

ANTIBIOGRAMMA, QUESTO SCONOSCIUTO: ISTRUZIONI PER UN'INTERPRETAZIONE CORRETTA

A cura dell'Area scientifico-culturale SIFO Infettivologia



Via Carlo Farini, 81 - 20159 Milano - Tel +39 2 6071934 - info@sifo.it - www.sifoweb.it



INDICE

pag.

Prefazione del Presidente SIFO3
a cura del Presidente SIFO Dr Arturo Cavaliere

Antibiogramma: concetti generali.....4
a cura del Presidente SIFO Dr Arturo Cavaliere e dell'Area ASC SIFO Infettivologia*

Cos'è l'Antibiogramma?.....4
Cosa si intende per MIC? Quali tecniche per determinarla?.....4
Cosa si intende per Concentrazione minima battericida (MBC)?.....5
Cos'è l'EUCAST? Quali sono le nuove definizioni delle tre categorie interpretative (S, I e R) in vigore dal 2019?.....6
Il Cut-off epidemiologico.....7
Refertazione dell'antibiogramma.....7
Come si interpretano le MIC?.....9
In quali casi non si eseguono le MIC?.....9
In quali casi si eseguono le MIC ma non viene refertata la categoria interpretativa?.....9
Molecole refertate, molecole equivalenti, sinergie.....10
Note/commenti ad integrazione del referto.....10
Campionatura.....11

Interpretazione dell'antibiogramma.....12
a cura dell'Area ASC SIFO Infettivologia*

Quali parametri considerare per interpretare l'antibiogramma?.....12
1. Parametri farmacocinetici e farmacodinamici da conoscere nella scelta di un antibiotico.....12
2. Sito di infezione e la capacità dell'antibiotico di raggiungerlo a dosi terapeutiche; impatto delle comorbidità.....15
Interpretare la resistenza e la suscettibilità di un microorganismo a un antibiotico17
Lettura dell'Antibiogramma: esempio n°1.....20
Lettura dell'Antibiogramma: esempio n°2.....21
Lettura dell'Antibiogramma: esempio n°3.....22
Lettura e interpretazione dell'antibiogramma in base al campione raccolto (sangue, urine, ferite, ecc).....23

Bibliografia25

***ASC SIFO Infettivologia**

Coordinatore ASC Infettivologia: Dr.ssa Francesca Vivaldi, Azienda Asl Toscana Nord Ovest

Componenti ASC Infettivologia:

Dr.ssa Ahimsa Carissimi, Azienda Asl Toscana Nord Ovest, Toscana

Dr. Lorenzo Gambitta, ASST Santi Paolo e Carlo Milano, Lombardia

D.ssa Roberta Marra, ASL1 Napoli, Campania

D.ssa Chiara Parati, ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda, Lombardia

Dr. Vincenzo Picerno, Ente Ecclesiastico Ospedale Generale Regionale "F. Miulli", Puglia

Dr. Filippo Urso, AO Cosenza, Calabria

PREFAZIONE DEL PRESIDENTE

Questo manuale nasce come una opportunità per la SIFO e per l'Area Scientifica Infettivologia di offrire alla propria comunità scientifica un miglior orientamento professionale nelle decisioni su una tematica che impatta quotidianamente le attività del farmacista ospedaliero e territoriale.

Ad oggi, il saggio dedicato alla sensibilità agli Antimicrobici "Antibiogramma" dovrebbe essere il binario Scientifico che guida qualunque prescrizione ed erogazione, purtroppo questo non sempre avviene e ciò diventa una tra le cause principali che determinano il fenomeno della Antibiotico Resistenza.

Il 2025 sarà il decennale dall'adozione del Global Action Plan dell'OMS contro la resistenza antimicrobica (AMR) e nonostante i passi in avanti fatti fino ad oggi, è ancora necessario avviare azioni concrete ed efficaci per debellare questo fenomeno.

Se le misure di prevenzione non fossero radicali ed efficaci entro il 2050, si potrebbero stimare fino a 10 milioni di morti all'anno (superiori alle morti causate dai tumori maligni) e la folle cifra di 100 trilioni di dollari come costi economici.

Pertanto, questo volume vuole ancora una volta rappresentare un contributo professionale per i nostri associati in coerenza con le nuove strategie che il Ministero della Salute introdurrà con il nuovo documento denominato "Strategia e Piano Nazionale di Contrasto dell'Antibiotico-Resistenza (SePNCAR) 2022-2025", al quale SIFO ha contribuito con il proprio apporto professionale determinante all'interno dei Gruppi di Lavoro.

Confidando di aver colto nel segno i nuovi orientamenti formativi professionali colgo l'occasione per salutarVi tutti calorosamente.

**Presidente SIFO
Arturo Cavaliere**

ANTIBIOGRAMMA: CONCETTI GENERALI

Cos'è l'Antibiogramma?

L'antibiogramma (o saggio di sensibilità agli antimicrobici) è un test microbiologico utile a **determinare *in vitro* il fenotipo di sensibilità/resistenza di un ceppo** batterico o fungino, nei confronti degli agenti antiinfettivi potenzialmente attivi sulla specie microbica cui l'isolato appartiene.

Il test consiste nell'espore cariche microbiche *standard* a una serie di concentrazioni definite del farmaco. Affinché i risultati del test siano interpretabili, affidabili e riproducibili, l'antibiogramma deve essere eseguito seguendo criteri *standard* definiti da organismi scientifici internazionali come, ad esempio, l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Per guidare la scelta dell'antibiotico più efficace, i risultati dell'antibiogramma devono poi essere adeguatamente interpretati, tenendo conto di vari fattori, tra cui le informazioni cliniche, relative al paziente, ed epidemiologiche, relative al *setting* in cui si agisce; l'antibiogramma fornisce infatti sia dati utili alla **messa a punto di una terapia mirata**, efficace, per il paziente, che **informazioni di carattere epidemiologico**, necessarie al monitoraggio dell'evoluzione dell'antibiotico-resistenza, all'aggiornamento dello spettro di azione clinico dei diversi antimicrobici, all'adozione di misure di controllo e prevenzione della insorgenza/diffusione delle resistenze, alla messa a punto di terapie antibiotiche empiriche realmente ragionate ecc.

Cosa si intende per MIC? Quali tecniche per determinarla?

Con l'espressione "concentrazione minima inibitoria" anche detta "concentrazione minima inibente" (spesso denominata con l'acronimo "MIC", dall'espressione inglese "minimal inhibitory concentration") si intende la più bassa concentrazione di una sostanza antimicrobica capace di inibire *in vitro* dopo 12-24 ore d'incubazione la crescita di un batterio. E' espressa in mg/L o microgrammi/ml.

La MIC viene determinata *in vitro* saggiando una concentrazione *standard* di microorganismi con una serie scalare di diluizioni di sostanza antibiotica, nel metodo della diluizione in brodo. Più nel dettaglio si allestisce una serie di provette in cui, in un terreno liquido, sono aggiunte a scalare varie dosi dell'antibiotico in esame e quindi viene inoculato il ceppo batterico in oggetto a concentrazione costante. Al termine del periodo di incubazione si rileva la presenza della crescita batterica (ad esempio valutando la torbidità) e tra le provette senza crescita batterica (brodo limpido) quella con minore concentrazione antibiotica indica il valore della minima concentrazione inibente per la coppia batterio/antibiotico indagata.

Questa tecnica di determinazione della MIC può essere effettuata manualmente utilizzando provette standard (macrometodo) oppure manualmente o automaticamente usando micro-piastre collegate a lettori automatici di torbidità (micrometodo). Nella maggior parte dei laboratori trova largo impiego per semplicità e riproducibilità il metodo della microdiluizione automatizzato, che sfrutta pannelli a numerosissimi pozzetti con diluizioni scalari di antibiotici liofilizzati.

Altra tecnica classica di determinazione dell'attività antibiotica è il test di diffusione con dischetti su agar (metodo di Kirby- Bauer). In questa metodica l'antibiotico è contenuto in quantità predefinite su dischetti di cellulosa e da qui diffonde nella piastra d'agar, dove sono stati posti in coltura i batteri. Dopo 18-24 ore d'incubazione è misurato il diametro della zona circolare di inibizione intorno al dischetto. Non è possibile conoscere direttamente il valore della MIC, ma per confronto con valori di riferimento (breakpoints clinici) del diametro di inibizione di crescita batterica è possibile valutare l'attività dell'antibiotico rispetto ad un dato batterio.

I valori di MIC costituiscono strumenti di grande utilità sia per il microbiologo che per il clinico il quale in particolare viene coadiuvato nella scelta della migliore strategia terapeutica, soprattutto in caso di particolari criticità relative, ad esempio, a sedi d'infezione difficili da raggiungere da parte delle terapie, a peculiari condizioni cliniche del paziente, alla presenza di microrganismi multiresistenti ecc.

Ad ogni modo bisogna tener conto che, oltre ad una corretta interpretazione dell'antibiogramma, il risultato terapeutico dipende anche da:

- sito di infezione
- tipo di microrganismo/i
- stato immunitario del paziente
- funzionalità degli organi
- regime posologico del farmaco.

Cosa si intende per Concentrazione minima battericida (MBC)?

Con l'espressione "concentrazione minima battericida" (spesso denominata con l'acronimo "MBC", dall'espressione inglese "minimum bactericidal concentration") si intende la più bassa concentrazione di una sostanza antimicrobica necessaria a provocare la morte di più del 99,9% di una data popolazione microbica". Talvolta la MIC e la MBC coincidono, ed allora si tratta di antibiotici battericidi; in altri casi la MBC ha valori molto più elevanti della MIC e pertanto siamo di fronte ad antibiotici batteriostatici. La MBC è utile nei casi di infezioni gravi in cui bisogna ottenere effetti batterici, come nelle endocarditi, nelle setticemie gravi, nelle meningiti. La mancanza di standardizzazione del test con il quale si determina l'MBC fa sì che nella pratica clinica questo non trova grande impiego. La figura 1 esemplifica la determinazione di MIC e MBC.

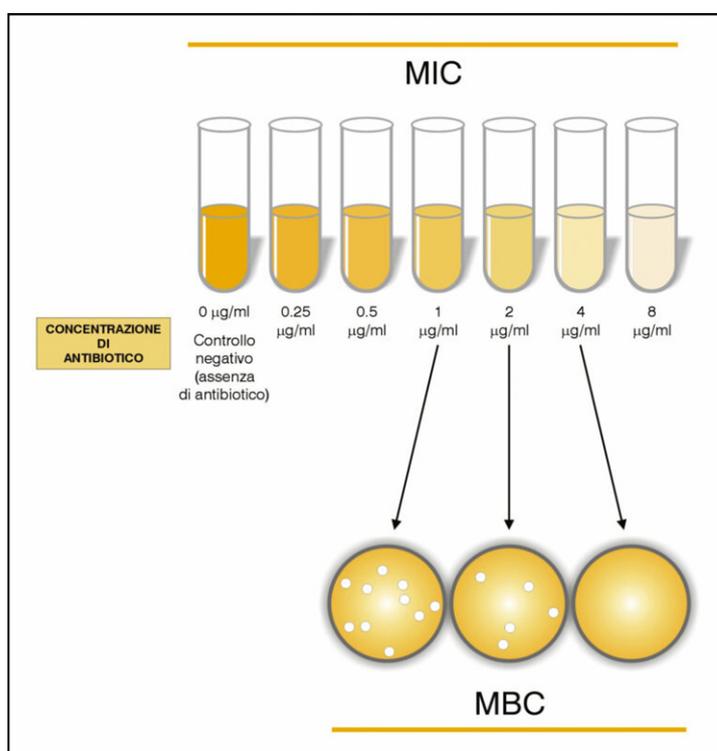


Figura 1: MIC e MBC.

La figura schematizza in alto la determinazione della MIC tramite il metodo per diluizione (la MIC corrisponde alla prima provetta con terreno limpido); in basso: determinazione della MBC (la MBC corrisponde alla concentrazione di antibiotico del primo terreno ove non si rileva crescita batterica). Fonte: <https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/antibiogramma/> (data ultima consultazione 18/08/2022).

Cos'è l'EUCAST? Quali sono le nuove definizioni delle tre categorie interpretative (S, I e R) in vigore dal 2019?

Il Comitato Europeo per i Test di Suscettibilità Antimicrobica (EUCAST) è un comitato scientifico per la definizione di linee guida per l'interpretazione della resistenza antimicrobica. Ad oggi, i *breakpoint* clinici definiti da EUCAST sono gli unici ad essere ufficialmente riconosciuti dall'EMA (European Medicines Agency), organismo che autorizza l'immissione in commercio dei farmaci nei paesi dell'Unione Europea.

I **breakpoints clinici** sono valori soglia (definiti in termini di MIC o di diametro dell'alone d'inibizione) che discriminano la suscettibilità dalla resistenza di determinate specie microbiche a dosaggi di antibiotici raggiungibili *in vivo*. Sono utilizzati per definire la categoria clinica di suscettibilità (S-I-R) e vengono stabiliti ed annualmente aggiornati da EUCAST valutando diversi parametri: microbiologici, farmacologici (rapporto tra PK/PD e risposta al trattamento) e clinici (evidenze dalla letteratura).

Recentemente EUCAST ha modificato le definizioni delle categorie di suscettibilità S, I e R, che ad oggi si interpretano:

S - Sensibile, regime di dosaggio standard: un microrganismo è classificato come "S", quando esiste un'elevata probabilità di successo terapeutico utilizzando un regime di dosaggio standard dell'antibiotico.

I - Sensibile, aumento dell'esposizione*: un microrganismo è classificato come "I" quando vi è un'elevata probabilità di successo terapeutico allorché l'esposizione all'antibiotico viene aumentata modificandone il regime posologico e aumentandone dunque la concentrazione nel sito di infezione.

R - Resistente: un microrganismo è classificato come "R" quando esiste un'elevata probabilità di fallimento terapeutico anche quando vi è una maggiore esposizione all'antibiotico.

* L'esposizione è una funzione di come la modalità di somministrazione, la dose, l'intervallo di somministrazione, il tempo di infusione, nonché la distribuzione e l'escrezione dell'agente antimicrobico ne influenzeranno l'efficacia verso l'organismo infettante nel sito di infezione. La figura 2, che segue, esemplifica come si applicano in laboratorio i valori di breakpoint alle MIC ottenute, al fine di capire in quale categoria di suscettibilità ricade un certo antibiotico rispetto ad un determinato microorganismo.

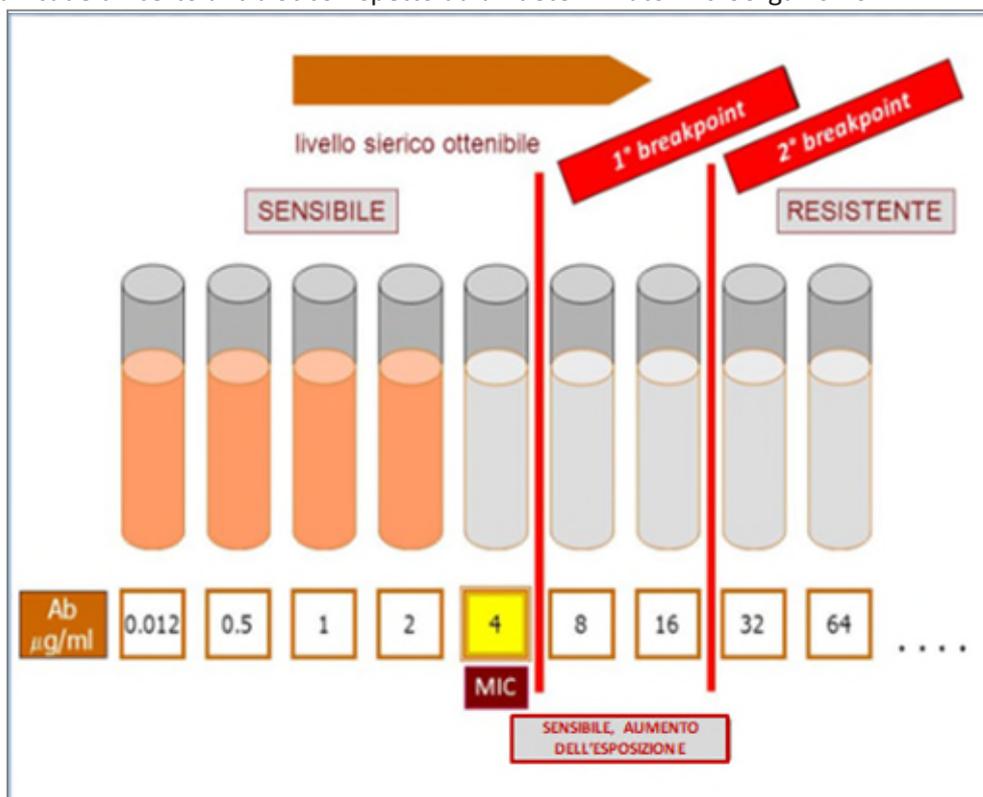


Figura 2: correlazione tra breakpoints e categorie interpretative.

Le Mic vengono rapportate a valori soglia, i breakpoint, definiti dall'EUCAST e i risultati ottenuti possono essere tradotti nelle cosiddette categorie di interpretazione: sensibile; sensibile, aumento dell'esposizione; resistente. Fonte:

Il Cut-off epidemiologico

Un altro parametro preso in considerazione dall'EUCAST è il **cut-off epidemiologico (ECOFF)**, definito come il valore di MIC che divide i ceppi "wild type" (che non hanno meccanismi di resistenza acquisita e mutazioni) dalla popolazione di ceppi che hanno sviluppato meccanismi di resistenza (figura 3); in altre parole i ceppi con MIC sotto ECOFF hanno bassissima probabilità di sviluppare la resistenza in corso di trattamento con quel dato antibiotico.

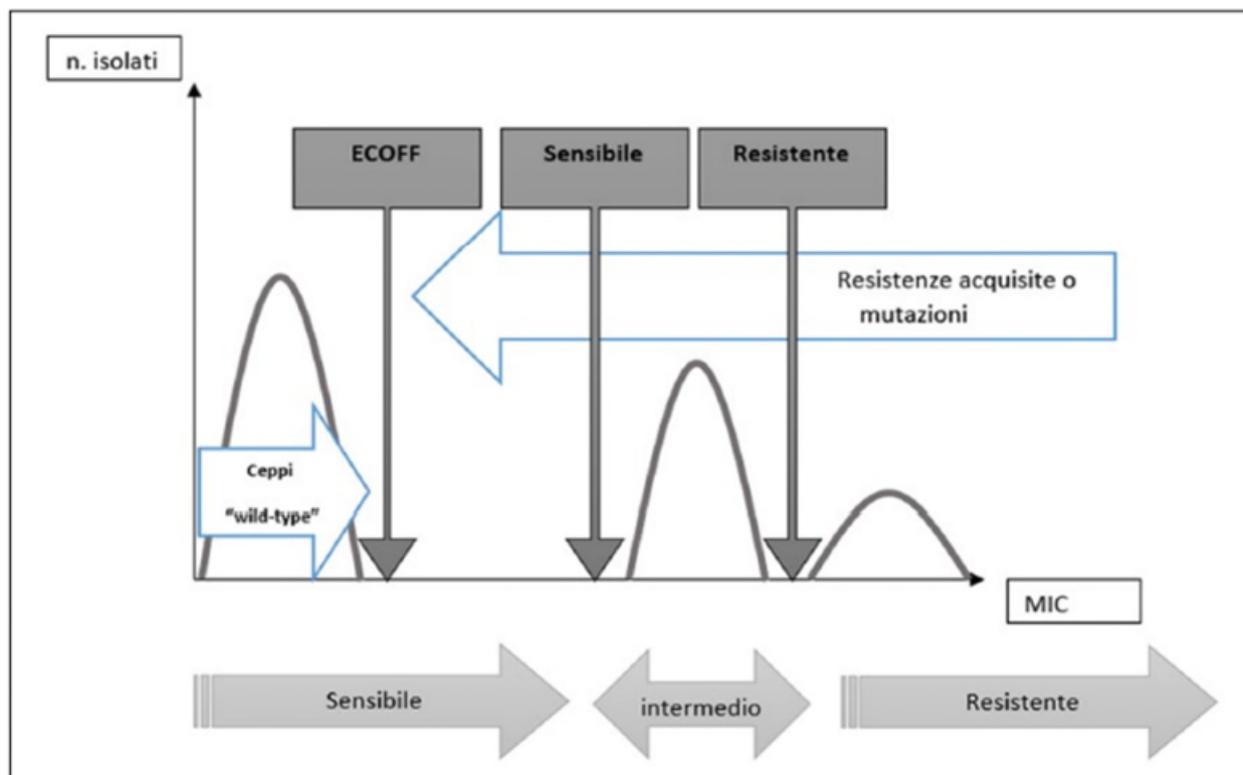


Figura 3: il Cut off epidemiologico (ECOFF).

L'ECOFF divide i ceppi wild type, privi di mutazioni, dai ceppi che presentano mutazioni; i breakpoints costituiscono invece cut-off che categorizzano ogni combinazione antibiotico – microorganismo in una delle 3 categorie di sensibilità: sensibile; sensibile, aumento dell'esposizione (precedentemente al 2019: "intermedio", vedere anche link <https://www.eucast.org/newsiandr/> data ultima consultazione 18/08/2022); resistente. Fonte: C. Tascini. Antibiotic stewardship: ripartiamo dalla pratica clinica. Urologia Journal 2018, Vol. 85(1S) S20–S23.

Nella maggior parte dei casi *cut-off* epidemiologico e *breakpoint* di sensibilità coincidono, come per *S. aureus* e vancomicina. In altri casi taluni fattori farmacocinetici/farmacodinamici e clinici portano a differenziare il *breakpoint* clinico dal *cut-off* epidemiologico, come ad esempio *E. coli* e ciprofloxacina.

I *breakpoints* sono, in questo caso, $S \leq 0,5$ mg/L e $R \geq 1$ mg/L ed il *cut-off* epidemiologico è 0,032 mg/L.

Refertazione dell'antibiogramma

Nel referto dell'antibiogramma di solito viene indicato (figura 4):

- la tipologia di campione prelevato;
- il microrganismo/i isolato/i;
- la carica batterica, indicata in CFU/ml (unità formanti colonia/ml);
- i vari antibiotici testati associati al valore di MIC

- il valore o i valori di breakpoint clinico
- l'interpretazione in una delle tre categorie interpretative (S-I-R)

AZIENDA OSPEDALIERA UNIVERSITARIA [REDACTED]
 U.O. MICROBIOLOGIA
 Responsabile Prof. [REDACTED]
 P.O. [REDACTED], via [REDACTED] - [REDACTED]
 tel. [REDACTED] fax [REDACTED]

Rif. : [REDACTED] [REDACTED]
 T.sanit. : 0000000080445-CR D/Nascita : [REDACTED]
 Reparto : Ematologia Adulti Prelievo del : [REDACTED]
 Referto del : [REDACTED]

ESAME RICHIESTO	RISULTATO	U.d.M	CUT-OFF
Batteriologia			
Tampone faringeo	Tampone Faringeo		
Materiale in esame	Positivo		
Esame colturale	Assenza di miceti		
Ricerca Miceti			
Isolamenti e Antibiogrammi			
I germe isolato	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Antibiogramma per <i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
Antibiotico	M.I.C.	Interpretazione	

ampicillina	>=32	R	
ampicillina/sulbactam	>=32	R	
cefazolin	>=64	R	
cefepime	4	S	
cefixime	>=4	R	
cefotaxime	>=64	R	
ceftazidime	8	S	
ciprofloxacina	<=0,25	S	
gentamicina	2	S	
imipenem	2	S	
levofloxacina	0,5	S	
meropenem	0,5	S	
mezlocillina	>=128	R	
norfloxacina	1	S	
piperacillina	16	S	
piperacillina/tazobactam	>=128	R	
tetraciclina	>=16	R	
tobramicina	<=1	S	
trimetoprim/sulfametoxazolo	40	R	
cefuroxime-sodio	>=64	R	
cefuroxime-acetil	>=64	R	

LEGENDA: I valori di M.I.C. Minima Concentrazione Inibente sono espressi in mcg/mL. S=Sensibile, I=Intermedio, R=Resistente

Figura 4: esempio di refertazione di antibiogramma.

Il referto deve contenere tutte le informazioni, quali il tipo di campione di provenienza, utili a contestualizzare i valori rilevati e definire da parte del clinico la migliore strategia terapeutica. Fonte: <https://www.wikiwand.com/it/Antibiogramma> (data ultima consultazione 18/08/2022).

Se un antibiogramma non riporta per ciascun antibiotico la MIC ma solo la categoria interpretativa significa che il laboratorio di Microbiologia ha utilizzato come metodo per l'esecuzione dell'antibiogramma il test di Kirby-Bauer (metodo per diffusione), mentre la MIC viene ottenuta tramite i metodi basati sulla diluizione.

Come si interpretano le MIC?

Per interpretare la MIC in modo corretto occorre anzitutto considerare che:

> Valori preceduti da segno \leq indicano che la crescita del microrganismo è stata inibita dalla più bassa concentrazione dell'antibiotico testato esprimendo, quindi, una notevole sensibilità, indipendentemente dal valore numerico.

Esempio:

MIC antibiotico X \leq 8; MIC antibiotico Y \leq 0,5

Il microrganismo si è dimostrato tanto sensibile a X quanto a Y.

> Tanto più la **MIC sarà vicina al valore di breakpoint** tanto più vi sarà rischio di fallimento terapeutico.

Il confronto delle MIC di diversi antibiotici non si basa sul valore numerico, ma soprattutto su quanto dista la MIC dal suo valore di breakpoint clinico. Più è distante la MIC dal valore di breakpoint minore è la probabilità di insorgenza di resistenza. Per la scelta della terapia mirata quindi non si dovrebbero mai confrontare i valori di MIC dei vari antibiotici refertati alla ricerca del valore minore, in quanto un antibiotico con un valore MIC di 0,25 mg/L può essere meno efficace di uno con un valore MIC di 4 mg/L.

> Se il valore di **MIC è \geq** questo indica come la crescita non sia stata inibita dalla massima concentrazione utilizzata e suggeriscono quindi una resistenza elevata allora si ha la massima resistenza per quel principio attivo.

> A parità di sensibilità/MIC, meglio prediligere molecole a **spettro** ristretto rispetto a quelle a spettro più ampio in modo da non sollecitare meccanismi di resistenza (ad esempio meglio ceftriaxone rispetto a ceftazidime o piperacillina/tazobactam).

> Considerare farmacocinetica e farmacodinamica (ad esempio il principio attivo oltre che essere efficace *in vitro* deve poter raggiungere il sito di infezione e concentrarsi adeguatamente, deve essere di facile assorbimento ed avere una buona biodisponibilità).

> Considerare se il farmaco è dose-dipendente (in questo caso ha senso aumentare o modificare la dose) oppure tempo-dipendente (e in questo caso è più opportuno ragionare in termini di aumento della frequenza delle somministrazioni da SID a BID o TID). Ricordiamo le classi di antibiotici tempo dipendenti che sono: macrolidi, clindamicina, tutti i betalattamici. Antibiotici dose dipendenti sono invece: fluorochinolonici, aminoglicosidi, daptomicina.

In quali casi non si eseguono le MIC?

Non si eseguono le MIC ad esempio se il microrganismo è noto per essere intrinsecamente resistente ad un determinato antibiotico, oppure se i risultati delle colture microbiologiche da siti non sterili evidenziano la presenza di una flora microbica residente, ovvero di microrganismi che costituiscono il microbiota commensale di un determinato distretto anatomico.

In quali casi si eseguono le MIC ma non viene refertata la categoria interpretativa?

1) Quando EUCAST per alcune associazioni di microrganismo/antibiotico non ha ancora determinato i valori di breakpoint clinico ma ha comunque determinato i valori di breakpoint PK-PD.

L'integrazione dei modelli farmacocinetici e farmacodinamici, definita "cinetica-dinamica (PK/PD)", può fornire un'affidabile rappresentazione dell'andamento nel tempo della risposta farmacologica e conseguentemente permettere l'ottimizzazione delle terapie per ciò che concerne le dosi, gli intervalli e le vie di somministrazione. Gli obiettivi sono garantire il mantenimento delle concentrazioni efficaci nel sito d'azione; massimizzare l'effetto terapeutico; ridurre il più possibile gli eventuali effetti avversi. Negli ultimi

20 anni lo studio delle correlazioni PK/PD ha avuto ampio sviluppo ed applicazione nel contesto della terapia infettiva.

In questi casi il Microbiologo clinico può comunque refertare i valori di MIC per gli antibiotici in associazione ai *breakpoint* PK-PD, se forniti da EUCAST. I *breakpoint* PK-PD sono dipendenti dal regime farmacologico (indipendenti dalla specie) e pertanto è possibile ottenere diversi *breakpoint* PK-PD per lo stesso antibiotico. Valori di MIC inferiori o uguali ai valori di *breakpoint* PK-PD indicano quali farmaci potrebbero essere efficaci in vivo. È il caso ad esempio della tigeciclina per Enterobacterales (esclusi *Escherichia coli* e *Citrobacter koseri*): EUCAST suggerisce che la tigeciclina ad alte dosi possa essere presa in considerazione in pazienti gravemente malati infetti da agenti patogeni resistenti a tutte le altre classi di antimicrobici (MDR). Il PK-PD della tigeciclina ad alto dosaggio prevede che i ceppi MDR con MIC di tigeciclina fino a 1 mg/L risponderanno al trattamento.

2) Quando EUCAST per alcune associazioni di microrganismo/antibiotico non ha ancora né determinato i valori di breakpoint clinico né i valori di breakpoint PK-PD.

In questi casi EUCAST ritiene comunque utile determinare se la MIC per l'isolato è inferiore al cut-off epidemiologico (quindi siamo in presenza di un ceppo Wild Type). Ciò indicherebbe che il ceppo batterico in questione non ha acquisito meccanismi di resistenza all'antibiotico in questione. Se l'isolato è una specie di raro riscontro clinico può essere utile consultare la letteratura scientifica per verificare i dati di MIC ottenuti. È chiaro che in questi casi particolari il confronto fra Microbiologo e Clinico risulta ancor più essenziale ai fini diagnostico-terapeutici.

Molecole refertate, molecole equivalenti, sinergie

Solitamente non è possibile testare tutti gli antibiotici utilizzabili in clinica per un dato isolato batterico, per questo vengono previste nei diversi profili dell'antibiogramma le molecole effettivamente indispensabili per la terapia mirata, oppure quelle "di riferimento", la cui valutazione può essere predittiva dell'attività di altre molecole non testate. Facciamo alcuni esempi:

Isolati clinici di *Staphylococcus* spp. resistenti alla penicillina e sensibili all'oxacillina, sono in genere produttori di beta-lattamasi e quindi resistenti a tutte le penicilline inattivate da tale enzima, ma risultano ancora sensibili alle associazioni con inibitori di beta-lattamasi, a meticillina, cloxacillina e alle cefalosporine. Ceppi di *Staphylococcus* spp. resistenti all'oxacillina vanno invece considerati resistenti a tutti i beta-lattamici. *Streptococcus pyogenes* è sensibile a penicillina e ampicillina e non produce beta-lattamasi (inutile testare quindi associazioni del tipo amoxicillina-acido clavulanico). Tra gli streptococchi beta-emolitici, la sensibilità alle penicilline è tuttora la regola; isolati sensibili alla penicillina sono sensibili anche ad ampicillina, amoxicillina e cefalosporine. Gli streptococchi viridanti invece mostrano una resistenza più varia verso i beta-lattamici e la sensibilità alle cefalosporine non può essere predetta dalla sola sensibilità alla penicillina.

Può risultare utile testare la sensibilità di *Enterococcus* spp. per antibiotici come ampicillina (o glicopeptidi) e aminoglicosidi per ottenere un effetto sinergico in terapia (la combinazione di antibiotici può cioè produrre un effetto totale maggiore della somma degli effetti delle singole molecole).

Note/commenti ad integrazione del referto

In alcuni casi il referto può essere integrato da note o commenti utili per interpretare e utilizzare al meglio il referto stesso, ad esempio, nel caso di Enterobacterales con MIC ai carbapenemici superiori ai valori di *breakpoint* di resistenza, il Microbiologo clinico può e deve aggiungere un commento che segnala se il ceppo è produttore di carbapenemasi di tipo KPC, NDM, VIM o IMP oppure OXA-48. In questi casi il Microbiologo avrà cura inoltre di fornire quanto prima al Clinico le MIC dei nuovi farmaci come il Ceftolozano/tazobactam e il Ceftazidime/avibactam, oppure eseguirà ulteriori metodi di sensibilità antimicrobica per i farmaci efficaci

contro questi germi MDR (Fosfomicina, Colistina, Gentamicina), al fine di garantire al Clinico valori di MIC affidabili.

Campionatura

Esecuzione del prelievo per successivo antibiogramma: si prelevano dei campioni colturali che vengono inviati al laboratorio di Microbiologia dove saranno successivamente analizzati per evidenziare la presenza o meno di un agente patogeno e il suo profilo di sensibilità/resistenza agli agenti antimicrobici.

I campioni raccolti possono essere di varie tipologie:

- sangue per le emocolture;
- urine per l'urinocoltura;
- broncoaspirato;
- tamponi effettuati sulle ferite;
- liquido pleurico o peritoneale.

INTERPRETAZIONE DELL'ANTIBIOGRAMMA

Quali parametri considerare per interpretare l'antibiogramma?

Interpretare l'antibiogramma non presuppone la sola lettura dei valori di MIC, ovvero i dati ottenuti *in vitro* dai test microbiologici.

L'efficacia in vivo, infatti, dipende dal concatenarsi di una serie di fattori che includono:

1. **Parametri farmacocinetici e farmacodinamici dell'antibiotico.**
2. Il **sito di infezione e la capacità dell'antibiotico di raggiungerlo a dosi terapeutiche; impatto delle comorbidità.**
3. La **conoscenza di meccanismi di resistenza intrinseci ed acquisiti dei microrganismi.** Alcuni antibiotici infatti, seppure sensibili non possono essere usati in monoterapia in quanto inducono facilmente e velocemente resistenza (ad esempio rifampicina *versus* stafilococchi, fosfomicina *versus* Gram-). *Conditio sine qua non* per una corretta scelta è dunque la conoscenza preliminare dei meccanismi di resistenza che il microrganismo testato potenzialmente potrebbe mettere in atto.

1. Parametri farmacocinetici e farmacodinamici da conoscere nella scelta di un antibiotico

La conoscenza delle proprietà chimico-fisiche degli antibiotici è un aspetto da considerare nella scelta ragionata di un antibiotico.

I parametri da valutare sono:

- **Solubilità:** a questo proposito ricordiamo che tetracicline, eritromicina e fluorochinoloni sono molecole lipofile e attraversano più facilmente la membrana cellulare rispetto a composti solubili in acqua come i B-lattamici, aminoglicosidi e vancomicina ed è per questo che costituiscono le uniche opzioni terapeutiche per microrganismi intracellulari come *Mycoplasma*, *Legionella*, *Clamidia* verso i quali non sarebbe efficace la terapia con beta-lattamici (ad esempio nei pazienti settici in relazione ad un alterato equilibrio emodinamico è possibile che necessiti una loading-dose più alta per le molecole idrofiliche, come ad esempio per terapie con beta-lattamici mentre non sono richiesti aggiustamenti per le molecole lipofile).

- **Legame con le proteine plasmatiche:** solo la quota libera è quella efficace clinicamente; essendo l'albumina la proteina plasmatica maggiormente presente nel circolo ematico; l'albuminemia è da valutare negli aggiustamenti di dosaggio, soprattutto di antibiotici con alto legame alle proteine plasmatiche. Ad esempio in una terapia con la daptomicina il legame del farmaco con le proteine plasmatiche è particolarmente elevato, pari a circa il 90%, soprattutto con l'albumina; va considerato però che tale legame è indipendente dalla concentrazione e reversibile e ciò si traduce in una sua elevata biodisponibilità, indipendentemente dalla posologia; un altro antibiotico con elevato legame alle proteine plasmatiche è la teicoplanina, che viene solitamente somministrata con una dose di carico, tale da saturare i legami proteici ed aumentare la quota libera di farmaco più velocemente.

- **Clearance:** costituisce un parametro fondamentale di cui tenere conto in particolare nelle modifiche di dosaggio in pazienti con insufficienza renale e/o epatica.

Molte variabili possono influenzare la clearance renale degli antibiotici idrofili: in pazienti con ipoalbuminemia antibiotici con alto legame alle proteine plasmatiche sono escreti più velocemente; in condizioni di sepsi e quindi di aumentata perfusione renale la clearance renale può aumentare fino a tre volte il valore normale. Il monitoraggio della funzionalità renale può anche rendersi necessario nel contesto di terapie potenzialmente nefrotossiche (ad esempio vancomicina e aminoglicosidi). Per i beta lattamici la

correzione di dose evita l'accumulo di farmaco e quindi gli effetti avversi, ma non c'è una vera e propria nefrotossicità.

- **Rapporto PK/PD:** Un altro fattore da conoscere per impostare una terapia antibiotica corretta, con un regime posologico efficace clinicamente, è il rapporto tra la farmacocinetica e la farmacodinamica di una specifica classe di antibiotici e della singola molecola, il cosiddetto **rapporto PK/PD**.

Questo è il risultato della correlazione tra i parametri farmacocinetici (C_{max} , AUC) e quelli farmacodinamici (MIC, distribuzione al sito d'azione). La figura 5 mostra come la biodisponibilità sia del 100% dopo somministrazione endovenosa di un farmaco.

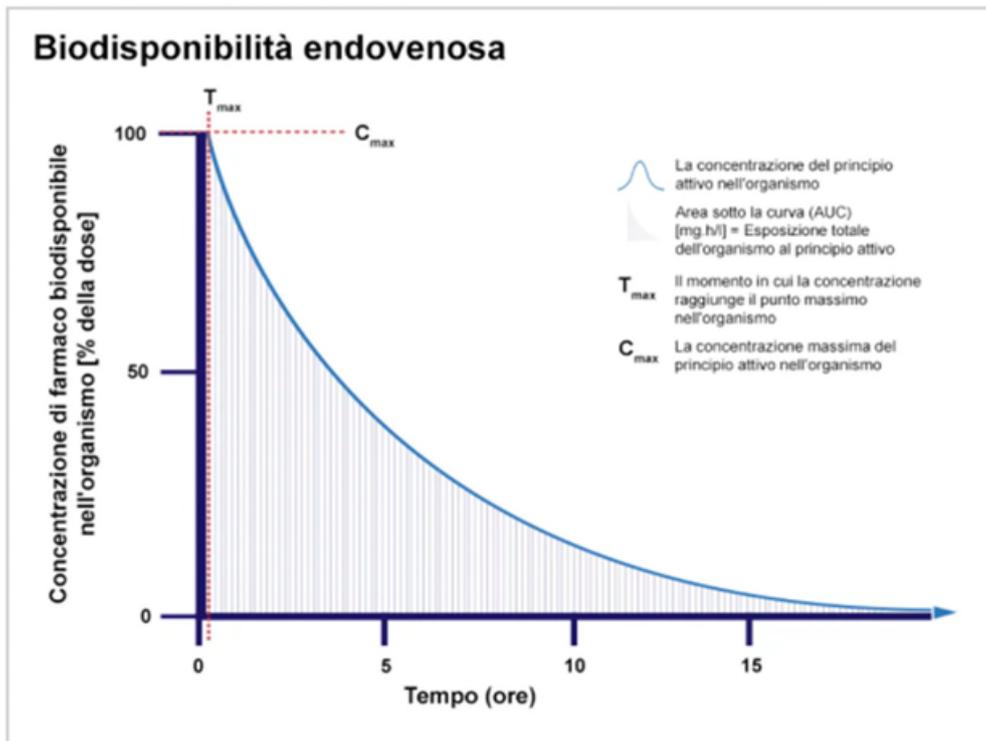


Figura 5: biodisponibilità endovenosa.

La figura evidenzia l'AUC, il T_{max} e la C_{max} dopo somministrazione endovenosa di un medicinale. Fonte: <https://toolbox.eupati.eu/resources/biodisponibilita-e-bioequivalenza/?lang=it> (data ultima consultazione 18/08/2022).

Possiamo suddividere gli antibiotici in due classi: **concentrazione-dipendenti** e **tempo-dipendenti** (tabella n°1).

Nei primi il principale determinante di efficacia è il **rapporto C_{max}/MIC** , che deve sempre essere mantenuto sopra un certo livello per massimizzare l'efficacia: gli aminoglicosidi, ad esempio, devono raggiungere concentrazioni al sito di infezione di circa otto – dieci volte superiori al valore di MIC per esplicare la loro attività battericida.

In linea generale, gli antibiotici con un profilo concentrazione-dipendente esplicano la loro azione se rapporto C_{max}/MIC è molto alto anche per brevi periodi della giornata; è in relazione a questo che si effettuano prelievi ematici multipli per valutare la concentrazione plasmatica nel tempo. La daptomicina è un classico esempio di farmaco concentrazione-dipendente: al dosaggio di 4 mg/kg viene somministrato una volta ogni 24 ore.

Altro determinante di efficacia per i concentrazione-dipendenti è il **rapporto AUC/MIC**, ovvero la misura dell'esposizione al farmaco su un periodo di 24 ore, che correla con l'efficacia, e questo rappresenta un parametro importante per i fluorchinoloni.

Per gli antibiotici **tempo-dipendenti**, invece, è fondamentale mantenere la concentrazione sempre al di sopra della MIC; per farlo si somministrano in dosi frazionate durante la giornata; oxacillina, cefotaxime, piperacillina, ceftazidime, cefepime, vancomicina sono spesso somministrate anche in infusione continua per massimizzare l'efficacia; questa opzione non è percorribile per i carbapenemici, i quali hanno una stabilità di poche ore a temperatura ambiente: per questo è consigliabile un'infusione di 3-4 ore frazionata durante la giornata. Il determinante dell'efficacia in questo caso è il **tempo sopra la MIC** (T>MIC)

Concentrazione dipendenti (Monosomministrazione)	Tempo dipendenti (Somministrazione frazionata)
Aminoglicosidi	Beta-lattamici
Fluorochinoloni	Oxazolidinoni
Metronidazolo	Glicopeptidi
Tetracicline	Clindamicina
Daptomicina	Macrolidi
Colistina	

Tabella n°1: esempi di antibiotici concentrazione – dipendenti e di antibiotici tempo – dipendenti.

Nella tabella n°2 sottostante si schematizzano i parametri salienti in relazione alle classi di antibiotici di maggior utilizzo:

Antibiotico	Solubilità	Volume di distribuzione	Legame alle proteine plasmatiche	Clearance
Beta-lattamici	Idrosolubili	Basso	Basso (*)	Renale
Macrolidi	Liposolubili	Alto	70% Claritromicina, 20% Azitromicina	Epatico
Aminoglicosidi	Idrosolubili	Basso	Basso	Renale
Glicopeptidi	Idrosolubili	Basso	60% Teicoplanina, 10% Vancomicina	Renale
Fluorochinoloni	Liposolubili	Alto	Basso	Renale (#)
Rifampicina	Liposolubile	Alto	70% (Alto)	Epatico
Linezolid	Liposolubile	Alto	30%	Epatico
Tigeciclina	Liposolubile	Alto	Alto (80%)	Epatico
Colistina	Liposolubile	Alto	Basso	Epatico

Tabella n°2: parametri farmacocinetici relativi alle principali classi di antibiotici.

* eccetto ceftriaxone, cefazolina, ertapenem, alto legame alle proteine plasmatiche

eccetto moxifloxacin, eliminazione epatica

Per utilizzare correttamente gli antibiotici è importante sapere se esplicano **attività batteriostatica** (inibizione della crescita dei batteri) e/o attività **battericida** (uccisione dei batteri); talvolta lo stesso farmaco può essere sia battericida che batteriostatico a seconda del patogeno. Le penicilline, per esempio, sono

battericide contro gli pneumococchi, ma batteriostatiche contro gli enterococchi (tabella n°3). Il possedere un'attività batteriostatica o battericida risulta un'informazione rilevante negli stati settici, in cui è fondamentale adottare antibiotici con attività battericida (ad esempio la tigeciclina, batteriostatica, non va presa in considerazione nelle setticemie da Gram -).

Battericidi	Batteriostatici
Beta-lattamici	Macrolidi *
Glicopeptidi	Tetracicline
Aminoglicosidi	Cloramfenicolo
Fluorochinoloni	Sulfamidici
Rifamicine	Lincosamidi
Metronidazolo	Oxazolidinoni *
Polimixine	Nitrofurantoina

Tabella n°3: principali classi di antibiotici e loro attività battericida o batteriostatica.

In ultimo, altro fattore farmacodinamico molto importante per stabilire la frequenza di somministrazione di un antibiotico è l'effetto post-antibiotico (**PAE, Post Antibiotic Effect**), vedere la tabella n°4. In linea generale, tutti gli antibiotici attivi verso i Gram+ manifestano un certo effetto post-sospensione, con valori che variano da meno di 2 ore per i beta-lattamici a più di 5 per la vancomicina nei confronti di *S. aureus*. Antibiotici che agiscono sulla sintesi degli acidi nucleici, come gli aminoglicosidi e i fluorochinoloni, tendono ad esibire il PAE contro tutti gli agenti batterici. Aminoglicosidi e daptomicina, che possiedono un elevato PAE, sono somministrati una sola volta al giorno.

Antibiotico	Indice PK/PD	PAE (vs Gram -)	Somministrazione
Beta-lattamici	T>MIC	Minimo *	Frazionata e/o infusione prolungata
Glicopeptidi	AUC/MIC	Nulla	Flessibile
Fluorochinoloni	AUC/MIC; Cmax/MIC	Prolungato	Unica dose o bisomministrazione; alte dosi
Aminoglicosidi	Cmax/MIC; AUC/MIC	Prolungato	Unica dose o bisomministrazione; alte dosi **

Tabella n°4: entità dell'effetto post-antibiotico in talune classi di antibiotici.

* Eccetto Carbapenemici: effetto prolungato

** Eccetto nelle endocarditi enterococciche: basse dosi, maggior frequenza di somministrazioni.

2. Sito di infezione e la capacità dell'antibiotico di raggiungerlo a dosi terapeutiche; impatto delle comorbidità

I parametri farmacocinetici analizzati sono un riferimento importante da conoscere e correlare con il sito di infezione, al fine di poter prevedere se l'antibiotico da scegliere all'interno dell'antibiogramma possa raggiungere concentrazioni sufficienti per un'efficacia clinica.

Inoltre, ricordiamo che le esposizioni al sito d'azione sono influenzate da alterazioni fisiopatologiche del paziente, quali ridotta funzionalità epatica e/o alterata funzionalità renale, sepsi e ustioni.

Quando il sito d'infezione principale è il sangue, dal punto di vista della farmacocinetica l'effetto dell'antibiotico risulta maggiormente prevedibile, in quanto il sangue rappresenta il classico modello farmacocinetico monocompartimentale.

Quando il modello monocompartimentale non viene mantenuto, ad esempio in caso di pazienti con importante extravasazione di fluidi (sepsi, pazienti ricoverati in terapia intensiva) a cui sono somministrati cristalloidi, soluzioni per ripristino volemico, è da considerare un aumento di dosaggio di antibiotici idrofili ed escreti per via renale.

La maggior parte delle infezioni sono extravascolari e rispondono ad un modello farmacocinetico più complesso di quello monocompartimentale, ed il trattamento di infezioni in questi siti dipende dal movimento dell'antibiotico dal plasma al fluido interstiziale e qualche volta a quello intracellulare. L'abilità del farmaco di trasferirsi dipende, oltre che dalle sue caratteristiche intrinseche deducibili dal paragrafo precedente, anche da fattori tessuto-correlati come la perfusione sanguigna e la superficie vascolare a livello del tessuto. Comorbidità come l'insufficienza vascolare periferica alterano il raggiungimento di livelli terapeuticamente efficaci.

Le considerazioni fatte finora valgono in condizioni fisiopatologiche "normali"; in un paziente "critico", come per esempio un paziente ricoverato in terapia intensiva, sono da tener presenti due fenomeni principali:

- La *variazione dei fluidi extracellulari*, che risultano aumentati in caso di versamento pleurico, ascite, terapia con fluidi per ripristino volemico, edema, ipoalbuminemia; in tutti questi casi si ha diluizione e perdita di antibiotici idrofili ed è quindi da prendere in considerazione un aumento della dose;
- La *variazione della clearance renale*: se aumentata nei pazienti ustionati, in shock settico, ipoalbuminemici è da considerare un aumento della dose; se ridotta per insufficienza renale, è da prendere in considerazione una riduzione della dose di farmaci escreti attraverso questa via (idrofili).

In caso di antibiotici liofili considerare una riduzione della dose se il paziente presenta insufficienza epatica moderata e/o severa.

Interpretare la resistenza e la suscettibilità di un microorganismo a un antibiotico

La **resistenza** è una delle maggiori limitazioni al successo della terapia antibiotica.

È possibile distinguere due tipologie di resistenza:

1. **Resistenza primaria** (o naturale): il microorganismo è intrinsecamente insensibile a un determinato antibiotico; ad esempio tutti i batteri Gram+ sono intrinsecamente resistenti ad aztreonam, temocillina, polimixina B, colistina;
2. **Resistenza acquisita**: compare all'interno di una popolazione intrinsecamente sensibile, a causa di una mutazione genetica.

L'uso diffuso di antibiotici favorisce l'acquisizione di mutazioni spontanee tali da comprometterne l'efficacia. Alcune di queste mutazioni vengono trasmesse da batterio a batterio, anche di specie diverse, tramite piccole parti di DNA extra cromosomiche, dette plasmidi, contenenti geni di resistenza.

In generale, le modalità con cui si possono esprimere tali resistenze sono varie e comprendono (figura 6):

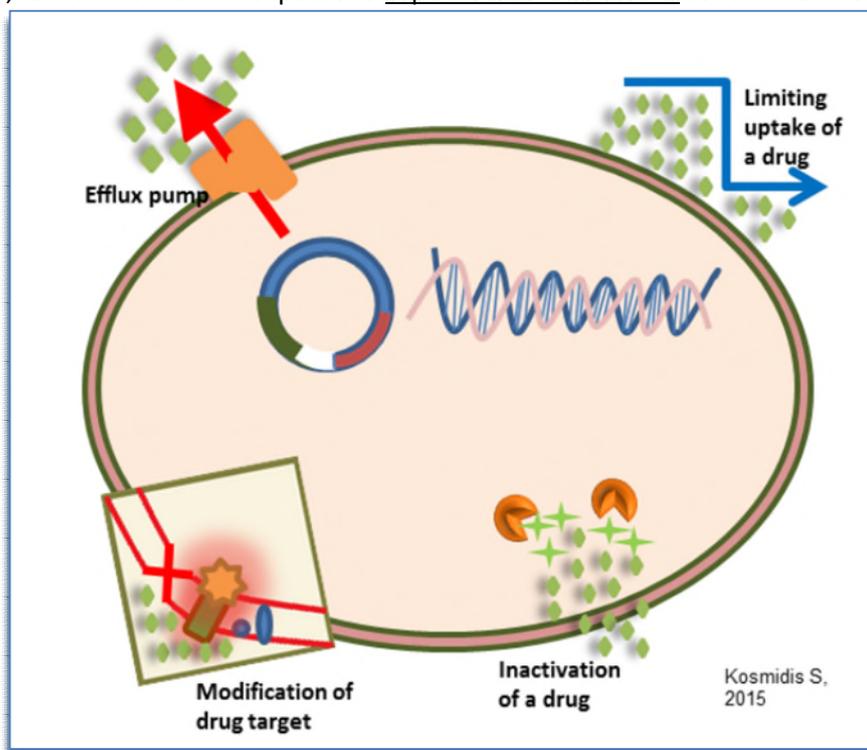


Figura 6: principali meccanismi di resistenza dei batteri.

Fonte: Wanda C Reygaert. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria[J]. AIMS Microbiology, 2018, 4(3): 482-501.

- modificazioni del sito attivo/d'azione dell'antibiotico (ad esempio, modifiche della DNA-girasi II su cui agiscono i chinoloni);
- diminuita permeabilità della membrana batterica (ad esempio, modificazioni del trasporto attivo di aminoglicosidi o tetracicline);
- produzione di enzimi inattivanti l'antibiotico (quali le *beta*-lattamasi).

Tra le modificazioni del sito d'azione si può annoverare la meticillino-resistenza in *S. aureus*, che codifica un gene, il quale produce *Penicillin binding protein* (PBP) con bassa affinità alle penicilline.

La ridotta permeabilità della membrana esterna dei Gram-negativi è un meccanismo comune di resistenza estrinseca agli antibiotici, che ad esempio si può riscontrare nel caso del *P. aeruginosa* dove mutazioni a carico dei canali delle porine non permettono l'ingresso dei carbapenemi.

Il concetto alla base dell'interpretazione corretta dell'antibiogramma è la conoscenza dei principali meccanismi di resistenza del microorganismo responsabile dell'infezione.

Oltre alle resistenze intrinseche possono manifestarsi dei fenotipi di resistenza “eccezionali”, che rappresentano l’espressione di alcune specie batteriche che si verificano raramente o per la prima volta; questi fenomeni devono essere monitorati, potendo indicare un errore identificativo e/o tecnico.

Se confermato “localmente”, il ceppo batterico in esame dovrebbe essere inviato ad un Centro di riferimento per una conferma “indipendente”. Tali fenotipi di resistenza possono cambiare con il tempo e variano in relazione a differenze geografiche.

Esempi:

- Staphylococcus aureus resistente a vancomicina
- Enterococcus faecium sensibile ad ampicillina
- Streptococcus pyogenes resistente alla penicillina
- Enterobacteriaceae resistenti a carbapenemici
- Anaerobi resistenti a metronidazolo.

Meccanismo di largo interesse nell’ambito della lettura dell’antibiogramma è la produzione da parte di taluni microrganismi di specifiche **beta-lattamasi** in grado di inattivare una gran parte degli antibiotici ad oggi in commercio.

L’insorgenza sempre più diffusa di nuove classi di *beta*-lattamasi è andata di pari passo con la disponibilità ed il conseguente impiego di nuovi farmaci.

La **classificazione di Ambler** delle *beta*-lattamasi espresse dai germi Gram – Enterobacterales raggruppa quest’ultime in 4 classi molecolari (A,B,C,D) evidenziando come l’evoluzione delle resistenze è andata di pari passo con la disponibilità di nuove terapie; in particolare le prime *beta*-lattamasi acquisite (negli anni Sessanta) appartenevano alla classe A (TEM-1, TEM-2, SHV-1) ed erano sensibili agli inibitori suicidi come sulbactam, tazobactam, e acido clavulanico ma resistenti alle penicilline e le cefalosporine a spettro ristretto (figura 7).

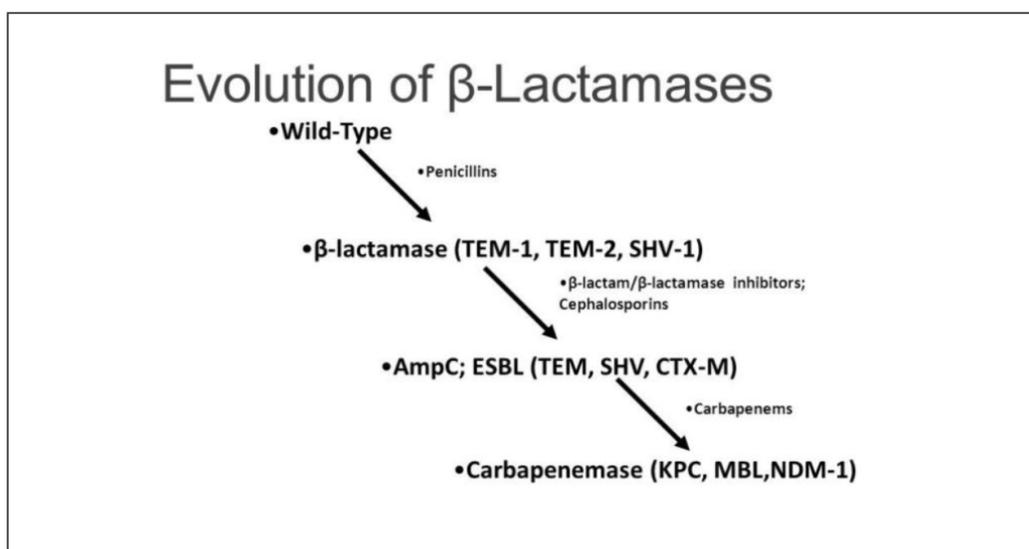


Figura 7: evoluzione delle beta-lattamasi.

Fonte:

https://www.ausl.re.it/WsDocuments/OSSIPRANDI_Valutazione%20della%20diffusione%20di%20Enterobacteriaceae%20.pdf (data ultima consultazione 18/08/2022).

Il successivo impiego su larga scala in ambito clinico delle cefalosporine a spettro espanso (ECS) quali cefotaxime, ceftriaxone e ceftazidime, resistenti alle beta lattamasi ad ampio spettro di tipo TEM e SHV, ha causato ulteriore pressione selettiva e ha sviluppato enzimi con mutazioni puntiformi, in grado di idrolizzare anche le ESC (quali ad esempio TEM-3, TEM-10, SHV-5) e ha reclutato nuove beta-lattamasi naturalmente

attive sulle ESC (es CTX-M, GES). La diffusione di ceppi di Enterobacterales produttori di questi enzimi, denominati complessivamente beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL, figura 8), ha assunto in tempi relativamente brevi una dimensione pandemica e trans-settoriale, interessando anche l'ambito veterinario.

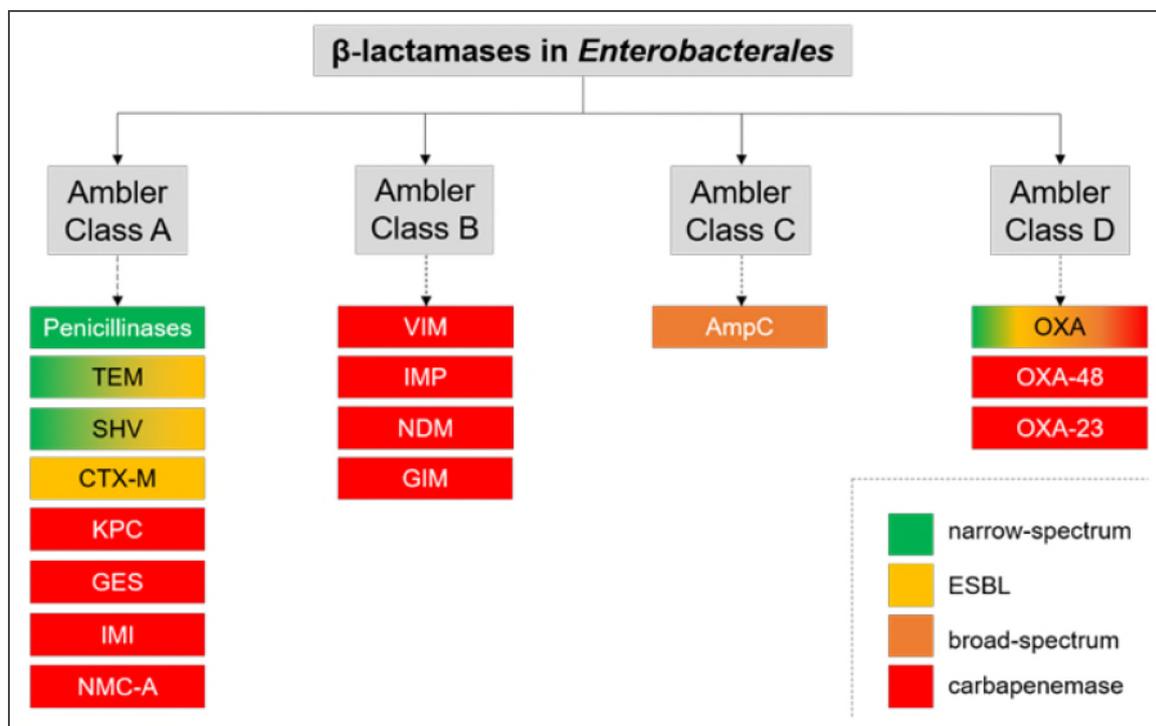


Figura 8: β -lattamasi negli *Enterobacterales*.

Le β -lattamasi sono suddivise a seconda della struttura chimica nelle Classi A, B, C e D secondo la classificazione di Ambler; i differenti colori nella figura rendono conto del diverso spettro di azione dei vari enzimi all'interno delle varie classi. Fonte: Noster J, Thelen P and Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales—From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics* 2021, 10(9), 1140; <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091140>

Letture dell'Antibiogramma: esempio n°1

Qui di seguito si riporta l'esempio (figura 9) di una *Klebsiella pneumoniae* per la quale non si conosce la specifica *beta*-lattamasi espressa ma dall'antibiogramma si evince una resistenza diffusa alle cefalosporine e penicilline ed una sensibilità al meropenem; si può dunque **presupporre la presenza di ESBL**.

ESAME COLTURALE AEROBI e MICETI:		SANGUE		
Microrganismi isolati:				
- 1 - <i>Klebsiella pneumoniae</i>				
ANTIBIOGRAMMA (sec. EUCAST)	- 1 -		Break Point MIC	
	RSI	MIC	SENS	RESI
Amikacina	R	32	<=8	>8
Amoxicillina/a.clav.	R	>16	<=8	>8
Cefepime	R	>16	<=0,25	>0,25
Cefotaxime	R	>32	<=1	>2
Ceftazidime	R	32	<=1	>4
Ceftazidime/avibactam	S	0.5		
Ceftazolan/tazobactam	S	1	<=2	>2
Ciprofloxacina	R	>2	<=0,25	>0.5
Colistina	S	<=0.5	<=2	>=4
Gentamicina	R	>8	<=2	>2
Imipenem	S	<=0.25	<=2	>8
Meropenem	S	<=0.25	<=2	>8
Piperacillina/tazobactam	R	16	<=8	>16
Tobramicina	R	>8	<=2	>2
Trimetoprim/sulfam.	R	>160	<=20	>40

Figura 9: Antibiogramma ottenuto da campione di sangue.

Fonte: courtesy of Dr.ssa Chiara Vettori, microbiologa, Dr. Mirco Lenzi infettivologo, Nuovo Ospedale Apuano Massa (MS). anno 2022.

A conferma della presenza di ESBL si evidenzia la resistenza ai principali rappresentanti delle cefalosporine ad ampio spettro quali cefotaxime e ceftazidime. La terapia antibiotica adottata in questo caso clinico è stata il meropenem.

Sulla base delle considerazioni precedentemente elencate, la scelta dell'antibiotico si è basata:

- sul sito dell'infezione: essendo un'infezione su sangue il rischio di setticemia ha escluso l'ipotesi di usare farmaci batteriostatici (come ad esempio la tigeciclina) e l'uso della cefalosporina associata al tazobactam avrebbe dovuto essere accompagnato da alte dosi di fosfomicina al fine di evitare l'insorgenza di resistenza;
- valutazione della MIC: confrontando ceftazolan/tazobactam con meropenem in termini di MIC, l'antibiogramma informa che il batterio è sensibile alla più bassa concentrazione di meropenem testata (<=0.25), mentre per ceftazolan/tazobactam la MIC ha un valore preciso pari ad 1. Calcolando il rapporto Breakpoint (BP)/MIC (indicativo di efficacia), la distanza tra il BP e la MIC è risultata più favorevole per il

carbapenemico (BP/MIC ceftazolane/tazobactam = 2 vs BP/MIC meropenem = 8), da preferirsi dunque nella scelta terapeutica in casi come questo.

Nella **classe B di Ambler** si trovano le più temibili tra le mutazioni (**NDM, IMP**), che producono infatti enzimi idrolizzanti tutti i beta-lattamici all'infuori dell'aztreonam.

Letture dell'Antibiogramma: esempio n°2

La *Klebsiella* dell'isolato che segue (figura 10), diversamente da quanto visto nell'esempio n°1 è resistente non solo alle cefalosporine e penicilline, ma anche ai carbapenemi.

ESAME COLTURALE AEROBI e MICETI:		SANGUE NEGATIVO	
ESAME COLTURALE ANAEROBI:		SANGUE	
Microorganismi isolati:			
- 1 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> NDM			
ANTIBIOGRAMMA (sec. EUCAST)	- 1 - RSI MIC	Break Point MIC	
		SENS	RESI
<i>Amikacina</i>	R 16	<=8	>8
<i>Amoxicillina/a.clav.</i>	R >16	<=2	>8
<i>Cefepime</i>	R >16	<=0,25	>0,25
<i>Cefotaxime</i>	R >32	<=1	>2
<i>Ceftazidime</i>	R >32	<=1	>4
<i>Ceftazidime/avibactam</i>	R >8		
<i>Ceftazolane/tazobactam</i>	R >16	<=2	>2
<i>Ciprofloxacina</i>	R >2	<=0,25	>0,5
<i>Colistina</i>	S <=0.5	<=2	>=4
<i>Fosfomicina</i>	S 16	<=32	>32
<i>Gentamicina</i>	S <=1	<=2	>2
<i>Imipenem</i>	R 8	<=2	>8
<i>Meropenem</i>	R >8	<=2	>8
<i>Piperacillina/tazobactam</i>	R >64	<=8	>16
<i>Tobramicina</i>	R >8	<=2	>2
<i>Trimetoprim/sulfam.</i>	R >160	<=20	>40
Identificazione eseguita su VITEK/MS (Maldi-tof) Antibiogramma su sistema Vitek2			

Figura 10: Antibiogramma per *Klebsiella pneumoniae* NDM.

Fonte: courtesy of Dr.ssa Chiara Vettori, microbiologa, Dr. Mirco Lenzi infettivologo, Nuovo Ospedale Apuano Massa (MS). anno 2022.

Un esempio di terapia ragionata percorribile sfrutta il sinergismo tra aztreonam e ceftazidime/avibactam. L'aztreonam, unico monobattamico non idrolizzato dalle NDM, agisce da antibiotico nei confronti dei batteri esprimenti l'NDM stesso, mentre l'avibactam inibisce tutte le altre possibili *beta*-lattamasi espresse.

Nella **classe C** si trova **AmpC**, mutazione che determina un meccanismo di resistenza, inducibile dalla presenza degli antibiotici e quindi non rilevabile dai test di sensibilità *in vitro*. In ragione di ciò risulta fuorviante riportare sull'antibiogramma la sensibilità alle penicilline per specie quali gli Enterobacter o

Citrobacter, in quanto *in vitro* potrebbero risultare sensibili ma *in vivo* potrebbero esprimere l'AmpC e causare un fallimento terapeutico.

Letture dell'Antibiogramma: esempio n°3

In questo caso (figura 11) è riportato l'antibiogramma di *Pseudomonas aeruginosa* che esprime costituzionalmente la beta-lattamasi di tipo AmpC. Secondo le nuove definizioni dell'EUCAST la categoria I sta per "sensibile a dosaggi o esposizione aumentata". Per questo motivo nel caso sopra riportato la terapia che potrebbe essere adottata è cefepime o ceftazidime a dosaggio alto, in particolare cefepime 2g per 3 volte die al fine di attuare una strategia carbapenem sparing, dove cioè viene evitato l'uso di carbapenemi.

ESAME COLTURALE: CATET. VESCICALE		POSITIVO *						>= 100.000 UFC/mL
Microorganismi isolati:								
- 1 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
- 2 - <i>Escherichia coli</i>								
ANTIBIOGRAMMA (sec. EUCAST)	- 1 - Break Point MIC			- 2 - Break Point MIC				
	RSI	MIC	SENS RESI	RSI	MIC	SENS RESI		
<i>Amikacina</i>	S	2	<=16 >16	S	4	<=8 >8		
<i>Amoxicillina/a.clav.</i>				R	>16	<=8 >8		
<i>Cefepime</i>	I	2	<=0.001 >8	S	0.5	<=0,25 >0,25		
<i>Cefotaxime</i>	R	16	<=1 >2	R	32	<=1 >2		
<i>Ceftazidime</i>	I	2	<=0.01 >8	R	32	<=1 >4		
<i>Ceftazidime/avibactam</i>	S	2						
<i>Ceftazolan/tazobactam</i>	S	0.5	<=4 >4					
<i>Ciprofloxacina</i>	I	0.12	<=0,25 >0.5	S	0.25	<=0,25 >0.5		
<i>Colistina</i>	S	<=0.5	<=2 >2					
<i>Ertapenem</i>				S	<=0.12	<=0,5 >0.5		
<i>Gentamicina</i>		<=1	<=2 >2	S	2	<=2 >2		
<i>Imipenem</i>	I	1	<=0.001 >4					
<i>Meropenem</i>	S	0.5	<=2 >8	S	<=0.25	<=2 >8		
<i>Nitrofurantoin</i>				S	<=16	<=64 >=128		
<i>Piperacillina/tazobactam</i>	I	8	<=0.001 >16	R	16	<=8 >16		
<i>Tigeciclina</i>				S	<=0.5	<=1 >2		
<i>Tobramicina</i>	S	<=1	<=2 >2					
<i>Trimetoprim/sulfam.</i>	I	80	<=20 >40	R	>160	<=20 >40		

Identificazione eseguita su VITEK/MS (Maldi-tof) Antibiogramma su sistema Vitek2

NOTA: Gli antibiotici senza valore di MIC sono interpretati nelle categorie S,I,R dal sistema esperto. Gli antibiotici Tigeciclina, Gentamicina e Colistina per microrganismi MDR Gram negativi sono saggiati per conferma in microdiluzione su Sistema Sensititre. Per Fosfomicina: *K. pneumoniae* KPC resistente (R) il dato non è attendibile; per *P.aeruginosa* MIC <=128 mg/L valutare la terapia di combinazione. (EUCAST)

Figura 11: Antibiogramma per *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*

Fonte: courtesy of Dr.ssa Maria Nardone microbiologa, Dr. Mirco Lenzi, infettivologo, Nuovo Ospedale Apuano Massa (MS). anno 2022.

Le beta-lattamasi di tipo **OXA-48** appartengono alla **classe D** e sono enzimi con un particolare meccanismo catalitico che li rende generalmente resistenti o poco sensibili agli inibitori delle beta-lattamasi.

Da sottolineare che tutte le classi di Ambler, eccetto le ESBL e le AmpC, sono definite carbapenemasi, ovvero beta-lattamasi in grado di degradare anche i carbapenemi.

Una delle strategie terapeutiche messe in atto per far fronte alla pressione selettiva della beta-lattamasi è stata quella di adottare regimi carbapenem-sparing, con la combinazione di beta-lattamici e inibitori di ultima generazione delle beta-lattamasi (come ad esempio vaborbactam o avibactam).

Letture e interpretazione dell'antibiogramma in base al campione raccolto (sangue, urine, ferite, ecc)

Il primo step che porta all'ottenimento di un isolato batterico è il prelievo di un campione biologico.

Sicuramente il prelievo sanguigno effettuato da vena periferica è la principale fonte d'indagine in caso di febbre di origine sconosciuta.

E' preferibile effettuare il prelievo al culmine del picco febbrile, prelevando almeno tre coppie di campioni da emocoltura per la ricerca di germi aerobi, anaerobi e miceti. La ricerca dei miceti è di rilievo in pazienti particolarmente suscettibili alle infezioni come ad esempio i pazienti ematologici, neutropenici, i pazienti immunosoppressi, i ricoverati in terapia intensiva per shock settico ecc.

La sede del prelievo (CVC, vena periferica, arteria ecc) è un elemento da considerare al fine di individuare precocemente la genesi della sepsi. Ad esempio in caso del campione 1 prelevato da CVC e campione 2 prelevato da vena periferica se il campione 1 si positivizza (cioè si rileva la presenza di crescita batterica nel campione in incubazione) almeno 2 ore prima rispetto alle emocolture da vena periferica, molto probabilmente l'infezione avrà avuto origine dal CVC.

Un altro fattore di rilievo è il tempo d'incubazione del campione, che permette la distinzione tra le diverse classi di germi, infatti in corso di setticemia la positivizzazione di un campione dopo 6-10 ore è determinata generalmente dalla presenza di Gram-, dopo 12-24 ore di Gram+, tempi superiori alle 24 ore di lieviti.

Le emocolture positive devono essere sottoposte a colorazione di Gram e indagine microscopica per avere ulteriori informazioni morfologiche in merito al germe (i Gram positivi saranno colorati in blu-violetto, e cocci Gram+ allungati disposti a coppie o piccole catene dovranno far pensare all'enterococco mentre se disposti in ammassi potrebbero essere stafilococchi (figura 12). I Gram- risulteranno colorati in rosso e se si presentano in forma allungata con lieve capsula ci si può sospettare uno Pseudomonas), come si può notare dalla figura 13.



Figura 12: esempio di Gram + e figura 13: esempio di Gram -.

La figura 12 mostra un batterio Gram +, lo Stafilococco aureo vancomicina-resistente (VRSA). Fonte: [VRSA, what is VRSA? vancomycin-resistant Staphylococcus aureus \(bacteriainphotos.com\)](https://www.bacteriainphotos.com) (data ultima consultazione 18/08/2022). La

figura 13 mostra un batterio Gram-, lo *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: <https://www.ildenaro.it/infezioni-ospedaliere-ricerca-del-cnr-lo-pseudomonas-resiste-agli-antibiotici/> (data ultima consultazione 18/08/2022).

I Gram- risulteranno colorati in rosso e se si presentano in forma allungata con lieve capsula ci si può sospettare uno *Pseudomonas*).

L'ultimo step prevede la semina su terreni specifici rispetto alla specie rilevata alla colorazione Gram e l'isolamento del patogeno.

L'urina è il campione più coltivato, raramente sterile. Prima dell'incubazione viene diluita per facilitare in un secondo momento la conta delle colonie (CFU/mL). La soglia per definire l'infezione urinaria varia in funzione del paziente: per un paziente adulto sano solitamente si considera una soglia è 10^5 CFU/mL mentre in un paziente con catetere sovra-pubico o immunodepresso la soglia necessaria per il trattamento dell'infezione si può ridurre a 10^3 CFU/mL.

In linea generale quando si hanno urinocolture positive a più patogeni si deve sospettare che si tratti di una contaminazione al momento del prelievo. Fanno eccezione casistiche specifiche quali ad esempio i pazienti con *stent* urinari, nei quali la possibilità di positivizzazione a più germi patogeni è maggiormente probabile. Ai fini clinici si ricorda che le batteriurie asintomatiche di norma devono essere trattate solo nelle gravide.

In caso di secrezioni purulenti, ascessi o ferite, al fine di ridurre le contaminazioni del campione si sconsiglia il prelievo con tampone superficiale e si predilige prelevare del materiale in provetta sterile per poter allestire delle colture in piastra. In lesioni croniche, come infezione del piede diabetico, è preferibile una biopsia profonda di tessuto molle od osso evitando di prelevare materiale dalla ferita superficiale esposta a contaminanti.

In caso di spondilodiscite l'esame principale è una biopsia per via radioscopica del disco e dell'osso vertebrale.

BIBLIOGRAFIA

Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 - 2020 data, pubblicato il 26/01/2022 ([ECDC-WHO-AMR-report.pdf \(europa.eu\)](#)) pagina consultata in data 18/08/2022).

Antimicrobial Resistance in the EU/EEA - A One Health Response, pubblicato il 07/03/2022 ([antimicrobial-resistance-policy-brief-2022.pdf \(europa.eu\)](#)), pagina consultata in data 18/08/2022).

C. Tascini. Antibiotic stewardship: ripartiamo dalla pratica clinica. Urologia Journal 2018, Vol. 85(1S) S20–S23.

C. Tascini et al., Reading and understanding an antibiogram, Italian Journal of Medicine 2016; volume 10:289-300. doi:[10.4081/itjm.2016.794](#).

EUCAST definitions of clinical breakpoints and epidemiological cut-off values, January 2019, link https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_SOPs/EUCAST_definitions_of_clinical_breakpoints_and_ECOffs.pdf (data ultima consultazione 18/08/2022).

<https://www.microbiologiaitalia.it/test-microbiologici/antibiogramma/> (data ultima consultazione 18/08/2022).

https://www.ausl.re.it/WsDocuments/OSSIPRANDI_Valutazione%20della%20diffusione%20di%20Enterobacteriaceae%20.pdf (data ultima consultazione 18/08/2022).

<https://www.biessea.com/guida-alla-corretta-interpretazione-dellantibiogramma/> (data ultima consultazione 18/08/2022).

https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (data ultima consultazione 18/08/2022).

<https://www.eucast.org/newsiandr/> (data ultima consultazione 18/08/2022).

<https://www.wikiwand.com/it/Antibiogramma> (data ultima consultazione 18/08/2022).

<https://toolbox.eupati.eu/resources/biodisponibilita-e-bioequivalenza/?lang=it> (data ultima consultazione 18/08/2022).

<https://www.ildenaro.it/infezioni-ospedaliere-ricerca-del-cnr-lo-pseudomonas-resiste-agli-antibiotici/> (data ultima consultazione 18/08/2022).

I manuali SIFO – P. Polidori: Antimicrobial Stewardship in medicina: impatto/implementazione della figura del farmacista di dipartimento e /o di reparto nelle aziende sanitarie del SSN; edizioni il campano, 2017; link https://www.sifoweb.it/images/pdf/pubblicazioni/altre-edizioni/antimicrobial-stewardship/Antimicrobial_Stewardship_in_medicina.pdf (data ultima consultazione 18/08/2022).

Introduzione del sistema europeo EUCAST per l'interpretazione dei saggi di sensibilità ai farmaci antimicrobici, Laboratorio di Microbiologia Ospedale San Raffaele, 2012, link <https://medicinadilaboratorio.hsr.it/static/upl/EU/EUCASTLETTERA.pdf> (data ultima consultazione 18/08/2022).

Lacy MK, Klutman NE, Horvat RT, Zapantis A. Antibiograms: New NCCLS Guidelines, Development, and Clinical Application. *Hospital Pharmacy*. 2004;39(6):542-553. doi:[10.1177/001857870403900608](https://doi.org/10.1177/001857870403900608).

Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Feb;19(2):141-60. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.

Leclercq R et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Feb;19(2):141-60. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x. Epub 2011 Nov 25.

Levison ME, Levison JH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infect Dis Clin North Am*. 2009 Dec;23(4):791-815, vii. doi: 10.1016/j.idc.2009.06.008.

L'uso degli antibiotici in Italia - Rapporto Nazionale anno 2020 (https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1664282/Rapporto_Antibiotici_2020.pdf , pagina consultata in data 18/08/2022)

Nikolas J. Onufrak, Alan Forrest, and Daniel Gonzalez, *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Principles of Anti-Infective Dosing*, PharmD, PhD; *Clin Ther*. 2016 September; 38(9): 1930–1947. doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.06.015.

Noster J, Thelen P and Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales—From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics* 2021, 10(9), 1140;<https://doi.org/10.3390/antibiotics10091140>.

Rapporto AR-ISS: sorveglianza nazionale dell'Antibiotico-Resistenza. Dati 2020. (https://www.iss.it/documents/20126/0/RIS-1_2021.pdf/af6da4cc-0f57-3800-68ca-c5f6c05479c0?t=1637230397225pagina consultata in data 18/08/2022).

Redell M and Tillotson GS (2022) The Practical Problem With Carbapenem Testing and Reporting Accurate Bacterial Susceptibilities. *Front. Pharmacol*. 13:841896. doi: 10.3389/fphar.2022.841896.

[Resistenza agli antibiotici - epidemiologia in Europa \(iss.it\)](#) (pagina consultata in data 18/08/2022).

[VRSA, what is VRSA? vancomycin-resistant Staphylococcus aureus \(bacteriainphotos.com\)](#) (data ultima consultazione 18/08/2022).

Wanda C Reygaert. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria[J]. *AIMS Microbiology*, 2018, 4(3): 482-501.

William R Truong, Levita Hidayat, Michael A Bolaris, Lee Nguyen, Jason Yamaki, The antibiogram: key considerations for its development and utilization, *JAC-Antimicrobial Resistance*, Volume 3, Issue 2, June 2021, dlab060, <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab060>.