti nell'ambito dell'attività ordinaria del laboratorio.

4.2. Distribuzione delle emocolture processate

Durante il periodo oggetto di studio dai reparti dell'IRCCS Maugeri (Istituto Pavia e Istituto Milano-Camaldoli) sono state inviate al laboratorio di Microbiologia N. 5944 emocolture così distribuite (*Tabella 1*, *Grafico 1*).

Tabella 1. Numero totale di emocolture pervenute al laboratorio nei periodi di studio (settembre 2021-febbraio 2026).

Periodo	N. emocolture inviate
settembre 21-febbraio 22	1020
settembre 22-febbraio 23	946
settembre 23-febbraio 24	1143
settembre 24-febbraio 25	1273
settembre 25-febbraio 26	1562
Totale:	5944

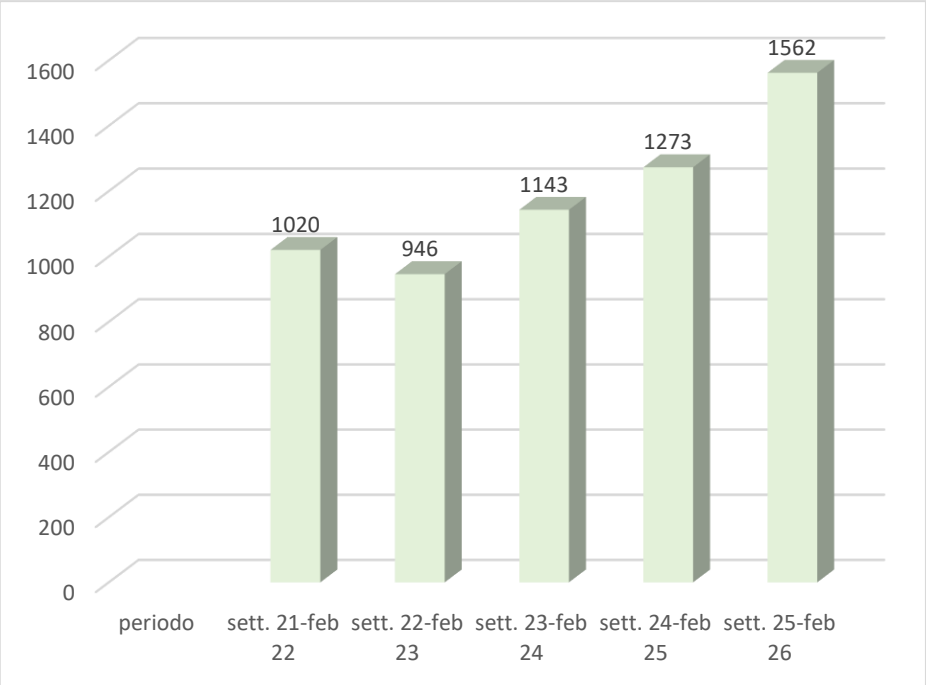

Grafico 1. Distribuzione del numero di emocolture pervenute al laboratorio nei diversi periodi di studio (settembre 2021-febbraio 2026).

La Tabella 2 mostra un confronto tra i periodi osservati ripotando sia la variazione assoluta sia la variazione in percentuale.

Tabella 2. Variazione del numero di emocolture rispetto al semestre dell'anno precedente.

Periodo	Variazione assoluta	Variazione %
2022–2023 vs 2021–2022	-74	-7,3%
2023–2024 vs 2022–2023	+197	+20,8%
2024–2025 vs 2023–2024	+130	+11,4%
2025–2026 vs 2024–2025	+289	+22,7%

L'incremento complessivo tra il primo e l'ultimo periodo considerato è stato:

- ✓ Incremento assoluto: +542 emocolture;
- ✓ Incremento percentuale: +53.1%.

Nell'arco del periodo osservato il numero di emocolture inviate era notevolmente incrementato rispetto al primo periodo, dopo una lieve diminuzione nel semestre 2022-2023 (-7,3%), raggiungendo il valore massimo nel semestre 2025-2026 (+22,7%). L'ultimo semestre evidenzia il valore massimo di tutto il periodo considerato, con N.1.562 emocolture inviate.

In Tabella 3 e Grafico 2 è stata riportata la distribuzione negli anni (semestri considerati) del numero di pazienti sottoposti ad indagine colturale per sospetto batteriemia.

Tabella 3. Distribuzione del numero di pazienti sottoposti ad emocoltura nei periodi considerati.

Periodo	N. pazienti
settembre 21-febbraio 22	374
settembre 22-febbraio 23	363
settembre 23-febbraio 24	421
settembre 24-febbraio 25	465
settembre 25-febbraio 26	562
Totale:	2185

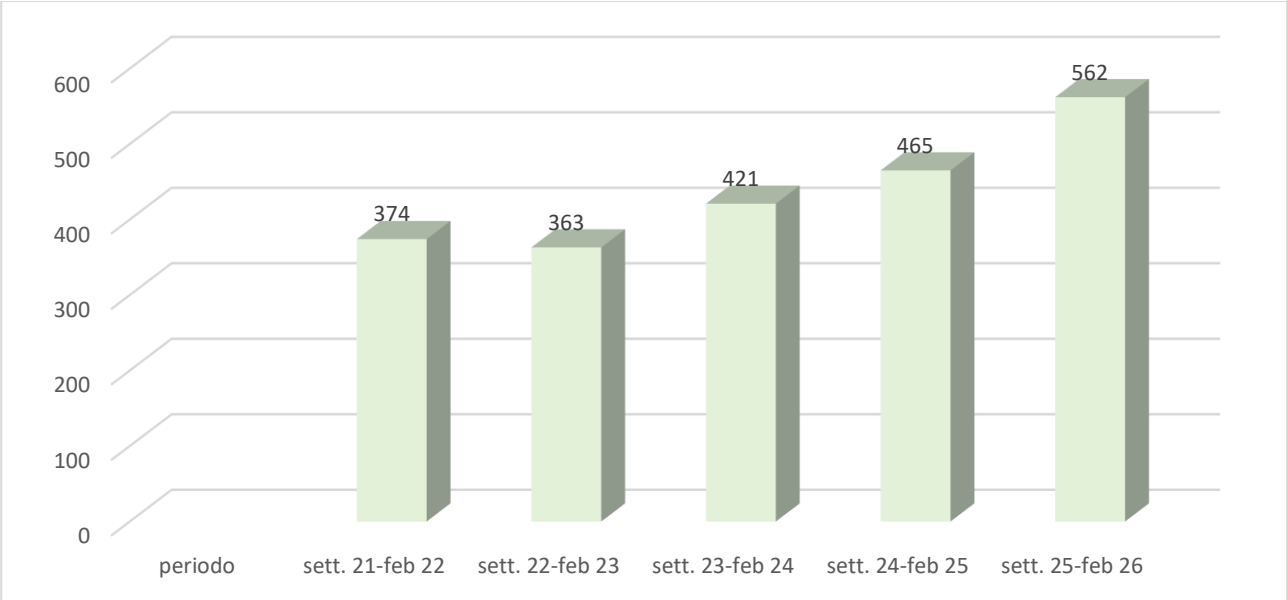

Grafico 2. Rappresentazione del numero dei pazienti sottoposto ad emocoltura nell'arco degli anni.

Complessivamente, nel periodo indicato, sono stati sottoposti a indagine colturale per sospetta batteriemia N. 2.185 pazienti. La distribuzione dei pazienti nei diversi periodi di osservazione evidenzia un andamento analogo a quello riscontrato per il numero di emocolture processate. Dopo una lieve riduzione nel periodo settembre 2022-febbraio 2023 (N= 363) rispetto al periodo precedente (N= 374), il numero di pazienti è progressivamente aumentato negli anni successivi, raggiungendo N. 421 nel periodo settembre 2023-febbraio 2024, N. 465 nel periodo settembre 2024-febbraio 2025 e il valore massimo di N. 562 pazienti nel periodo settembre 2025-febbraio 2026.

Infatti, dall'analisi dei dati riportati in Tabella 4 si deduce che l'incremento complessivo, dal primo all'ultimo periodo osservato, dei pazienti esaminati è pari a +50,3%, aumento correlato ad una migliore appropriatezza della richiesta e alla condivisione di protocolli recepiti con i reparti, il laboratorio di Microbiologia e l'infettivologo (*Tabella 4*).

Tabella 4. Variazione percentuale del numero di pazienti sottoposti a emocoltura nei periodi di studio.

Confronto	**Variazione %**
2021-2022 → 2022-2023	-2,9%
2022-2023 → 2023-2024	+16,0%
2023-2024 → 2024-2025	+10,5%
2024-2025 → 2025-2026	+20,9%
Incremento totale dei pazienti esaminati:	+50.3%

Questo trend crescente potrebbe riflettere una maggiore attenzione clinica verso la diagnosi microbiologica delle infezioni sistemiche, nonché una possibile implementazione delle procedure di sorveglianza e dei protocolli diagnostici all'interno della struttura sanitaria considerata. Inoltre, l'aumento delle richieste potrebbe essere correlato a una maggiore sensibilizzazione del personale sanitario riguardo all'importanza dell'identificazione precoce degli episodi di batteriemia e sepsi. Tuttavia, il progressivo incremento del numero di emocolture non può essere interpretato unicamente come indicatore di un aumento dell'incidenza delle infezioni ematiche, poiché potrebbe essere influenzato anche da fattori organizzativi, dall'incremento dell'attività assistenziale o da modifiche nei criteri di prescrizione degli esami microbiologici. Per una valutazione più accurata, è pertanto necessario integrare questi dati con l'analisi dei tassi di positività delle emocolture, della distribuzione dei principali microrganismi isolati e delle loro caratteristiche microbiologiche, così da distinguere un effettivo aumento delle infezioni da una maggiore attività diagnostica e ottenere una visione più completa dell'evoluzione epidemiologica nel periodo studiato.

4.3. Emocolture solitarie

Per quanto riguarda le modalità di prelievo, nella maggior parte dei pazienti sono stati raccolti tre set di emocolture. In particolare, su N. 2.185 pazienti complessivamente sottoposti a indagine colturale, N. 1.896 (86,8%) sono stati sottoposti al prelievo di tre set di flaconi, intendendo per set una coppia costituita da un flacone per microrganismi aerobi e uno per microrganismi anaerobi. Al contrario, N. 289 pazienti (13,2%) presentavano un unico set di emocolture (emocoltura solitaria). Tra le problematiche più frequentemente osservate nella pratica clinica vi è l'esecuzione di "emocolture solitarie", definite come il prelievo di un singolo set emocolturale anziché dei 2/3 set raccomandati dalle linee guida internazionali [83]. Tale pratica limita significativamente la sensibilità diagnostica dell'esame e rende difficile distinguere una reale batteriemia da una contaminazione del campione. Abbiamo concentrato il nostro interesse verso le emocolture solitarie (ES) perché queste rappresentano un indicatore della qualità preanalitica del processo diagnostico sottolineando eventuali criticità organizzative e/o procedurali all'interno della struttura. L'analisi della distribuzione delle emocolture solitarie (ES) nei periodi considerati ha evidenziato una sostanziale stabilità del numero assoluto dei casi nel corso degli anni (*Tabella 5*). In particolare, sono state registrate N. 51 emocolture solitarie nel periodo settembre 2021-febbraio 2022, N. 57 nel periodo settembre 2022-febbraio 2023, N. 60 nel periodo settembre 2023-febbraio 2024, N. 60 nel periodo settembre 2024-febbraio 2025 e N. 61 nel periodo settembre 2025-febbraio 2026. Pur osservandosi un lieve incremento numerico rispetto al primo periodo di osservazione, il numero di emocolture solitarie si è mantenuto complessivamente stabile compreso tra 51 e 61 casi nei cinque semestri analizzati. Poiché le emocolture solitarie identificano i pazienti nei quali è stato eseguito un unico prelievo emocolturale,

la loro frequenza è stata rapportata sia al numero totale dei pazienti sottoposti a indagine colturale sia al numero complessivo di emocolture processate. Il numero assoluto di emocolture solitarie è rimasto sostanzialmente stabile durante il periodo di osservazione, tuttavia, rapportando tale dato all'aumento complessivo dei pazienti studiati, si è osservato una progressiva riduzione della loro incidenza, dal 13,6% nel periodo settembre 2021-febbraio 2022 al 10,9% nel periodo settembre 2025-febbraio 2026. Analogamente, la distribuzione di emocolture solitarie sul totale delle emocolture eseguite si è ridotta dal 5,0% al 3,9% superando leggermente il valore soglia raccomandato dalla letteratura [84] (*Grafico 3*).

Tabella 5. Numero di pazienti sottoposti a esame emocolturale nel periodo di studio.
Sono stati inclusi dati sul numero totale di emocolture eseguite, includendo le emocolture solitarie.

Periodo	Pazienti	Emocolture totali	Emocolture solitarie e %	% pazienti con emocoltura solitaria
settembre 2021 – febbraio 2022	374	1020	51 (5,0%)	**13,6%**
settembre 2022 – febbraio 2023	363	946	57 (6,0%)	**15,7%**
settembre 2023 – febbraio 2024	421	1143	60 (5,2%)	**14,3%**
settembre 2024 – febbraio 2025	465	1273	60 (4,7%)	**12,9%**
settembre 2025 – febbraio 2026	562	1562	61 (3,9%)	**10,9%**

Escludendo le emocolture solitarie, la quota di emocolture ottenute nell'ambito di set multipli è risultata costantemente elevata durante tutto il periodo di osservazione, variando dal 94,0% al 96,1% (*Tabella 6*). In particolare, si è osservato un progressivo incremento della percentuale di campioni non solitari negli ultimi anni, fino a raggiungere il 96,1% nel periodo settembre 2025-febbraio 2026.

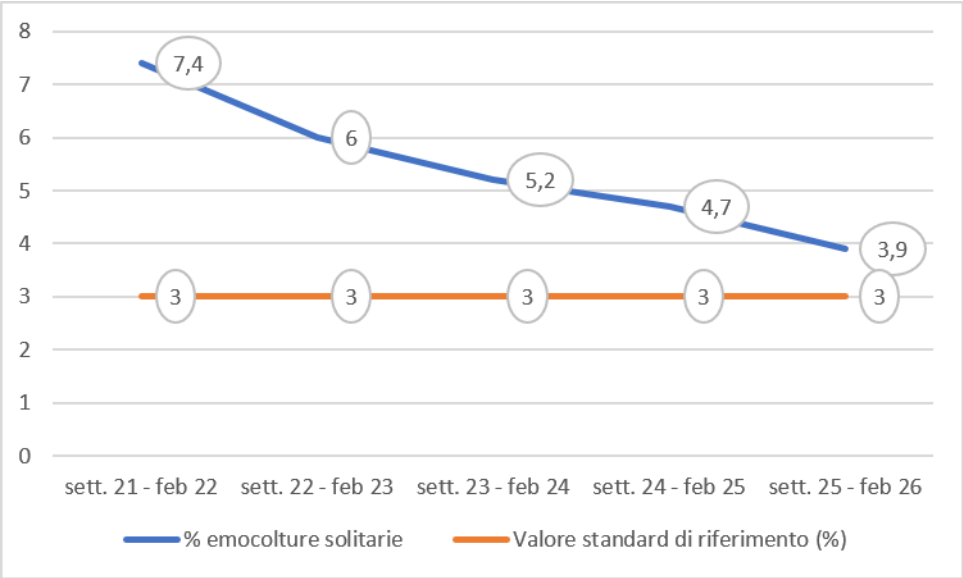

Grafico 3. Confronto tra la percentuale di emocolture solitarie rilevata nei diversi periodi di studio e il valore standard massimo raccomandato (3%).

Tabella 6. Distribuzione delle emocolture totali, solitarie e non solitarie nei periodi considerati.

Periodo	Emocolture totali	Solitarie	Non solitarie	% non solitarie
settembre 21 – febbraio 22	1020	51	969	**95,0%**
settembre 22 – febbraio 23	946	57	889	**94,0%**
settembre 23 – febbraio 24	1143	60	1083	**94,8%**
settembre 24 – febbraio 25	1273	60	1213	**95,3%**
settembre 25 – febbraio 26	1562	61	1501	**96,1%**

Sebbene il numero assoluto di emocolture solitarie sia rimasto sostanzialmente stabile, la loro frequenza relativa si è ridotta, mentre è aumentata la quota di campioni raccolti mediante set emocolturali multipli. Considerando il contemporaneo incremento dell'attività diagnostica, questo andamento suggerisce una maggiore adesione alle raccomandazioni internazionali e un miglioramento delle modalità di campionamento. Nel complesso, i risultati indicano non solo un

aumento dell'utilizzo delle emocolture, ma anche una crescita dell'appropriatezza prescrittiva e della qualità diagnostica, in linea con gli standard di buona pratica clinica e microbiologica.

4.4. Distribuzione per età e sesso

Nel periodo dell'Internato di Tesi, abbiamo anche analizzato la distribuzione dei soggetti sottoposti ad emocoltura per fascia d'età e sesso, calcolato l'età media per donne e uomini e confrontato le due popolazioni in termini demografici (*Tabella 7*).

Tabella 7. Numero pazienti sottoposti ad emocoltura nel periodo 2025-26 suddivisi per età e genere.

Fascia d'età	Femmine (F)	Maschi (M)	Totale
15–29	1	3	4
30–44	1	2	3
45–59	10	20	30
60–74	102	133	235
75–89	82	200	282
>90	4	5	9
Totale:	**200**	**363**	**563**

Per stimare l'età media è stato dapprima calcolato il punto medio delle fasce d'età dei pazienti, come di seguito indicato:

- 15–29 → 22;
- 30–44 → 37;
- 45–59 → 52;
- 60–74 → 67;
- 75–89 → 82;
- 90 → 95 (approssimazione).

Dall'analisi dei dati esposti si evince che l'età media per sesso è stata la seguente:

- ✓ Età media donne ≈ 72,7 anni;
- ✓ Età media uomini ≈ 74,3 anni.

La distribuzione dei pazienti per sesso mostra una netta prevalenza maschile:

- Femmine: 200 soggetti (≈35,5%);
- Maschi: 363 soggetti (≈64,5%).

Il rapporto M/F è di circa 1,8:1.

Questo squilibrio non è uniforme in tutte le fasce d'età, ma si concentra soprattutto nelle fasce di età avanzata. Tuttavia, entrambi i gruppi sono fortemente concentrati nelle fasce di età avanzata, cioè nelle fasce 60-74 anni e 75-89 anni e la distribuzione è la seguente:

- Femmine: 184 su 200 (92%)
- Maschi: 333 su 363 (91,7%)

La popolazione studiata era costituita prevalentemente da soggetti anziani, con oltre il 90% dei pazienti concentrato nelle fasce di età comprese tra 60 e 89 anni, in linea con la tipologia di utenza ospedaliera analizzata. È stata inoltre osservata una marcata prevalenza del sesso maschile (64,5% vs 35,5% femminile; rapporto M/F 1,8:1). Sebbene l'età media dei due sessi fosse sostanzialmente sovrapponibile, i pazienti di sesso maschile mostravano una maggiore concentrazione nella fascia 75-89 anni, mentre quelli di sesso femminile presentavano una distribuzione più equilibrata tra le classi 60-74 e 75-89 anni.

La distribuzione osservata deve tuttavia essere interpretata alla luce delle caratteristiche della popolazione degente della struttura in cui è stato condotto lo studio. L'elevata percentuale di soggetti anziani potrebbe infatti non riflettere necessariamente una maggiore incidenza del fenomeno analizzato nelle fasce d'età avanzate, ma essere influenzata dalla composizione demografica dei pazienti ricoverati. Nelle strutture ospedaliere, infatti, i soggetti anziani rappresentano frequentemente una quota rilevante dei ricoveri a causa della maggiore presenza di patologie croniche, multimorbilità e necessità assistenziali più complesse. Pertanto, i risultati relativi a età e sesso devono essere considerati principalmente descrittivi della coorte analizzata e non necessariamente indicativi di un'associazione diretta tra tali variabili e il fenomeno oggetto di studio.

Nel complesso, i dati evidenziano una popolazione prevalentemente anziana e a maggioranza maschile, coerente con il profilo tipico dei pazienti ospedalizzati sottoposti ad approfondimenti diagnostici microbiologici, fornendo un importante contesto interpretativo per l'analisi dei successivi risultati dello studio.

4.5. Emocolture positive alla crescita microbica

La distribuzione di emocolture positive alla crescita microbica nei semestri analizzati è descritta in Tabella 8.

Tabella 8. Numero e percentuale di emocolture risultate positive alla crescita microbica nei periodi di studio.

Periodo	Numero di emocolture positive alla crescita microbica	% emocolture positive
settembre 2021-febbraio 2022	322	31.6 %
settembre 2022-febbraio 2023	292	30.9 %
settembre 2023-febbraio 2024	329	28.8 %
settembre 2024-febbraio 2025	323	25.4 %
settembre 2025-febbraio 2026	339	21.7 %

Nel complesso si è osservato una riduzione progressiva e costante nel tempo della percentuale di emocolture positive alla crescita microbica. La percentuale di positività è stata calcolata rapportando il numero di emocolture segnalate positive al numero totale di emocolture pervenute nel medesimo periodo. Come illustrato nel Grafico 4, tale percentuale mostra una progressiva diminuzione nel corso degli anni, passando dal 31,6% nel periodo settembre 2021-febbraio 2022 al 21,7% nel periodo settembre 2025-febbraio 2026 (*Grafico 4*).

La diminuzione complessiva, come si evince dal Grafico 4, tra il primo e l'ultimo semestre è pari a -9,9 punti percentuali. L'andamento, infatti, mostra una tendenza decrescente lineare, regolare e non si osservano inversioni di tendenza, ma un decremento progressivo e stabile nel tempo.

- 2021–2022: valore iniziale più alto (31,6%)
- 2022–2023: lieve calo (30,9%)
- 2023–2024: riduzione più evidente (28,8%)
- 2024–2025: ulteriore discesa (25,4%)
- 2025–2026: valore minimo (21,7%)

L’analisi ha evidenziato una riduzione costante della percentuale di emocolture positive nel periodo di studio. Tale andamento potrebbe essere attribuibile sia a una reale diminuzione delle batteriemie documentate sia al progressivo incremento dell'attività diagnostica, che ha comportato un maggior numero di pazienti sottoposti a emocoltura, inclusi soggetti con minore probabilità di infezione del torrente ematico. Di conseguenza, la riduzione del tasso di positività deve essere interpretata tenendo conto anche delle variazioni nelle pratiche diagnostiche, nei criteri prescrittivi e nelle caratteristiche della popolazione studiata.

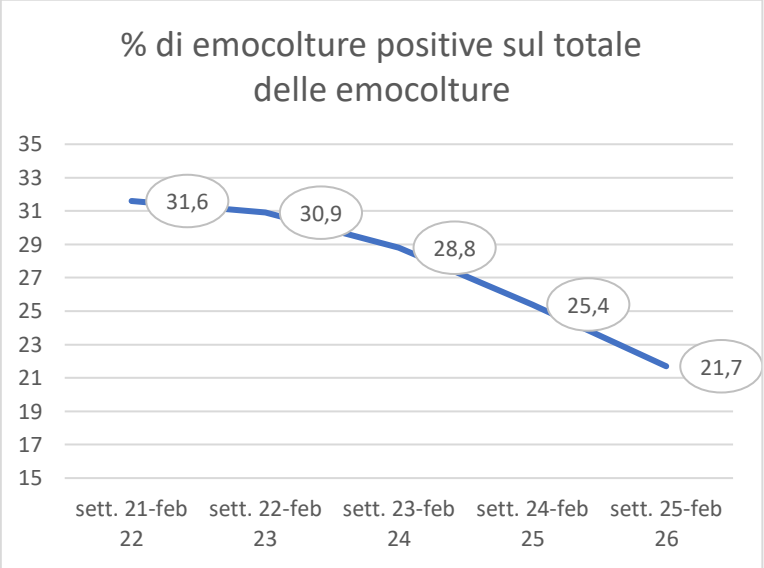

Grafico 4. Rappresentazione della percentuale di positività alla crescita microbica negli anni.

4.5.1. Analisi dei tempi di positivizzazione alla crescita microbica dei flaconi

Analizzando i risultati strumentali risulta una differenza significativa nel tempo medio di positivizzazione dei flaconi di emocolture in relazione alla tipologia di microrganismi. Tra i principali gruppi di microrganismi rilevati, per i batteri Gram-negativi si calcolano in media circa 6 ore, invece per i batteri Gram-positivi il tempo medio è di circa 10 ore. La differenza osservata è pari a circa 4 ore, con i Gram-negativi che sono stati rilevati più precocemente rispetto ai Gram-positivi (*Tabella 9).*

Tabella 9. Tempo di positivizzazione dei flaconi in ore in relazione ai diversi batteri.

	Tempo medio di positivizzazione ≈ (ore)
Batteri Gram negativi	6
Batteri Gram positivi	10

L’analisi del tempo medio di positivizzazione delle emocolture ha evidenziato una differenza significativa tra i microrganismi Gram negativi e Gram positivi, con una più rapida crescita rilevata nei primi. Questa differenza di circa 4 ore risulta clinicamente rilevante, in quanto riflette le differenti caratteristiche biologiche e cinetiche di crescita dei due gruppi batterici. I batteri Gram-negativi sono caratterizzati da una più elevata velocità replicativa, rendendo più rapida la rilevazione strumentale della loro positività. Al contrario, i Gram-positivi, pur essendo frequentemente coinvolti nelle batteriemie clinicamente significative, presentano in molti casi una crescita iniziale più lenta, che si traduce in un ritardo medio nella positivizzazione.

Inoltre, il Time to Positivity (TTP) rappresenta una componente fondamentale del Turnaround Time (TAT) microbiologico, poiché costituisce il tempo necessario affinché il sistema automatico rilevi la crescita microbica e generi l’allarme di positività.

I dati soprariportati evidenziano che:

- Le batteriemie sostenute da Gram-negativi vengono identificate mediamente entro poche ore dall'incubazione.
- Le batteriemie da Gram-positivi richiedono tempi più lunghi prima di produrre un segnale di positività.

Di conseguenza, il TAT complessivo risulta generalmente più breve per le infezioni da Gram-negativi, consentendo una comunicazione più rapida del risultato preliminare al clinico e un eventuale adeguamento tempestivo della terapia antibiotica.

La rapida positivizzazione dei Gram-negativi è particolarmente rilevante dal punto di vista clinico, poiché questi microrganismi sono frequentemente associati a quadri di sepsi severa e shock settico.

Un segnale di positività entro circa 6 ore permette:

- l'esecuzione anticipata della colorazione di Gram;
- la comunicazione tempestiva del risultato preliminare al reparto;
- l'eventuale ottimizzazione precoce della terapia antimicrobica.

Per i Gram-positivi, pur osservandosi un tempo medio di positivizzazione maggiore, il rilevamento entro circa 10 ore rimane comunque compatibile con una risposta diagnostica rapida, soprattutto nei casi in cui il laboratorio, come quello in oggetto, garantisca una gestione continuativa delle positività.

Nel complesso, il dato conferma il valore del tempo di positivizzazione come indicatore indiretto non solo della carica batterica e della tipologia del patogeno, ma anche della dinamica infettiva sottostante, assumendo un ruolo rilevante nell’interpretazione microbiologica e nella gestione clinica del paziente settico.

4.6. Esame microscopico a partire dalle emocolture positive alla crescita microbica

L'esame microscopico, preparato da tutti i flaconi segnalati positivi da BACT/ALERT deve essere considerato come test diretto preliminare presuntivo, in grado di fornire una prima importantissima informazione sulla probabile eziologia dell'infezione (bacilli Gram-negativi, cocchi Gram-positivi, miceti). La segnalazione di un flacone positivo deve essere intesa come una vera "urgenza" e come tale deve essere gestita. Per questo motivo il risultato della valutazione microscopica va comunicato nel più breve tempo possibile, al medico del reparto.

Partendo da queste premesse è stato monitorato il tempo che intercorre dal rilevamento strumentale di un flacone positivo alla crescita microbica alla comunicazione al medico di reparto dell'esito dell'esame microscopico.

Nel periodo di studio sono stati eseguiti complessivamente 680 esami microscopici su flaconi per emocoltura risultati positivi (flaconi aerobi e/o anaerobi). L'analisi dei tempi intercorrenti tra il segnale di positività del sistema di incubazione e la comunicazione del risultato microscopico preliminare ha evidenziato un tempo medio di 33,9 minuti (*Tabella 10*).

Tabella 10. Intervallo di tempo (minuti) tra la segnalazione di positività dell'emocoltura da parte dello strumento e la comunicazione del risultato al reparto clinico.

N. flaconi positivi anno 2025-2026	tempo di comunicazione (minuti)
102	20
.80	27
102	30
100	35
202	40
72	43
22	50

Il rispetto di questo intervallo temporale ha consentito di garantire una rapida caratterizzazione preliminare del microrganismo responsabile della batteriemia/fungemia, fornendo informazioni diagnostiche tempestive ai clinici. La riduzione del tempo intercorrente tra il segnale di positività e l'esecuzione dell'esame microscopico rappresenta infatti un indicatore rilevante dell'efficienza del processo diagnostico microbiologico, poiché permette di anticipare la comunicazione del risultato preliminare e di supportare precocemente le decisioni terapeutiche. Nel presente studio, il raggiungimento di tale obiettivo temporale ha evidenziato l'efficacia dell'organizzazione del flusso

di lavoro e la capacità del laboratorio di garantire una gestione tempestiva dei campioni positivi, con potenziali ricadute favorevoli sulla presa in carico del paziente e sull'appropriatezza della terapia antimicrobica. Tale risultato, inoltre, evidenzia l'efficienza dell'organizzazione laboratoristica nella gestione delle emocolture positive e la capacità di fornire ai clinici informazioni microbiologiche preliminari in tempi compatibili con un rapido orientamento terapeutico, aspetto particolarmente rilevante nella gestione dei pazienti con sospetta infezione del torrente ematico. In un'ottica di miglioramento continuo della qualità, la riduzione della variabilità e la progressiva concentrazione verso tempi più brevi potrebbero rappresentare un obiettivo rilevante, in quanto la tempestività della comunicazione dell'esame microscopico costituisce un elemento cruciale nella gestione precoce delle batteriemie e nell'ottimizzazione della terapia antibiotica empirica.

4.7. Identificazione dei Microrganismi responsabili di batteriemie

L'identificazione rapida della specie batterica e i test di sensibilità antimicrobica sono essenziali per la gestione dei pazienti con batteriemia. Per accelerare questi passaggi il laboratorio in oggetto già dopo alcune ore di incubazione delle piastre seminate da flaconi di sangue segnalati come positivi dallo strumento (da 3 a 6 ore), sulla "massa batterica" esegue identificazione batterica e antibiogramma in accordo con le linee guida AMCLI.

L'applicazione di questa tecnica "Short-Term" ha consentito di anticipare significativamente i tempi di identificazione del microrganismo e di ottenere informazioni preliminari sulla sensibilità agli antibiotici diverse ore prima rispetto al workflow tradizionale con notevole riduzione (24 ore) dei tempi di refertazione. Nelle infezioni del torrente ematico e nelle condizioni settiche, la tempestiva identificazione dell'agente eziologico e del relativo profilo di suscettibilità antimicrobica rappresenta un elemento cruciale per migliorare l'outcome clinico del paziente. In tale contesto, l'utilizzo della tecnica Short-Term ha permesso di ridurre il tempo necessario per l'adozione di una terapia mirata, limitando l'impiego empirico prolungato di antibiotici ad ampio spettro e favorendo una gestione più appropriata delle infezioni gravi. In pratica sulle colonie isolate dai terreni di coltura è stata eseguita l'identificazione batterica e l'antibiogramma mediante pannelli Microscan, previa colorazione di Gram. Il Grafico 5 mette in evidenza i microrganismi isolati dalle emocolture processate nel periodo di tesi (semestre 2025-2026) con la tecnica sopra-menzionata.

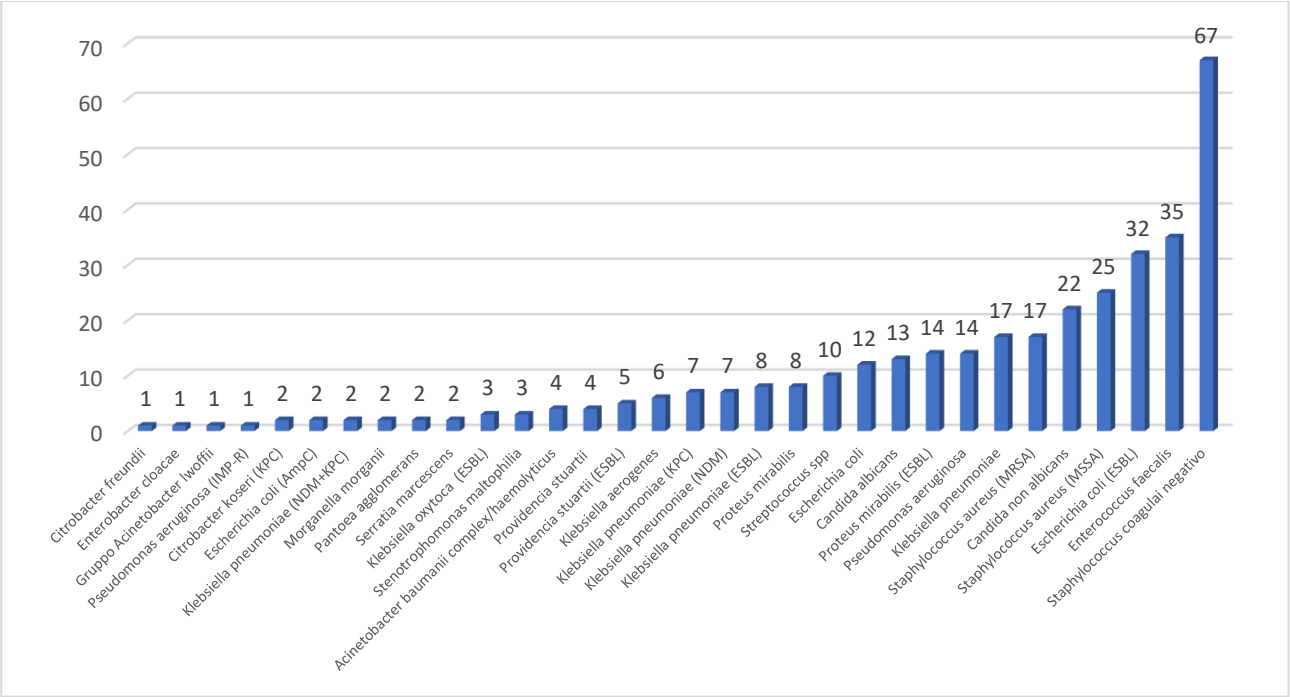

Grafico 5. Distribuzione dei microrganismi isolati dalle emocolture positive nel semestre 2025-2026.

Nel periodo di studio sono stati identificati complessivamente 349 isolati clinici da emocolture positive. I microrganismi più frequentemente riscontrati appartenevano al gruppo dei batteri Gram-positivi, che rappresentavano la quota predominante degli isolati. In particolare, i CoNS sono risultati i microrganismi maggiormente isolati, con N. 67 ceppi (19,2%), seguiti da *E. faecalis* con N. 35 ceppi (10,0%), *S. aureus* meticillino-sensibile (MSSA) con N. 25 ceppi (7,2%) e *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) con N. 17 ceppi (4,9%). Sono stati inoltre identificati N. 10 isolati di *Streptococcus* spp. (2,9%). Tra i batteri Gram-negativi, *E. coli* ha rappresentato il patogeno più frequentemente isolato, con N. 44 ceppi (12,6%), di cui N. 32 produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL). Tutti i ceppi identificati come potenziali produttori di ESBL mediante il sistema automatico MicroScan WalkAway sono stati successivamente confermati tramite il test immunocromatografico *NG-Test®*. Sono stati isolati 41 ceppi di *K. pneumoniae* (11,7%), fra cui alcuni produttori di β-lattamasi: ESBL (N. 8 casi), carbapenemasi di tipo KPC (N. 7 casi), metallo-β-lattamasi NDM (N. 7 casi) e co-produzione NDM+KPC (N. 2 casi). Sono stati riscontrati isolati appartenenti ai seguenti patogeni Gram-negativi: *P. mirabilis* (N. 22 casi complessivi, di cui N. 14 ESBL), *P. aeruginosa* (N. 15 casi, incluso un ceppo resistente ai carbapenemi), *Acinetobacter* spp. (N. 5 casi), *Providencia stuartii* (N. 9 casi), *M. morganii* (N. 2 casi), *S. marcescens* (N. 2 casi), *Citrobacter* spp. (N. 3 casi) e *Stenotrophomonas maltophilia* (N. 3 casi). Gli isolati fungini erano rappresentati da N. 35 ceppi del genere *Candida* (10,0%), comprendenti N. 13 isolati di *C. albicans* (3,7%) e N. 22 isolati di specie non *albicans* (6,3%), tutti identificati tramite il sistema manuale API test (API 20 C AUX). Nel

complesso, il panorama microbiologico osservato evidenzia una prevalenza di batteri Gram-positivi, seguiti dagli *Enterobacterales* e da altri bacilli Gram-negativi non fermentanti. Degna di nota è la presenza di numerosi microrganismi multiresistenti agli antibiotici, in particolare produttori di ESBL e carbapenemasi, che sottolineano l'importanza di una diagnosi microbiologica rapida e accurata per l'impostazione tempestiva della terapia antimicrobica appropriata.

4.7.1. Discriminazione della contaminazione delle emocolture

Per discriminare tra infezione reale e contaminazione sono stati utilizzati criteri clinico-microbiologici:

- ✓ isolamento di microrganismi comunemente considerati contaminanti (es. CoNS) in un solo flacone su due o più set prelevati;
- ✓ assenza di segni clinici di infezione correlata;
- ✓ mancata persistenza dello stesso microrganismo in campioni successivi o da altri siti infetti.

Pertanto, per quanto riguarda il riscontro di ceppi di CoNS (N. 67 isolati pari al 19,2% del totale) è necessario ricordare che sulla base dei criteri clinico-microbiologici adottati nello studio e soprariportati, tali isolamenti sono stati considerati prevalentemente come contaminazioni legati alla procedura di prelievo e pertanto non inclusi tra gli episodi di batteriemia clinicamente significativa. Questo dato risulta coerente con la letteratura, che identifica i CoNS come i contaminanti più frequentemente riscontrati nelle emocolture, in quanto componenti della normale flora cutanea [85]. L'elevata frequenza di tali isolamenti evidenzia l'importanza del rispetto delle procedure di antisepsi cutanea e delle corrette tecniche di prelievo al fine di ridurre il rischio di contaminazione e migliorare l'accuratezza diagnostica delle emocolture. Nel periodo di studio sono state processate complessivamente N. 1.562 emocolture, delle quali N. 67 sono state classificate come contaminate, corrispondenti a un tasso di contaminazione del 4,3%. Sebbene il valore osservato sia relativamente contenuto, esso risulta lievemente superiore al valore obiettivo raccomandato dalle principali linee guida internazionali, che indicano come auspicabile un tasso di contaminazione inferiore al 3% [39] (*Grafico 8*).

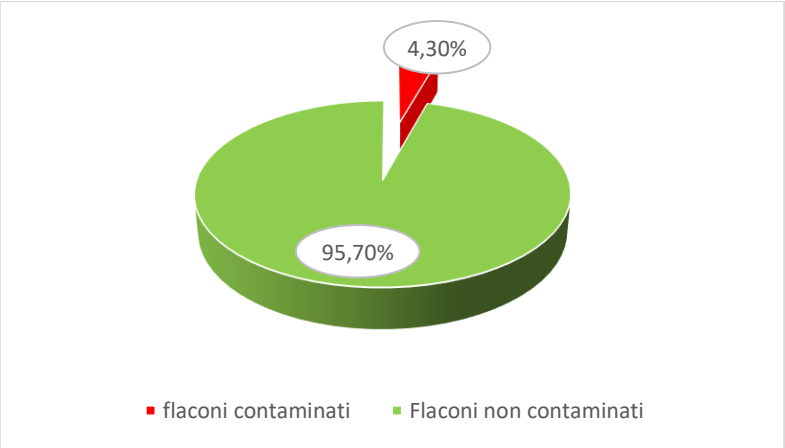

Grafico 8. Rappresentazione della percentuale di emocolture contaminate e non contaminate.

Un livello di contaminazione superiore a tale soglia può determinare conseguenze rilevanti sul piano clinico e organizzativo, tra cui l'esecuzione di ulteriori indagini diagnostiche, l'impiego non necessario di antibiotici, l'aumento della durata della degenza ospedaliera e un incremento dei costi sanitari. Il dato osservato deve tuttavia essere interpretato nel contesto clinico-assistenziale in cui sono stati eseguiti i prelievi. Il tasso di contaminazione è infatti influenzato da molteplici fattori, quali l'aderenza alle procedure di antisepsi cutanea, la tecnica di prelievo, l'esperienza dell'operatore, il contesto assistenziale e la complessità della popolazione studiata. Pertanto, un valore del 4,3% non identifica necessariamente una criticità del processo, ma rappresenta un indicatore di qualità da monitorare nel tempo. Il controllo sistematico del tasso di contaminazione costituisce uno degli indicatori più importanti nei programmi di diagnostic stewardship e di miglioramento continuo della qualità, poiché consente di valutare l'efficacia delle procedure di raccolta delle emocolture e di individuare eventuali interventi correttivi, quali la formazione periodica del personale sanitario, la standardizzazione delle procedure di prelievo e l'adozione di protocolli condivisi [86].

Infatti, l'analisi e il monitoraggio di questi dati e la distribuzione ai partecipanti del Comitato per il Contrasto delle Infezioni Ospedaliere (CIO), ha consentito di elaborare alcune strategie per abbassare ulteriormente i tassi di contaminazione ricordando che non sarà possibile ottenere valori prossimi o pari allo zero. Si è cercato però di attuare potenziali mezzi con cui ridurli, come per esempio un'adeguata preparazione antisettica al momento del prelievo.

I tassi di contaminazione da noi documentati (4.3% rispetto ai flaconi raccolti) superiori al 3% sono stati infatti oggetto di riflessioni critiche sul processo e hanno suggerito l'implementazione di programmi educativi specifici. La Direzione sanitaria centrale è intervenuta con un piano specifico infermieristico, implementando comportamenti migliorativi e più appropriati per l'esecuzione dell'emocoltura incentrati sulla qualità dell'assistenza e sulla sicurezza del paziente ricoverato, cercando di ridurre il grado di variabilità delle pratiche clinico-assistenziali. Inoltre, è stato organizzato nell'anno 2025 un corso di formazione per il personale infermieristico ma con accesso

libero a qualsiasi altra figura professionale, con l'intento di migliorare le competenze teoriche-pratiche specifiche. Il progetto formativo aziendale organizzato dal CIO è stato condotto con dimostrazioni pratiche e sottolineando come la contaminazione dei flaconi delle emocolture rappresenta un'informazione confondente per il clinico con aumento de costi complessi di assistenza. Dalle percentuali di contaminazione riportate si deduce come questo mezzo di comunicazione sia un utile strumento per migliorare le competenze teoriche-pratiche riducendo il tasso di contaminazione nella fase preanalitica.

4.7.2. Profilo di antibiotico-resistenza degli isolati clinici resistenti ai carbapenemi (CPE)

Su tutti i ceppi isolati è stato eseguito l'antibiogramma con il sistema automatico Microscan Walkay Away (Beckamn coulter) e interpretato secondo le linee guida EUCAST dell'anno corrente. Per quanto riguardo l'antimicogramma è stato eseguito manualmente tramite kit. Particolarmente interessanti sono i profili di antibiotico-resistenza degli isolati clinici con particolari meccanismi di resistenza, in particolar modo appartenenti al gruppo degli *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE), perché risulta molto difficile per il clinico l'impostazione di una terapia empirica. In questa tesi l'analisi si è concentrata sui profili di antibiotico-resistenza degli isolati batterici, escludendo quelli provenienti da *Candida* spp.

Per questi isolati di difficile gestione terapeutica perché multiresistenti agli antibiotici, è stata testata la sensibilità ai seguenti antibiotici:

- Amikacina (AK),
- Amoxicillina/Acido Clavulanico (AMC),
- Cefepime (CEF),
- Cefiderocol (CF),
- Cefotaxime (CTX),
- Ceftazidime (CAZ),
- Ceftazidime/Avibactam (AV),
- Ceftolozano/Tazobactam (TAZ),
- Ciprofloxacina (CIP),
- Colistina (CL),
- Ertapenem (ETP),
- Fosfomicina (FOS),
- Gentamicina (GN),
- Imipenem (IMP),
- Levofloxacina (LEV),
- Meropenem (MEM),

- Meropenem/Vaborbactam (VAB),
- Piperacillina/Tazobactam (TZP),
- Tobramicina (TOB),
- Trimeth/Sulfa (SXT).

Come si evince dalla Tabella 13 e dal Grafico 10, tutti i ceppi sono risultati sensibili alla colistina, e al cefiderocol, mentre solo N. 9 ceppi sono risultati sensibili ai nuovi BLIC (combinazioni di b-lattamici e inibitori di b-lattamasi: ceftazidime/avibactam, ceftozolano/tazobactam), alla fosfomicina e N. 4 isolati ai fluorochinoloni (ciprofloxacina e levofloxacina).

Tabella 13. Profilo di sensibilità agli antibiotici degli isolati di Enterobacterales produttori di carbapenemasi (CPE) inclusi nello studio (n = 18). N.R.: numero di ceppi resistenti; N.S.: numero di ceppi sensibili.

MOLECOLE TESTATE	N. R	N.S
AMIKACINA	18	0
AMOXICILLINA/ACIDO CLAVULANICO IV	18	0
CEFEPIME	18	0
CEFIDEROCOL	0	18
CEFOTAXIME	18	0
CEFTAZIDIME	18	0
CEFTAZIDIME/AVIBACTAM	9	9
CEFTOLOZAN/TAZOBACTAM	9	9
CIPROFLOXACINA	14	4
COLISTINA	0	18
ERTAPENEM	18	0
GENTAMICINA	18	0
LEVOFLOXACINA	14	4
MEROPENEM	18	0
MEROPENEM VARBOBACTAM	18	0
PIPERACILLINA-TAZOBACTAM	18	0
TOBRAMICINA	18	0
TRIMETH/SULFA 1/19	18	0
FOSFOMICINA	9	9

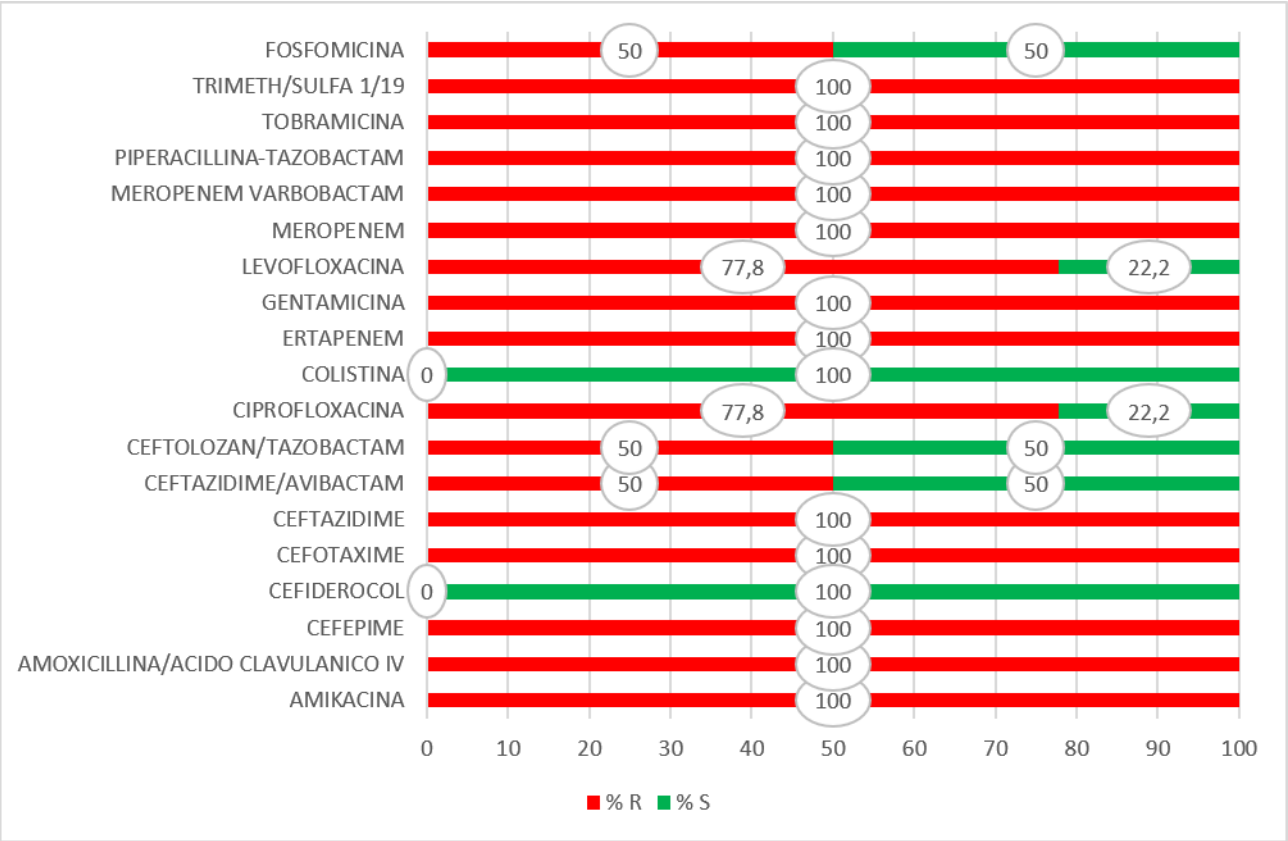

Grafico 10. Profilo di sensibilità agli antibiotici degli isolati clinici di Enterobacterales produttori di carbapenemasi (CPE). Le percentuali sono espresse come quota di ceppi resistenti (R) e sensibili (S) per ciascun antibiotico testato.

L'analisi dell'antibiogramma cumulativo dei N. 18 ceppi di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE) ha evidenziato un profilo di resistenza estremamente ampio, confermando il rilevante impatto clinico ed epidemiologico di questi microrganismi nel contesto ospedaliero. I dati ottenuti mostrano una resistenza del 100% nei confronti di numerose classi antibiotiche tradizionalmente impiegate nel trattamento delle infezioni da batteri Gram-negativi, inclusi gli aminoglicosidi (amikacina, gentamicina e tobramicina), le cefalosporine di terza e quarta generazione (cefotaxime, ceftazidime e cefepime), la combinazione piperacillina/tazobactam e i carbapenemi (ertapenem e meropenem). Tale risultato è coerente con il meccanismo di resistenza caratteristico dei ceppi CPE, nei quali la produzione di carbapenemasi determina l'idrolisi dei β-lattamici, compromettendo significativamente l'efficacia terapeutica di queste molecole. Particolarmente rilevante è la completa resistenza osservata nei confronti di ertapenem e meropenem. La resistenza ai carbapenemi rappresenta infatti il principale criterio fenotipico che caratterizza i CPE ed è associata a una limitazione sostanziale delle opzioni terapeutiche disponibili. I fluorochinoloni hanno mostrato una sensibilità residua limitata, con il 22,2% dei ceppi sensibili sia alla ciprofloxacina sia alla levofloxacina. Questo dato conferma la ridotta utilità clinica di tali molecole nel trattamento empirico delle infezioni sostenute da CPE e riflette la crescente diffusione di meccanismi di resistenza mediati

da mutazioni cromosomiche nei geni bersaglio e da determinanti plasmidici. Un risultato di particolare interesse riguarda l'attività delle nuove associazioni β-lattamico/inibitore delle β-lattamasi. Sia ceftazidime/avibactam sia ceftolozano/tazobactam hanno mostrato una sensibilità del 50%. Questa osservazione riflette la distribuzione eterogenea delle carbapenemasi nel campione analizzato, con la presenza di metallo-β-lattamasi (NDM), nei confronti delle quali avibactam non possiede attività inibitoria. In particolare, l'attività di ceftazidime/avibactam dipende strettamente dal tipo di carbapenemasi prodotta: il farmaco risulta generalmente efficace nei confronti delle carbapenemasi di classe A (ad esempio KPC) e di alcune di classe D (OXA-48-like), mentre non è attivo nei confronti delle metallo-β-lattamasi (NDM, VIM e IMP). Anche la fosfomicina ha mostrato una sensibilità del 50%, suggerendo una possibile utilità come terapia di combinazione in casi selezionati. Tuttavia, l'impiego clinico della fosfomicina nelle infezioni sistemiche richiede cautela a causa del rischio di selezione di mutanti resistenti durante il trattamento, specialmente quando utilizzata in monoterapia. L'aspetto più significativo emerso dall'analisi è rappresentato dall'elevata attività di cefiderocol e colistina, che hanno mostrato sensibilità nel 100% degli isolati testati. Cefiderocol, che è una cefalosporina siderofora di recente introduzione, sfrutta i sistemi batterici di trasporto del ferro per attraversare la membrana esterna dei Gram-negativi e mantiene attività contro numerosi produttori di carbapenemasi, incluse molte metallo-β-lattamasi [87]. I risultati ottenuti confermano il ruolo di questa molecola come una delle più promettenti opzioni terapeutiche per il trattamento delle infezioni sostenute da patogeni Gram-negativi altamente resistenti. Analogamente, la colistina ha mantenuto un'attività completa nei confronti di tutti gli isolati esaminati. Sebbene questo dato sia incoraggiante dal punto di vista microbiologico, l'utilizzo clinico della colistina è limitato dalla nota tossicità renale e neurologica [88]. Pertanto, il suo impiego dovrebbe essere attentamente valutato e possibilmente riservato a situazioni nelle quali non siano disponibili alternative terapeutiche più sicure ed efficaci. Nel complesso, i risultati ottenuti evidenziano come la diffusione di isolati di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi rappresenti una delle principali sfide della microbiologia clinica moderna. La limitata suscettibilità verso la maggior parte degli antibiotici convenzionali rende fondamentale l'esecuzione tempestiva dell'antibiogramma e l'identificazione del meccanismo molecolare di resistenza, al fine di orientare una terapia mirata e supportare le strategie di antimicrobial stewardship. L'elevata attività osservata per cefiderocol e colistina conferma il ruolo di queste molecole come opzioni terapeutiche nei casi di infezioni invasive sostenute da CPE, pur richiedendo un utilizzo appropriato per limitare l'insorgenza di ulteriori fenomeni di resistenza.

5. Conclusioni

Il presente studio ha evidenziato il ruolo centrale della diagnostica microbiologica delle emocolture nella gestione delle infezioni del torrente ematico, confermando l'importanza di un approccio integrato che comprenda aspetti tecnici, clinici ed epidemiologici.

Nel corso del periodo analizzato è stato osservato un progressivo incremento dell'uso delle emocolture rispetto ai semestri precedenti, con un aumento complessivo del 53,1% del numero di emocolture eseguite. Tale incremento è risultato sostanzialmente proporzionale all'aumento del numero di pazienti sottoposti all'indagine microbiologica (+50,3%), Parallelamente, è emerso un miglioramento dell'appropriatezza delle modalità di campionamento. Sebbene il numero assoluto di emocolture solitarie sia rimasto pressoché invariato, la loro incidenza relativa si è progressivamente ridotta, mentre oltre il 95% delle emocolture è stato eseguito nell'ambito di set multipli. Tale dato indica una crescente aderenza alle raccomandazioni internazionali, che identificano l'esecuzione di più set emocolturali come requisito fondamentale per incrementare la sensibilità diagnostica e migliorare l'interpretazione dei risultati

La popolazione studiata è risultata costituita prevalentemente da pazienti anziani, con oltre il 90% dei soggetti appartenente alle fasce di età comprese tra 60 e 89 anni e una prevalenza del sesso maschile. Questa distribuzione riflette l'epidemiologia delle batteriemie, che colpiscono con maggiore frequenza pazienti fragili, pluripatologici e sottoposti a procedure assistenziali complesse.

L'analisi microbiologica ha evidenziato una progressiva riduzione della percentuale di emocolture positive nel corso degli anni considerati. Tale andamento, interpretato congiuntamente all'aumento del numero complessivo di richieste, potrebbe riflettere un ampliamento dell'utilizzo dell'esame anche in contesti caratterizzati da una minore probabilità di batteriemia, rendendo ancora più importante il monitoraggio dell'appropriatezza prescrittiva. L'analisi del workflow laboratoristico ha dimostrato una buona efficienza nella gestione delle emocolture positive, con l'esecuzione dell'esame microscopico diretto entro tempi compatibili con una rapida comunicazione dei risultati preliminari ai clinici. Infatti, l'esame microscopico è stato eseguito con un tempo medio di 33.9 minuti dalla segnalazione di positività del flacone, consentendo una comunicazione tempestiva di informazioni preliminari utili all'orientamento terapeutico. La riduzione dei tempi di risposta rappresenta un elemento fondamentale nella gestione delle infezioni del torrente ematico, poiché permette al clinico di disporre precocemente di indicazioni sul tipo di microrganismo coinvolto e di modulare la terapia in modo più appropriato.

L'analisi della distribuzione microbiologica ha mostrato una predominanza di batteri Gram-positivi, con i CoNS che hanno rappresentato il gruppo più frequentemente isolato. Tuttavia, tali microrganismi sono stati considerati "contaminanti" sulla base dei criteri clinico-microbiologici adottati nello studio e pertanto esclusi dall'analisi delle batteriemie significative. La loro elevata

frequenza è verosimilmente correlata alla presenza di questi batteri come componenti della flora cutanea residente e conferma come la contaminazione rappresenti ancora una criticità nella diagnostica emocolturale.

Il tasso di contaminazione osservato è risultato pari al 4,3%, valore superiore al limite del 3% generalmente indicato come standard di qualità per i laboratori di Microbiologia clinica. Sebbene tale dato possa essere influenzato da numerosi fattori, tra cui le condizioni cliniche dei pazienti, il contesto assistenziale e le modalità operative di prelievo, esso suggerisce la necessità di implementare strategie volte a migliorare l'aderenza alle procedure di antisepsi cutanea e alle corrette tecniche di raccolta dei campioni. La riduzione delle contaminazioni rappresenta infatti un obiettivo rilevante sia dal punto di vista clinico, per evitare trattamenti antibiotici non necessari, sia dal punto di vista organizzativo ed economico. Il mantenimento di programmi di formazione del personale, la standardizzazione delle procedure di prelievo e il costante controllo degli indicatori di processo potranno contribuire a ridurre ulteriormente tale percentuale

Tralasciando gli isolati considerati contaminanti, che hanno permesso di definire l'incidenza delle emocolture contaminate, i microrganismi più frequentemente associati a batteriemie clinicamente significative sono risultati *E. faecalis*, *E. coli* produttore di ESBL e *S. aureus*. Particolarmente rilevante è stata la presenza di *K. pneumoniae* produttori di KPC e NDM che sottolineano la crescente diffusione di microrganismi multiresistenti, nell'Istituto Maugeri, e la conseguente complessità nella gestione terapeutica delle batteriemie.

Nel presente studio, l'impiego della tecnica "Short-Term" ha rappresentato un importante strumento per la riduzione dei tempi diagnostici nelle emocolture positive. L'utilizzo di colonie giovani ottenute dopo breve incubazione ha consentito l'esecuzione anticipata dell'identificazione microbiologica e dell'antibiogramma mediante sistema automatizzato Microscan, senza attendere la crescita completa delle colonie richiesta dal protocollo convenzionale. Questo approccio ha permesso di ottenere informazioni microbiologiche preliminari in tempi più rapidi, favorendo una comunicazione tempestiva dei risultati al clinico. Questo approccio permette una significativa riduzione del turnaround time diagnostico, con un recupero di circa 24 ore rispetto alla metodica tradizionale. In particolare, la possibilità di avviare l'antibiogramma su colonie giovani contribuisce ad anticipare la disponibilità dei risultati di sensibilità, favorendo una più rapida de-escalation terapeutica e l'introduzione di trattamenti mirati nei confronti di patogeni multiresistenti. Nel contesto operativo del laboratorio in oggetto, l'integrazione della tecnica Short-Term nel worflow delle emocolture positive ha migliorato l'efficienza del processo diagnostico, consentendo una gestione più tempestiva dei campioni e un supporto più efficace alle decisioni cliniche. Considerata la crescente diffusione di microrganismi ESBL e carbapenemasi produttori descritta nel presente studio, la disponibilità precoce sia dell'identificazione biochimica sia dell'antibiogramma assume un ruolo particolarmente

rilevante nell'ambito dei programmi di antimicrobial stewardship e nella gestione delle infezioni gravi correlati all'assistenza sanitaria. Particolare interesse riveste l'analisi dei ceppi di *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi (CPE). L'antibiogramma cumulativo ha evidenziato una marcata compromissione dell'attività delle principali classi antibiotiche tradizionali nei confronti dei ceppi CPE analizzati.

Cefiderocol e colistina sono risultate le molecole con la maggiore attività *in vitro*, mentre ceftazidime/avibactam, ceftolozano/tazobactam e fosfomicina hanno mostrato efficacia intermedia. Questi risultati confermano la necessità di un approccio terapeutico guidato dall'antibiogramma e supportano l'importanza delle nuove molecole anti-Gram-negativi nel contrasto alle infezioni sostenute da *Enterobacterales* produttori di carbapenemasi.

Nel complesso, i risultati ottenuti dimostrano come l'integrazione tra rapidità diagnostica, tecnologie innovative e sorveglianza epidemiologica rappresenti uno strumento fondamentale per ottimizzare la gestione delle infezioni del torrente ematico. Il laboratorio di microbiologia si conferma pertanto un elemento strategico nel percorso diagnostico-terapeutico del paziente, contribuendo in maniera determinante alla scelta appropriata della terapia antimicrobica, al contenimento dell'antibiotico-resistenza e al miglioramento degli esiti clinici.

6. Bibliografia

[1] Aiesh BM, Daraghmeh D, Abu-Shamleh N, Joudallah A, Sabateen A, Al Ramahi R. Blood culture contamination in a tertiary care hospital: a retrospective three-year study. BMC Infect Dis 2023;23:448. https://doi.org/10.1186/s12879-023-08428-0.

[2] AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Infezioni del torrente circolatorio. 2023.

[3] Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 2009;48 Suppl 4:S238-245. https://doi.org/10.1086/598188.

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

[5] Bush LM, Vazquez-Pertejo MT. Bacteremia. MSD Man Prof Ed 2024. https://www.msdmanuals.com/professional/infectious-diseases/biology-of-infectious-disease/bacteremia.

[6] Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 9th ed. Philadelphia: 2021.

[7] Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.

[8] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016;315:801–10. https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287.

[9] Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Med 2017;43:304–77. https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6.

[10] Holmes CL, Albin OR, Mobley HLT, Bachman MA. Bloodstream infections: mechanisms of pathogenesis and opportunities for intervention. Nat Rev Microbiol 2025;23:210–24. https://doi.org/10.1038/s41579-024-01105-2.

[11] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. Cell 2010;140:805–20. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022.

[12] Arens C, Bajwa SA, Koch C, Siegler BH, Schneck E, Hecker A, et al. Sepsis-induced long-term immune paralysis--results of a descriptive, explorative study. Crit Care 2016;20:93. https://doi.org/10.1186/s13054-016-1233-5.

[13] Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. Virulence 2014;5:213–8. https://doi.org/10.4161/viru.27024.

[14] Tong SYC, Fowler VG, Skalla L, Holland TL. Management of *Staphylococcus aureus* Bacteremia: A Review. JAMA 2025;334:798–808. https://doi.org/10.1001/jama.2025.4288.

[15] McAdow M, Missiakas DM, Schneewind O. *Staphylococcus aureus* Secretes Coagulase and von Willebrand Factor Binding Protein to Modify the Coagulation Cascade and Establish Host Infections. J Innate Immun 2012;4:141–8. https://doi.org/10.1159/000333447.

[16] Santella B, Folliero V, Pirofalo GM, Serretiello E, Zannella C, Moccia G, et al. Sepsis-A Retrospective Cohort Study of Bloodstream Infections. Antibiotics 2020;9:851. https://doi.org/10.3390/antibiotics9120851.

[17] von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis 2002;2:677–85. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00438-3.

[18] Adamkova V, Adamkova VG, Kroneislova G, Zavora J, Kroneislova M, Huptych M, et al. Increasing Rate of Fatal *Streptococcus pyogenes* Bacteriemia-A Challenge for Prompt Diagnosis and Appropriate Therapy in Real Praxis. Microorganisms 2024;12:995. https://doi.org/10.3390/microorganisms12050995.

[19] Barnett T, Indraratna A, Sanderson-Smith M. Secreted Virulence Factors of *Streptococcus pyogenes*. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. Streptococcus Pyogenes Basic Biol. Clin. Manif. 2nd ed., Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2022.

[20] Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Francisco CN-S, Díez-Sebastián J, Romero-Gómez MP, Fernández FA, et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. Virulence 2015;6:93–100. https://doi.org/10.4161/21505594.2014.991234.

[21] Al-Hasan MN, Eckel-Passow JE, Baddour LM. Bacteremia Complicating Gram-Negative Urinary Tract Infections: A Population-Based Study. J Infect 2010;60:278–85. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.01.007.

[22] Abreu AG, Barbosa AS. How *Escherichia coli* Circumvent Complement-Mediated Killing. Front Immunol 2017;8:452. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00452.

[23] Holmes CL, Anderson MT, Mobley HLT, Bachman MA. Pathogenesis of Gram-Negative Bacteremia. Clin Microbiol Rev n.d.;34:e00234-20. https://doi.org/10.1128/CMR.00234-20.

[24] Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella*

pneumoniae and impact of appropriate antimicrobial treatment. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 2011;17:1798–803. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03514.x.

[25] Yu W-L, Ko W-C, Cheng K-C, Lee H-C, Ke D-S, Lee C-C, et al. Association between rmpA and magA genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am 2006;42:1351–8. https://doi.org/10.1086/503420.

[26] Monteiro A de SS, Cordeiro SM, Reis JN. Virulence Factors in *Klebsiella pneumoniae*: A Literature Review. Indian J Microbiol 2024;64:389–401. https://doi.org/10.1007/s12088-024-01247-0.

[27] Huang X, Li X, An H, Wang J, Ding M, Wang L, et al. Capsule type defines the capability of *Klebsiella pneumoniae* in evading Kupffer cell capture in the liver. PLoS Pathog 2022;18:e1010693. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010693.

[28] Lee N-Y, Chang TC, Wu C-J, Chang C-M, Lee H-C, Chen P-L, et al. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia. J Infect 2010;61:219–27. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2010.07.002.

[29] Smith AR, Vowles M, Horth RZ, Smith L, Rider L, Wagner JM, et al. Infection control response to an outbreak of OXA-23 carbapenemase-producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a skilled nursing facility in Utah. Am J Infect Control 2021;49:792–9. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.11.012.

[30] Shenoy ES, Pierce VM, Sater MRA, Pangestu FK, Herriott IC, Anahtar MN, et al. Community-acquired in name only: A cluster of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a burn intensive care unit and beyond. Infect Control Hosp Epidemiol 2020;41:531–8. https://doi.org/10.1017/ice.2020.15.

[31] Liou M-L, Chen K-H, Yeh H-L, Lai C-Y, Chen C-H. Persistent nasal carriers of *Acinetobacter baumannii* in long-term-care facilities. Am J Infect Control 2017;45:723–7. https://doi.org/10.1016/j.ajic.2017.02.005.

[32] De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clin Microbiol Rev 2020;33:e00181-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19.

[33] Lucidi M, Visaggio D, Migliaccio A, Capecchi G, Visca P, Imperi F, et al. Pathogenicity and virulence of *Acinetobacter baumannii*: Factors contributing to the fitness in healthcare settings and the infected host. Virulence 2024;15:2289769. https://doi.org/10.1080/21505594.2023.2289769.

[34] Renggli L, Burri A, Ehrhard S, Gasser M, Kronenberg A, Swiss Centre for Antibiotic Resistance. Incidence and resistance rates of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections in Switzerland: a nationwide surveillance study (2010-2022). Infection 2025;53:1373–81. https://doi.org/10.1007/s15010-024-02452-1.

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

[36] Johnson CJ, Davis JM, Huttenlocher A, Kernien JF, Nett JE. Emerging Fungal Pathogen *Candida auris* Evades Neutrophil Attack. mBio 2018;9:e01403-18. https://doi.org/10.1128/mBio.01403-18.

[37] Tenderenda A, Łysakowska M, Dargiewicz R, Gawron-Skarbek A. Blood Culture Contamination: A Single General Hospital Experience of 2-Year Retrospective Study. Int J Environ Res Public Health 2022;19:3009. https://doi.org/10.3390/ijerph19053009.

[38] Bloomfield MG, O'Connor MJQ, Balm MND, Blackmore TK. Effect of Blood Culture Contamination on Antibiotic Use in an Institution With Rapid Laboratory Methods and Phone-Based Clinical Follow-up of Blood Culture Results. Open Forum Infect Dis 2022;9:ofac529. https://doi.org/10.1093/ofid/ofac529.

[39] Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. Clin Microbiol Rev 2006;19:788–802. https://doi.org/10.1128/CMR.00062-05.

[40] AMCLI ETS. Percorso Diagnostico - Infezioni associate ai cateteri vascolari. 2023.

[41] Kern WV, Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection-a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis 2020;26:151–7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.10.031.

[42] Mun SJ, Kim S-H, Kim H-T, Moon C, Wi YM. The epidemiology of bloodstream infection contributing to mortality: the difference between community-acquired, healthcare-associated, and hospital-acquired infections. BMC Infect Dis 2022;22:336. https://doi.org/10.1186/s12879-022-07267-9.

[43] Munro C, Zilberberg MD, Shorr AF. Bloodstream Infection in the Intensive Care Unit: Evolving Epidemiology and Microbiology. Antibiotics 2024;13:123. https://doi.org/10.3390/antibiotics13020123.

[44] Agnoletti F, Barco L, Losasso C, Ravarotto L, Ricci A, Vincenzoni G. Antibiotico-resistenza. 1st ed. Padova: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie; 2019.

[45] 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.

[46] Zinner SH. Antibiotic use: present and future. New Microbiol 2007;30:321–5.

[47] Huemer M, Mairpady Shambat S, Brugger SD, Zinkernagel AS. Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. EMBO Rep 2020;21:e51034. https://doi.org/10.15252/embr.202051034.

[48] Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev MMBR 2010;74:417–33. https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10.

[49] Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. World Health Organization; 2014.

[50] 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.

[51] Cardoso T, Almeida M, Friedman ND, Aragão I, Costa-Pereira A, Sarmento AE, 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.

[52] Kahlmeter G. To clinical colleagues: On recent changes in clinical microbiology susceptibility reports - new interpretation of susceptibility categories S, I and R. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); 2021.

[53] Martinez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. Drug Discov Today Technol 2014;11:33–9. https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001.

[54] Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr 2016;4. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.

[55] Sora VM, Wallet C, Meroni G, Loustau T, Rohr O, Zecconi A, et al. Antimicrobial Resistance: How Can We Overcome the Problem? Antibiotics 2026;15:82. https://doi.org/10.3390/antibiotics15010082.

[56] Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. Science 1992;257:1064–73. https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1064.

[57] Tang KWK, Millar BC, Moore JE. Antimicrobial Resistance (AMR). Br J Biomed Sci 2023;80:11387. https://doi.org/10.3389/bjbs.2023.11387.

[58] Jeggo M, Mackenzie JS. Defining the Future of One Health. Microbiol Spectr 2014;2:OH-0007-2012. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.OH-0007-2012.

[59] Weist K, ESAC-Net participants and the Antimicrobial Resistance and Healthcare-associated Infections (ARHAI) programme at ECDC. ECDC publishes its first data on antimicrobial consumption in Europe. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull 2013;18:20419.

[60] Antimicrobial Stewardship. Ann Emerg Med 2020;76:e109–12. https://doi.org/10.1016/j.annemergmed.2020.08.024.

[61] Palavecino EL, Williamson JC, Ohl CA. Collaborative Antimicrobial Stewardship: Working with Microbiology. Infect Dis Clin North Am 2020;34:51–65. https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.10.006.

[62] Garattini S, Clavenna A. *Gli antibiotici spiegati bene. Come usarli in modo sicuro e consapevole*. Edizioni LSWR. Milano: 2020.

[63] Cambiotti V, Romagnoli P, Sorice A, Sechi P, Cenci Goga B. I meccanismi con cui i batteri resistono agli antimicrobici. Argomenti 2014;2:71-80.

[64] Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. Nature 2000;405:299–304. https://doi.org/10.1038/35012500.

[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] Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock. *Biologia dei microrganismi*. Milano: Casa Editrice Ambrosiana; 2005.

[67] Sbaffi C, Olmastroni E, Tragni E. Antibiotico-resistenza: cause, conseguenze, strategie di ricerca e politiche sanitarie per contrastarla. G Ital Farm E Farm 2021;13.

[68] Luzzaro F, Gesu G, Pagani L, Rossolini G. Diagnostica delle ß-lattamasi a spettro esteso (ESBL) nelle Enterobacteriaceae: problemi e raccomandazioni nella realtà epidemiologica italiana. Microbiol Medica 2007;22. https://doi.org/10.4081/mm.2007.2602.

[69] Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, Colenso CK, Hirvonen VHA, Takebayashi Y, et al. β-Lactamases and β-Lactamase Inhibitors in the 21st Century. J Mol Biol 2019;431:3472–500. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.002.

[70] Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales—From ESBLs to Carbapenemases. Antibiotics 2021;10:1140. https://doi.org/10.3390/antibiotics10091140.

[71] La Placa M. *Principi di Microbiologia Medica*. 10th ed. Bologna: Società Editrice Esculapio; 2005.

[72] Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β-lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. JAC-Antimicrob Resist 2021;3:dlab092. https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092.

[73] Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev 2019;32:e00001-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-19.

[74] Bradford PA. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933–51. https://doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.

[75] Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β-Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:1–14. https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.1-14.2004.

[76] Meini S, Tascini C, Cei M, Sozio E, Rossolini GM. AmpC β-lactamase-producing *Enterobacterales*: what a clinician should know. Infection 2019;47:363–75. https://doi.org/10.1007/s15010-019-01291-9.

[77] Caliskan-Aydogan O, Alocilja EC. A Review of Carbapenem Resistance in *Enterobacterales* and Its Detection Techniques. Microorganisms 2023;11:1491. https://doi.org/10.3390/microorganisms11061491.

[78] Díaz A, Ortiz DC, Trujillo M, Garcés C, Jaimes F, Restrepo AV. Clinical Characteristics of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Ill and Colonized Children in Colombia. Pediatr Infect Dis J 2016;35:237–41. https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000987.

[79] Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC Carbapenem-Hydrolyzing Enzymes in Enterobacter spp. from Brooklyn, New York. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:776–8. https://doi.org/10.1128/AAC.49.2.776-778.2005.

[80] Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev 2005;18:306–25. https://doi.org/10.1128/CMR.18.2.306-325.2005.

[81] STEFANIUK EM, TYSKI S. Colistin Resistance in *Enterobacterales* Strains – A Current View. Pol J Microbiol 2019;68:417–27. https://doi.org/10.33073/pjm-2019-055.

[82] Novis DA, Dale JC, Schifman RB, Ruby SG, Walsh MK. Solitary blood cultures: a College of American Pathologists Q-probes study of 132,778 blood culture sets in 333 small hospitals. Arch Pathol Lab Med 2001;125:1290–4. https://doi.org/10.5858/2001-125-1290-SBC.

[83] https://amcli.it/percorsi-diagnostici n.d.

[84] Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, Garey KW, Rupp ME, Weinstein MP, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: A Comprehensive Update on the Problem of Blood Culture Contamination and a Discussion of Methods for Addressing the Problem. Clin Microbiol Rev 2019;33:e00009-19. https://doi.org/10.1128/CMR.00009-19.

[85] Gander RM, Byrd L, DeCrescenzo M, Hirany S, Bowen M, Baughman J. Impact of blood cultures drawn by phlebotomy on contamination rates and health care costs in a hospital emergency department. J Clin Microbiol 2009;47:1021–4. https://doi.org/10.1128/JCM.02162-08.

[86] Singh HK, Claeys KC, Advani SD, Ballam YJ, Penney J, Schutte KM, et al. Diagnostic stewardship to improve patient outcomes and healthcare-associated infection (HAI) metrics. Infect Control Hosp Epidemiol 2024;45:405–11. https://doi.org/10.1017/ice.2023.284.

[87] Stefani S, Arena F, Principe L, Stracquadanio S, Vismara C, Rossolini GM. Evaluating Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Cefiderocol: A Review and Expert Opinion on Current Practices and Future Directions. Antibiotics 2025;14:760. https://doi.org/10.3390/antibiotics14080760.

[88] Bassetti M, Peghin M. How to manage KPC infections. Ther Adv Infect Dis 2020;7:2049936120912049. https://doi.org/10.1177/2049936120912049.