

LA MICROBIOLOGIA CLINICA COS'È ?

Tra esercizio didattico ed imperativo strategico

Authors: Andrea Rocchetti e gli studenti della Laurea Magistrale In Scienze Biologiche DISIT UPO anno accademico 2019-2020. Attività Didattica Tecniche Microbiologiche (elenco completo al fondo)

ABSTRACT

Questo volume è il frutto di una attività realizzata in collaborazione con studenti di Laurea Magistrale In Scienze Biologiche DISIT UPO anno accademico 2019-2020, attività Didattica Tecniche Microbiologiche. Un quaderno scritto a più mani per comprendere la complessità degli aspetti gestionali ed operativi di questa disciplina.

I temi trattati sono

- * La globalizzazione
- * La lentezza
- * La rapidità
- * La robotica
- * I POCT (Point of care testing)
- * L'intelligenza artificiale
- * Il sequenziamento genico
- * Il controllo microbiologico ambientale

Filo conduttore dei vari argomenti è l'approccio globale e coordinato, l'innovazione e la tecnologia, la ricerca avanzata, la formazione continua. Tutti elementi al servizio della microbiologia, specialità che significa rapidità diagnostica e che rappresenta uno dei pilastri su cui si basa tutta l'organizzazione ospedaliera. L'attività diagnostica microbiologica, ad alta specializzazione, riguarda il controllo delle infezioni e le malattie infettive e individua soluzioni diagnostiche ad alta complessità sia per i pazienti ricoverati, sia per i cittadini.

È un lavoro strano quello del microbiologo, ce lo diciamo spesso tra colleghi, non vediamo il malato, ma vediamo oltre il malato, oltre la malattia cercandone le cause più che gli effetti. È un lavoro da retrovia ma senza retrovia il fronte non avanza ed il mondo girà così veloce che può capitare che la retrovia si trovi in prima linea. Come è successo per i tamponi del COVID.

Il mio amico Claudio Farina microbiologo a Bergamo cita spesso la canzone di Ligabue 1999

*.....una vita da mediano
con dei compiti precisi.
A coprire certe zone.
A giocare generosi.
Li.*

*Sempre lì.
Lì nel mezzo.*

*Finché ce n'hai stai lì.
Una vita da mediano
Da chi segna sempre poco
Che il pallone devi darlo
A chi finalizza il gioco
Una vita da mediano.....*

Si, ha ragione Claudio, il microbiologo è come un mediano, gioca nel mezzo e corre avanti e indietro, protegge il portiere, sposta il gioco in avanti e dà palla a chi finalizza il gioco: si vede poco in televisione e sui giornali e non vince il Pallone d'oro. Il microbiologo come il mediano deve avere visione di gioco, deve avere polmoni, gambe e cuore. Soprattutto cuore.

La partita, il microbiologo, la gioca contro avversari temibili e preparati: i prioni, i virus, i batteri, i funghi, i protozoi e gli elminti in ordine dal più piccolo al più grande ed il campo è quello della diagnosi delle malattie infettive.

Vecchie conoscenze e nuove, come il SARS CoV2. Il campo di gara non è statico, non ha limiti condizionali per cui non possiamo urlare “fallo” o “così non vale”. Modifica le sue dimensioni continuamente in funzione della prevalenza delle malattie, della loro virulenza, delle strategie di politica sanitaria, delle tecnologie impiegate e delle risorse disponibili.

Gli strumenti del mestiere sono tanti e stanno nel laboratorio di microbiologia. Ogni strumento, però, non è un'isola a se stante, isola specializzata nella diagnosi di una certa malattia o meglio lo è solo in parte perché il laboratorio è un'arcipelago composto di isole grandi e piccole dove si lavorano materiali biologici diversi (sangue, urine, feci, materiali respiratori, liquidi biologici, biopsie, etc) e dove la gestione delle lavorazioni è complicata perché i passaggi sono molti e precisi e ci vuole visione d'insieme per finalizzarli con successo.

È la parola “diversità” che ha sempre caratterizzato la complessità del laboratorio di microbiologia: diversità dei campioni da analizzare, diversità delle metodiche analitiche, diversità dei terreni di semina, diversità di saggio per gli antibiogrammi. La integrazione tra tecnologie vecchie e nuove è sempre un limite se non un vincolo dei flussi organizzativi.

Entrai in campo nel 1989 in batteriologia (settore della microbiologia) due stanze neanche tanto grandi, annesse al Laboratorio Analisi. Si faceva la microbiologia del “seminatore”; preparazione dei terreni di coltura, semina del materiale biologico, attesa della crescita in colonia dei microrganismi, identificazione morfologica e biochimica, prove di sensibilità in vitro. Ci volevano almeno 72 ore per produrre un risultato. Il laboratorio era chiuso nei giorni festivi ma i batteri non lo sapevano!!!

Ricordo ancora la telefonata serale di un famoso chirurgo alessandrino che mi chiedeva l'esito di una coltura inviata il giorno prima a cui risposi che ci sarebbero voluti almeno 4 giorni. La risposta del chirurgo fu “fai un lavoro che non serve a nulla. Il risultato del tuo lavoro non serve al paziente”.

Aveva ragione. Non sono così certo che avesse detto “non serve a nulla” ma avviò una riflessione che ancora oggi sopravvive. La sola accuratezza dell'esame diagnostico non sempre assicura un risultato appropriato alla condizione clinica del paziente. In altre parole ciò che è biologicamente valido ed accurato non è detto che sia altrettanto utile e rilevante dal punto di vista clinico.

Ho trascorso trent'anni di vita professionale a provare nuovi schemi per estendere il ruolo della microbiologia clinica nel campo dell'efficacia clinica e non ho mai giocato “chiuso” nella scrupolosa attenzione alla accuratezza. In senso strettamente analitico, insomma, c'è bisogno di concretezza e di efficienza orientata all'efficacia del risultato.

È evidente che se pur armati delle migliori intenzioni non avremmo fatto nessun passo in avanti senza la straordinaria evoluzione del mercato delle Tecnologie dei test di microbiologia medica. Si tratta di un settore in espansione, dalle dimensioni impressionanti che quota, ha fattori di crescita, ha leader principali, ha strategie di sviluppo, ha tendenze future e che fa previsioni a medio e lungo termine e che il microbiologo deve ormai conoscere molto bene prima di tutto per non far danni ed in seconda istanza per migliorare e crescere in armonia con le esigenze specifiche della realtà operativa.

Il laboratorio di Alessandria dispone di tecnologia all'avanguardia, applica protocolli diagnostici accurati e rapidi, interagisce quotidianamente con gli altri servizi ospedalieri, con i reparti e con il territorio, collabora con l'Università per la formazione degli studenti della Laurea Magistrale in Biologia, fa ricerca scientifica e fa molto altro.

Chi lavora nel laboratorio di microbiologia sia esso medico, biologo, tecnico e ausiliario sa di avere un ruolo e che la disciplina “da mediani” ha una sua etica ed una sua dignità che è legata proprio alla unicità delle competenze...o meglio alla trinità delle competenze.

A tal proposito c'è un secondo aspetto professionale di crescente interesse costituito dalla sorveglianza epidemiologica dei ceppi microbici e delle relative resistenze agli antibiotici e dalla potenzialità che tale attività riveste nell'interpretazione degli scenari infettivologici delle singole realtà locali e nel controllo delle infezioni nelle strutture sanitarie. Sappiamo come conoscere i dati epidemiologici e gli andamenti delle resistenze agli antibiotici possa incidere profondamente sulle scelte di terapia ragionata e di influire sulla gestione generale della “politica” degli antibiotici con importanti ripercussioni a livello clinico ed economico sia in ambito nosocomiale, sia in ambito territoriale. Senza laboratori di microbiologia che fanno sorveglianza microbiologica si perde un patrimonio di informazioni essenziali per la lotta alle malattie infettive.

C'è poi un terzo ruolo professionale, anch'esso di particolare impegno clinico e di crescente interesse, costituito dalla capacità di rappresentare una parte attiva nelle singole realtà in cui si opera: dalla partecipazione ai comitati di controllo delle infezioni ospedaliere alla presenza in gruppi di lavoro per la stesura dei prontuari terapeutici, negli audit clinici e per la verifica di nuove strategie per la diagnostica e la terapia delle malattie da infezione.

Insomma ci sono molte altre cose che il microbiologo fa tutti i giorni ma l'esperienza della pandemia ci è passata dentro come un tsunami ci ha cambiato e ci ha reso più consapevoli: sarà necessario ripartire dalle fondamenta, ricostruire con i nostri principali interlocutori rapporti di parità che giustifichi la presenza di una microbiologia clinicamente orientata e basata sull'evidenza. Detto con altre parole che si faranno solo le cose che servono e

non quelle che fanno comodo. Dall'emergenza si dovrà passare alla pianificazione delle attività con l'attribuzione di risorse umane e tecnologiche.

Il futuro dovrà trovarci pronti ed il tempo delle improvvisazioni dovrà finire.

Chi amministra le risorse, le agenzie regolatorie, i decisori devono essere informati che i laboratori di microbiologia clinica sono il fulcro della diagnosi di malattie infettive, così come la pietra angolare del controllo delle infezioni. Essi devono rendersi conto che tali laboratori richiedono specialisti esperti, non generalisti, per ottimizzare sia il servizio che il risparmio sui costi del SSN.

A tal proposito si inserisce il tema della formazione delle nuove generazioni. Il mancato investimento finanziario sulle attività della microbiologia clinica, per circa un ventennio, ha creato un salto generazionale tra chi andrà in pensione e le nuove assunzioni. Il sapere e le competenze acquisite in anni di lavoro e di studio dovranno essere riversati in formato "condensato" nei nuovi cervelli.

Anche questa operazione dovremo farla in fretta e bene.

Ho chiesto agli studenti del corso di "tecniche microbiologiche" del biennio 2019-2020 della Laurea Magistrale in Biologia di aiutarmi a descrivere i principali temi che il laboratorio di Microbiologia Clinica dovrà affrontare nei prossimi anni.

Consapevole del fatto che chi di loro vorrà fare il mediano dovrà avere ben chiaro che la salute sia del singolo cittadino che delle comunità dipenderà anche dai servizi forniti dai laboratori di microbiologia clinica e dalle competenze dei professionisti che ci lavoreranno. Se ospedali, amministratori,

LA GLOBALIZZAZIONE

Si tratta di un concetto complesso che spesso è definito in base ad aspetti selezionati legati all'attività svolta dai professionisti di uno specifico settore. Tuttavia, il concetto di globalizzazione in relazione alla diffusione delle malattie infettive non permette una visione settoriale dell'argomento, in quanto influenzata da aspetti di natura economica, ambientale, demografica, tecnologica, sociale e politica.

Sebbene lo sviluppo tecnologico e scientifico consentano di tracciare e di intervenire tempestivamente per far fronte alla diffusione e all'insorgenza delle malattie infettive, i processi della globalizzazione riducono il lasso di tempo nei quali questi si verificano.

Il rapporto sulle migrazioni internazionali elaborato dalla Commissione sulla Popolazione e lo Sviluppo del Dipartimento di Affari Economici e Sociali delle Nazioni Unite (UNDESA) stima che il numero di persone che vivono al di fuori del loro paese di nascita o cittadinanza abbia raggiunto 281 milioni nel 2020 (International Migration 2020 Highlights). Gli individui sono portati ad una maggiore mobilità per ragioni lavorative (mercato del lavoro globale), di studio (studenti internazionali), per turismo ma anche per ragioni socio-politiche.

medici, responsabili politici e microbiologi clinici non faranno una concreta assunzione di responsabilità e non prenderanno le misure appropriate per affrontare i temi descritti "in questo esercizio didattico", è probabile che ci sarà un impatto negativo sull'assistenza ai pazienti e sul sistema sanitario.

I Temi

- La globalizzazione
- La lentezza
- La rapidità
- La robotica
- I POCT (Point of care testing)
- L'intelligenza artificiale
- Il sequenziamento genico
- Il controllo microbiologico ambientale

I temi trattati dagli studenti, divisi in piccoli gruppi di lavoro, trovano in questo esercizio didattico una sintesi che non sempre coglie a pieno l'essenza del problema e rende chiara la complessità dell'argomento.

Anche lo stile, l'approccio e lo svolgimento sono molto differenti.

Questo non era l'intento.

Occorreva far comprendere attraverso una "immersione libera" quanto difficile siano gli aspetti gestionali ed operativi di questa disciplina e materia che dir sin voglia. Trattandosi di un'immersione guidata solo in parte la profondità raggiunta è quella consentita ai neofiti.

Non abbiamo inserito la bibliografia e la sitografia, benché la ricerca sia stata oggetto di valutazione d'esame, per alleggerire i temi trattati rendendoli più raccontabili soprattutto ai non esperti ai lavori

Sebbene i primi casi riportati rappresentino un flusso controllato di persone, nell'ultimo caso non si può dire lo stesso: si stima infatti che tra il 2000 e il 2020 il numero di persone sfollate che superano i confini internazionali mentre fuggono da conflitti, persecuzioni, violenze o violazioni dei diritti umani sia raddoppiato da 17 a 34 milioni, rappresentando circa il 16% dell'aumento totale del numero di migranti internazionali in tutto il mondo. Assistiamo pertanto al sovrappopolamento di determinate aree geografiche e allo spopolamento di altre con una conseguente maggiore probabilità di contagio.

L'influenza esercitata dall'aumentata mobilità sulla diffusione delle malattie infettive non può essere trascurata. La possibilità di raggiungere facilmente luoghi lontani grazie a mezzi di trasporto rapidi conduce inevitabilmente ad una maggiore rapidità nella diffusione delle malattie. Un esempio a riguardo è rappresentato dalla attuale diffusione di SARS-CoV-2 che nell'arco di pochi mesi dall'annuncio ufficiale del virus in Cina ha portato alla registrazione di numerosi casi in tutto il mondo. Questa pandemia ha rimarcato l'incredibile connessione tra paesi.

La diffusione e la cura delle malattie infettive è strettamente connessa alle condizioni socio-economiche dei singoli paesi. La possibilità di maggiori investimenti in campo sanitario dei paesi svilup-

pati e l'accesso all'assistenza sanitaria permettono di far fronte alle richieste di salute pubblica in maniera significativa rispetto ai paesi sottosviluppati nei quali le carenze in campo sanitario si aggiungono a condizioni di vita precarie. L'esodo tra ambienti a rischio differenziale ha un significato per la gestione delle malattie infettive nelle aree di accoglienza dei migranti, in quanto si verifica l'importazione di patologie i cui tassi di prevalenza erano stati ridotti grazie a programmi di immunizzazione e prevenzione nei paesi con un saldo sistema sanitario e che ora tornano sulla scena sanitaria come conseguenze di flussi migratori non controllati da paesi in cui il tasso è ancora alto, ad esempio la tubercolosi.

In aggiunta, l'intensificazione dell'importazione di merci da nazioni in cui il mercato del lavoro è meno costoso fa leva sulla diffusione delle malattie infettive. Gli scambi a livello globale promuovono la diffusione delle zoonosi data dalla sopravvivenza delle uova di artropodi tra i prodotti di scambio: in questo modo è avvenuta la diffusione della Dengue attraverso il mercato degli pneumatici.

La pressione esercitata dai consumi ha condotto anche a modifiche nella produzione alimentare. L'aumentata domanda di generi alimentari spinge molti produttori all'utilizzo di farmaci in campo agricolo e in veterinaria. Ciò grava sul problema dell'antibiotico resistenza dei batteri avendo un importante impatto nella cura delle malattie infettive, la quale risulta complessa e richiede la ricerca di nuove molecole e target per combattere l'infezione. Non solo, la prescrizione e l'uso scorretto di farmaci implementano il problema.

La globalizzazione favorisce la diffusione della resistenza agli antibiotici con diverse modalità: gli individui sono carrier inconsapevoli, anche attraverso il loro microbioma; gli assembramenti favoriscono lo scambio di microrganismi tra le persone; viaggi rapidi attraverso il mondo, soprattutto in aereo, favoriscono i movimenti tra continenti con livelli diversi di antibiotico-resistenza nell'ambiente; gli allevamenti intensivi spingono all'utilizzo di basse dosi di antibiotici per favorire la crescita e la produzione, favorendo a loro volta lo sviluppo di resistenza agli antibiotici che si può diffondere attraverso la circolazione globale degli alimenti (miele, prodotti caseari, carni, pesce).

Riconosciuta l'entità del problema dell'antibiotico resistenza a livello mondiale gli sforzi delle agenzie che operano in ambito sanitario convergono nella produzione di raccomandazioni e strategie per contenere il fenomeno.

Analogamente, il cambiamento climatico e la modifica degli ecosistemi plasmano il profilo dell'epidemiologia delle malattie infettive. L'influenza delle attività antropiche è una delle cause di questo cambiamento. In quest'ottica le specie reservoir, gli organismi vettore e i patogeni stessi vengono fortemente influenzati nella loro sopravvivenza. Gli ospiti di molti agenti infettivi possono trovare condizioni ambientali favorevoli in regioni differenti da quelle di origine favorendone la diffusione.

La diagnostica microbiologica è finalizzata alla ricerca e identificazione dell'agente patogeno e possiamo suddividerla in diagnostica diretta, indi-

La diagnostica diretta ha come scopo la ricerca dell'agente patogeno, la sua identificazione e la sensibilità agli antibiotici. Fanno parte di questa categoria i test microscopici, l'esame colturale (o isolamento) e l'antibiogramma. L'esame microscopico è importante per fornire una prima diagnosi presuntiva dovuta alla presenza di microrganismi nel vetrino ed è utile al Microbiologo ma anche al clinico per guidare la scelta delle decisioni terapeutiche. Esistono diverse varianti di questa tipologia d'esame che differiscono dal tipo di colorazione, microrganismo da identificare, il microscopio usato e come è stato trattato il campione sul vetrino. Un'altra tecnica è l'esame colturale che serve per isolare in terreni di coltura, che possono essere sia solidi che liquidi, l'agente patogeno. I terreni di coltura possono essere selettivi (selezionano un gruppo di microrganismi inibendo quelli da non identificare), di arricchimento (utilizzato per aiutare la crescita di patogeni di interesse medico senza inibire la crescita degli altri) o differenziali (forniscono una diagnosi presuntiva attraverso caratteristiche biochimiche del microrganismo). Vengono seminate e incubate e successivamente si isola la colonia. Di questa categoria fanno parte anche le tecniche di Real Time PCR. La tecnica RT-PCR permette di amplificare gli acidi nucleici di interesse e simultaneamente quantificare effettivamente quante copie degli stessi sono presenti nel campione in tempo reale. Viene usato sia per la ricerca ma anche per l'identificazione di alcune malattie tra cui quelle virali e batteriche.

Esiste anche una diagnosi indiretta che è la più utilizzata per le malattie trattate in questo capitolo e consiste nella rilevazione della risposta immunitaria scaturita dall'agente infettivo nell'ospite. Di questa categoria fanno parte i test sierologici. I test sierologici comprendono una grande categoria di tecniche che hanno come comune denominatore la rilevazione della presenza di anticorpi indice di risposta immunitaria nel paziente. Si dividono in due categorie i test qualitativi tra cui i test rapidi (possono essere usati anche per diagnosi diretta) che ci indicano la presenza dell'agente patogeno e i test quantitativi che riescono anche a quantificare il microrganismo. I test rapidi ricercano componenti molecolari del virus o gli anticorpi prodotti dalla risposta immunitaria conseguente, presenti nei campioni biologici del paziente, vengono definiti "rapidi" perché riescono a dare un risultato entro meno di 30 minuti. Commercialmente vengono venduti come delle card con un pozzetto dove si inseriranno delle gocce di campione biologico. Data la loro semplicità, non richiedono personale particolarmente formato e in alcuni casi possono essere forniti anche da strutture non ospedaliere. Per questo sono molto importanti per la diagnostica in modo da agire in modo prontamente per prevenire la diffusione delle malattie ed eventuali rischi soprattutto di origine ambientale. I test quantitativi si basano su test immunometrici come ELISA e CLIA, richiedono un prelievo di sangue e delle specifiche strumentazioni disponibili solo nelle strutture sanitarie. Il principio su cui si basano riguarda la reazione antigene - anticorpo che viene sfruttata per determinare la concentrazione di un determinato analita. Molto spesso la reazione im-

munologica (antigene- anticorpo) è accoppiata ad una reazione enzimatica che produce una colorazione visibile ad occhio nudo. L'utilizzo di queste due componenti permette di aumentare la sensibilità (reazione enzimatica) e la specificità (reazione antigene - anticorpo).

Negli ultimi anni è nato il concetto di "Tecniche Multiplex": dato che diverse infezioni sono potenzialmente causate da un ampio spettro di patogeni, si è cominciato a pensare di creare una tecnologia che con un solo campione possa testare più agenti patogeni insieme invece che eseguire test multipli. Questa tecnologia viene chiamata Film Array. Infine la tecnica Next Generation Sequencing o NGS è una nuova tecnica di sequenziamento che permette la produzione di un numero enorme di sequenze, capace di identificare patogeni che presentano delle variazioni dalla forma classica come nel caso dell'HIV. Permette, inoltre, di sequenziare interi genomi virali e batterici con risultati disponibili entro alcuni giorni.

Data la gravità delle malattie, è necessario avere sempre disponibili in laboratorio i kit necessari per l'identificazione dell'agente patogeno: questo comporta costi elevati, considerando che in alcuni casi si parla di kit singoli e in più comporta uno sforzo continuo di formazione del personale sulle malattie e sui protocolli di identificazione.

Le malattie infettive protagoniste della globalizzazione sono tante, alcune vecchie, altre più recenti.

Malattie infettive "vecchie"

La malaria è causata da protozoi patogeni del *Plasmodium* spp. (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi*). Viene trasmessa dal morso di zanzare femmine del genere *Anopheles* infettate dal *Plasmodium* spp. È, quindi, una zoonosi. La malaria generalmente è classificata come asintomatica, non complicata o grave. I tipici sintomi iniziali sono febbre lieve, brividi, dolori muscolari e, nei bambini, sintomi digestivi. Questi sintomi possono manifestarsi all'improvviso (parossismi) e quindi progredire in sudorazione, febbre alta e spossatezza. La malaria grave è spesso fatale e si presenta con anemia grave e varie manifestazioni di danno multiorgano, tra cui la malaria cerebrale. La malaria rimane un grave carico per le persone che risiedono in aree con risorse limitate in Africa, Asia e America centrale e meridionale. A farne le spese è l'Africa, con l'88% dei casi, seguita dal Sud-est asiatico (10%), dalla regione del Mediterraneo orientale (2%) e dall'America centrale e meridionale. La prevenzione dell'infezione da *Plasmodium* spp. può essere realizzata con diversi mezzi: controllo del vettore, chemioprevenzione e vaccini. L'eradicazione delle zanzare non è più considerata un'opzione per eliminare la malaria; tuttavia, la modifica della capacità del serbatoio del vettore ha effetti sostanziali sull'incidenza della malaria. La chemioprotezione descrive l'uso di farmaci per proteggere temporaneamente i soggetti che entrano in un'area ad alta endemicità e le popolazioni a rischio di epidemie emergenti, ma viene anche sempre più presa in considerazione per le persone che visitano aree che sono state recentemente dichiarate "malaria-free". Attualmente non esiste un

vaccino contro la malaria. Molti vaccini sono in fase di sperimentazione.

Degno di nota è anche *P. knowlesi*: originariamente era conosciuto per l'insorgenza di malaria solo nelle scimmie, ma come è arrivato all'uomo? L'associazione, secondo alcuni studi, potrebbe essere il risultato di cambiamenti nell'habitat di macachi e zanzare dovuti alla deforestazione e alle attività agricole.

Nel 1882, Robert Koch scoprì l'agente eziologico della tubercolosi (TB), una malattia infettiva per via aerea causata da microrganismi del complesso *Mycobacterium tuberculosis*. I pazienti con TB sono classificati come affetti da infezione da TB latente (LTBI), che è uno stato asintomatico e non trasmissibile, o da TB attiva, che è trasmissibile. I pazienti con malattia attiva manifestano sintomi generali, come febbre, affaticamento, mancanza di appetito e perdita di peso, e quelli con malattia polmonare possono avere tosse persistente ed emottisi nella malattia avanzata. Il peso della tubercolosi è distribuito in modo eterogeneo. A livello globale, oltre il 90% dei neonati viene vaccinato ogni anno con BCG, l'unico vaccino attualmente autorizzato per prevenire lo sviluppo della TB attiva. Il trattamento standard per la tubercolosi comprende quattro antimicrobici di prima linea: isoniazide, rifampicina, pirazinamide ed etambutolo ma anche in questo caso abbiamo a che fare con l'aumento delle resistenze antibiotiche.

Infine l'infezione da virus dell'immunodeficienza umana (HIV) si è diffusa dai primati non umani all'uomo sporadicamente nel corso del 1900. Tuttavia, solo negli anni '80 il virus è arrivato all'attenzione del mondo, quando gli uomini omosessuali nei centri urbani hanno iniziato a presentare immunodeficienza avanzata e inspiegabile. Entro 2 anni dalla prima segnalazione di quella che alla fine divenne nota come sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS), gli scienziati scoprirono il virus responsabile: l'HIV. In quasi tutte le regioni del mondo, la prevalenza dell'HIV è più alta in alcuni gruppi che condividono fattori di rischio comuni. Questi gruppi chiave includono gli omosessuali, i tossicodipendenti e le prostitute. L'HIV si trasmette attraverso il contatto di fluidi corporei infetti con tessuto mucoso o sangue. La terapia antiretrovirale (ART) è disponibile per il trattamento dell'infezione da HIV da quasi due decenni ma anche in questo caso compaiono resistenze che devono essere studiate e valutate nei laboratori di microbiologia.

Malattie infettive "nuove"

La Dengue è attualmente una delle malattie tropicali trascurate più importanti al mondo e la sua incidenza è aumentata di oltre 30 volte negli ultimi decenni parallelamente all'espansione geografica dei vettori, le zanzare *Aedes* e dei virus dengue (DENV). Come la malaria, è una zoonosi. Questa malattia può essere suddivisa in tre fasi separate: la fase acuta (febbrile), la fase critica (perdita di plasma) e la fase di convalescenza o riassorbimento. I DENV vengono mantenuti in un ciclo endemico-epidemicco che coinvolge esseri umani e zanzare negli affollati centri urbani tropicali. La zanzara femmina si infetta quando prende un pasto di sangue durante la fase febbrile acuta e viremica della

malattia. Sebbene i DENV abbiano raggiunto la distribuzione in tutti i tropici nel XVIII e XIX secolo, durante il XX e XXI secolo, la globalizzazione ha permesso la loro diffusione più rapida e l'introduzione di più sierotipi virali nelle aree permissive, con il risultato che la maggior parte delle regioni tropicali è diventata iperendemica. Diversi vaccini DENV sono attualmente in fase di sviluppo, inclusi alcuni in fase III di test di sicurezza ed efficacia.

Il virus Chikungunya (CHIKV), un membro del genere Alphavirus nella famiglia Togaviridae, è stato isolato per la prima volta dal siero di un paziente febbrile in Tanzania nel 1953. I membri del genere Alphavirus sono tipicamente mantenuti in cicli naturali che implicano la trasmissione da parte di un vettore artropode tra ospiti vertebrati sensibili. Anche in questo caso si tratta di una zoonosi. I sintomi della Chikungunya includono: febbre, spesso associata a brividi intermittenti; un'eruzione petecchiale o maculopapulare, che di solito coinvolge gli arti e il tronco, ma anche il viso, i palmi delle mani e le piante dei piedi; artralgia o artrite che colpisce più articolazioni. La febbre Chikungunya mostra un interessante profilo epidemiologico che si manifesta sia in forme sporadiche che epidemiche in Africa, nel subcontinente indiano e nel Sud-Est. Grande esempio della sua trasmissione a livello globale è il caso dell'Emilia Romagna: nell'estate del 2007, un'epidemia di Chikungunya ha colpito le province italiane di Ravenna, Cesena-Forlì e Rimini. Non

sono disponibili trattamenti antivirali o vaccini specifici per Chikungunya.

Lo Zika virus, facente parte della famiglia Flaviviridae, è stato isolato per la prima volta nel 1947 nella foresta Zika in Uganda da un macaco rhesus. Esso è un nuovo virus emergente trasmesso dalle zanzare (anch'essa zoonosi). Tra i sintomi dell'infezione da virus Zika abbiamo febbre, congiuntivite, dolori articolari e muscolari, dolore dietro agli occhi, cefalea e un'eruzione cutanea di colore rosso con escrescenze. A livello epidemiologico, la sua presenza è rilevante soprattutto nelle aree dell'Africa. Al momento non sono disponibili trattamenti antivirali efficaci per l'infezione da virus Zika.

Molta preoccupazione desta la diffusione anche nel nostro Paese di casi di encefalite da West Nile virus. Questo virus viene mantenuto in un ciclo di trasmissione uccello-zanzara-uccello. Il virus West Nile ha un'ampia distribuzione in Africa, Medio Oriente, Europa meridionale, Russia occidentale, Asia sud-occidentale e Australia, che deriva dalla sua capacità di infettare numerose specie di zanzare e uccelli. Le punture di zanzara rappresentano quasi tutte le infezioni umane. I sintomi sono di insorgenza improvvisa e spesso includono mal di testa, malessere, febbre, mialgia, brividi, vomito, eruzioni cutanee, affaticamento e dolore agli occhi. La terapia per trattarlo è di supporto e nessun vaccino è autorizzato per gli esseri umani.

Dopo questa sintetica disamina delle principali malattie infettive emergenti e riemergenti non possiamo a questo punto tralasciare il tema delle antibiotico resistenze il cui incremento è strettamente legato all'ambiente ed al tema della globalizzazione.

La scoperta degli antibiotici e, successivamente, di antifungini, antivirali e antiparassitari, è stato uno dei contributi farmacologici più importanti del secolo scorso, in grado di ridurre morbilità e mortalità associate alle malattie infettive

Il miglioramento nell'accesso alle cure nei paesi a basso e medio reddito ha contribuito ad aumentare del 65% il consumo globale degli antibiotici, tra il 2000 e il 2015.

L'utilizzo poco oculato degli antibiotici, sia nell'uomo che negli animali, ha tuttavia determinato l'insorgenza di resistenza da parte dei microrganismi patogeni che, per via delle loro rapide abilità di adattamento, hanno sviluppato ben presto vari meccanismi di difesa che ne riducono la suscettibilità all'azione del farmaco. Ancora oggi il 30 % delle prescrizioni antibiotiche è considerata errata o non ottimale.

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza viene considerato dalla WHO un problema globale di portata rilevante, sia in termini di mortalità e morbilità, sia per l'impatto che i costi di trattamento del paziente hanno sul sistema sanitario. Negli ultimi anni

sono stati sviluppati modelli matematici in grado di predire l'impatto dell'antibiotico-resistenza sulla salute pubblica, in termini di mortalità: nel 2009 lo European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) ha stimato che la resistenza agli antibiotici è responsabile della morte di 25.000 persone all'anno nei paesi europei, aumentate a 33.000 secondo alcuni studi più recenti, del 2019 (3); nel 2013 il CDC (Center for Disease Control and Prevention) americano ha stimato in 23.000 le morti annue per antibiotico-resistenza nei soli Stati Uniti. Globalmente, la resistenza agli antibiotici è responsabile di 500.000 morti all'anno, di cui il 40% sono bambini (3). Nel 2016 infine il team di Lord Jim O'Neill ha pubblicato un rapporto secondo cui entro il 2050 si prevedono 10 milioni di morti all'anno dovute alla resistenza agli antibiotici.

L'antibiotico-resistenza è un processo evolutivo in cui partecipano diversi elementi interconnessi tra loro: un gene per la resistenza agli antibiotici presente in un batterio deve essere integrato nel plasmide di un altro batterio, il quale sia in grado di infettare un ospite diverso trasmettendo la resistenza all'antibiotico ad un altro organismo.

La resistenza agli antibiotici può quindi essere acquisita per 1) insorgenza di una mutazione direttamente nel genoma del batterio, oppure mediante acquisizione del gene attraverso trasferimento orizzontale di plasmidi. Quest'ultimo evento è più pericoloso se consideriamo che il gene per la resistenza può essere trasmesso anche a microrganismi

smi di specie diverse che possono colonizzare l'uomo e/o gli animali, favorendo la diffusione dei geni per la resistenza all'antibiotico nell'ambiente. Questo è il caso ad esempio di *Escherichia coli*, di cui esistono diversi ceppi con diversi gradi di virulenza e capacità di infettare anche animali oltre all'uomo. È stato inoltre osservato che gli allevatori a diretto contatto con vitelli e maiali hanno un rischio più alto di contrarre un'infezione da uno *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA). La resistenza agli antibiotici si diffonde silenziosamente, ma una volta instaurata in un ambiente diventa di facile da controllare ed eradicare, poiché può diventare endemica nei batteri del microbioma degli individui

Diversi microrganismi hanno sviluppato sistemi di resistenza agli antibiotici che oggi consentono loro di sfuggire all'azione antibatterica dei farmaci e di causare infezioni che mettono l'organismo in pericolo di vita. In particolare, ci sono microrganismi che hanno sviluppato resistenza a più di tre classi di antibiotici. Questi microrganismi si definiscono multi-resistenti. Nel febbraio 2017 la WHO ha pubblicato una lista dei batteri patogeni per cui c'è la necessità urgente di individuare nuovi antibiotici: questi batteri vengono indicati con l'acronimo ESKAPE e sono *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*

La comparsa di microrganismi multi-resistenti richiede non solo una rapida identificazione del microrganismo responsabile dell'infezione, ma anche una rapida determinazione della sua suscettibilità/resistenza agli antibiotici, per determinare il miglior trattamento possibile in termini di farmaco e dosaggio, e prevenire l'insorgenza e la diffusione di resistenze ai farmaci disponibili. Nonostante i rapidi sviluppi tecnologici, spesso il TAT richiede alcuni giorni, pertanto si tende a iniziare una terapia empirica, ad ampio spettro, in attesa dei risultati. Questa pratica tuttavia può essere deleteria, sia per la salute del paziente (l'antibiotico provoca disbiosi a livello del microbioma) sia per il rischio di indurre o esacerbare resistenze agli antibiotici.

Di seguito vengono illustrate alcune metodologie di identificazione della resistenza agli antibiotici e poi sintetizzate nella tabella 1:

1) Metodologie Convenzionali

A. **Metodi colturali (fenotipici), manuali e automatizzati:** la crescita del microrganismo viene valutata in presenza di diverse concentrazioni del farmaco e si determina la minima concentrazione inibente (MIC). Vengono utilizzati i criteri stabiliti da EUCAST e da CLSI per determinare i breakpoint di suscettibilità, che tuttavia non sempre sono concordanti. Questa metodologia, tradizionalmente utilizzata, necessita di isolare il patogeno, richiede dalle 12 alle 72 ore per ottenere gli esiti e non può essere utilizzato per microrganismi a lenta crescita. Non

permette inoltre di determinare i meccanismi di resistenza adottati dal batterio.

B. **Metodi molecolari:** prevedono l'amplificazione dei geni per la resistenza mediante PCR. Diverse metodologie sono state sviluppate (multiplex PCR, RT-PCR quantitativa, DNA-microarrays): esse sono dotate di maggiore precisione, sensibilità e specificità rispetto ai test colturali, permettono di utilizzare colture non pure e di ottenere risultati in 1-6 ore. Tuttavia l'amplificazione di geni silenti o pseudogeni per la resistenza agli antibiotici può determinare l'identificazione di falsi positivi, mentre mutazioni dei siti di legame del primer può ridurre l'amplificazione PCR. Infine, questa metodologia consente di identificare solo geni già noti e non permette di calcolare la MIC.

2) Metodologie non convenzionali

A. **Whole genome e NGS analisi:** sequenziano l'intero genoma batterico. Questa metodica permette di individuare la presenza di geni per la resistenza ad un costo molto basso, senza necessità di isolare e/o identificare il microrganismo. Questa metodologia si può abbinare molto bene ai metodi colturali classici, fornendo informazioni rapide sulla presenza di geni per la resistenza agli antibiotici in batteri coltivabili e non coltivabili. Si stanno sviluppando programmi di machine-learning in grado di predire, con una altissima precisione, la resistenza all'antibiotico e la MIC relativa.

B. **Spettrometria di massa MALDI-TOF:** questa metodologia viene spesso utilizzata per l'identificazione di specie batteriche. Recentemente è stata applicata anche allo studio della resistenza agli antibiotici, con risultati superiori all'analisi genetica, specialmente perché permette di identificare enzimi attivi coinvolti nella resistenza. Per ottenere risultati riproducibili, il processo deve essere standardizzato. La tecnologia MALDI-TOF è affidabile, rapida (pochi minuti), accurata, semplice da usare ed ecologica, tuttavia l'alto costo dell'apparecchiatura e la sua dimensione la rendono poco praticabile in situazioni con scarsa disponibilità economica e di spazio, richiede inoltre l'isolamento del microrganismo e la purificazione del campione.

3) Utilizzo di **biosensori:** permettono di riconoscere la presenza di un patogeno o della sua attività metabolica mediante rilevamento di un elemento di riconoscimento biologico, a contatto con un trasduttore di segnale e un rilevatore. I segnali possono essere elettrochimici o ottici, e danno informazioni quantitative e semi-quantitative, senza utilizzo di reagenti.

4) **Test biochimici:** possono essere applicati per rilevare la presenza di enzimi che mediano la resistenza, come le carbapenemasi. Necessita di coltivare il microrganismo e non permette di

valutare la suscettibilità agli antibiotici.

- 5) **Tecnologie Lab-on-a-chip e microfluidica:** queste metodologie offrono una serie di vantaggi, tra cui rapidità, basso costo, pochi reagenti necessari, piccoli volumi del campione, automatismo, compattezza e trasportabilità. Permettono di identificare i geni per la resistenza, abbreviando la TAT (alcune ore); per-

mettono inoltre di monitorare la crescita del microrganismo in un mezzo contenente l'antibiotico, per i test di suscettibilità. Esistono diverse metodologie, basate su spettroscopia, metodi colorimetrici, variazioni di pH, tecnologie multiplex e POC (point-of-care). Queste tecnologie hanno TAT molto brevi (da 30 minuti a 24 ore), ma i costi e la complessità non le rendono ancora utilizzabili nella pratica clinica quotidiana.

Tabella 1 : Metodi per l'identificazione di resistenza e suscettibilità agli antibiotici

Tipologia	Esempio	Vantaggi	Svantaggi
Metodi fenotipici	Manuali e automatici	<ul style="list-style-type: none"> Validati Semplici Permettono di stimare la MIC 	<ul style="list-style-type: none"> Necessità di isolare il microrganismo e di coltivarlo Disaccordo tra gli standard Mancanza dei valori di cut-off per alcune unità tassonomiche
Metodi molecolari	PCR RT-PCR DNA-microarrays	<ul style="list-style-type: none"> Non serve isolare e purificare il campione Identificare i geni per la resistenza 	<ul style="list-style-type: none"> Non fornisce la MIC Alti costi
Whole genome e NGS analisi	Pirosequenziamento WGS Sequenziamento nanopore	<ul style="list-style-type: none"> Ottimo per microrganismi non coltivabili Identifica i geni per la resistenza Trasportabile ed economico 	<ul style="list-style-type: none"> Metodologia complessa Alto costo dell'apparecchiatura Maggior rischio di falsi positivi/negativi Non definisce la MIC
MALDI-TOF		<ul style="list-style-type: none"> Veloce Automatico Costi bassi Determina le basi molecolari della resistenza 	<ul style="list-style-type: none"> Alto costo dell'apparecchiatura Necessita di isolare e coltivare il microrganismo Necessita di sviluppare un database di dati Non trasportabile Non definisce la MIC
Biosensori	Elettrochimici Ottici	<ul style="list-style-type: none"> Struttura semplice (analisi elettrochimica) Non necessita di reagenti 	<ul style="list-style-type: none"> Richiede purezza del campione (per analisi ottica) Struttura complessa (analisi ottica) Sensibilità e specificità moderate (analisi elettrochimica)
Test biochimici		<ul style="list-style-type: none"> Veloce Trasportabile 	<ul style="list-style-type: none"> Richiede di coltivare il microrganismo Non fornisce la MIC
Microfluidica e Lab-on-a-chip	Spettroscopia Colorimetrico pH-based POC Multiplex	<ul style="list-style-type: none"> Veloce Accurato Basso costo Automatico Compatto e trasportabile 	<ul style="list-style-type: none"> Non definisce la MIC Alto costo dell'apparecchiatura Complesso

La necessità di avviare terapie antibiotiche efficaci fin da subito porta all'esigenza di individuare test diagnostici e metodologie rapide. Una metodolo-

gia ottimale, specialmente point-of-care, dovrebbe essere rapida, altamente sensibile, economica, automatizzata, con necessità di volumi di materiale

molto piccoli e che fornisca una MIC per un numero elevato di antibiotici. I metodi discussi nei punti 1-5 hanno alcuni vantaggi, ma non incontrano tutti i criteri per una metodologia ottimale, pertanto attualmente è necessario combinare diverse metodologie per arrivare rapidamente alla diagnosi e all'identificazione della resistenza/suscettibilità all'antibiotico.

Un altro aspetto importante è la realizzazione di sistemi di sorveglianza, che monitorino nel tempo lo sviluppo e l'acquisizione di resistenza da parte dei vari microrganismi.

Il sistema di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza è definito come "una procedura strutturata e sistematica per misurare la prevalenza¹ o l'incidenza² di antibiotico-resistenza attraverso una sorveglianza di continua e periodica condotta mediante una metodologia definita e indicatori specifici". I dati raccolti con questo sistema possono essere utilizzati per impostare terapie empiriche e implemen-

La maggior parte di questi sistemi di sorveglianza sono eterogenei; differiscono infatti in diversi aspetti :

- la scelta dei microrganismi da sottoporre a sorveglianza (umani, animali e commensali);
- la tipologia di antibiotici da sottoporre a sorveglianza;
- la scelta del test di suscettibilità all'antibiotico;
- la scelta di diversi indici epidemiologici (prevalenza vs incidenza);
- la provenienza del campione (alcuni sistemi considerano solo la resistenza agli antibiotici in campioni di sangue e liquor, ad esempio, mentre altri considerano tutti gli isolati clinici);
- il numero di laboratori e ospedali coinvolti nel sistema di sorveglianza;
- la cadenza (settimanale, mensile, annuale) con cui vengono pubblicati i report di aggiornamento.

Gli autori della review propongono alcuni suggerimenti circa il miglioramento dei sistemi di sorveglianza, in modo da uniformare l'analisi e il confronto dei dati e avere risultati che possano essere generalizzati.

Suggeriscono ad esempio di ampliare l'analisi della resistenza agli antibiotici anche agli animali e all'ambiente, nell'ottica del concetto "One Health". Questo aspetto è molto importante perché è emersa in alcuni casi la presenza di ceppi batterici di origine animale in individui che non erano mai venuti a diretto contatto con l'animale stesso, se non attraverso gli alimenti. La contaminazione alimentare è uno dei fattori che contribuisce alla diffusione globale della resistenza agli antibiotici .

Un altro suggerimento riguarda la ricerca della resistenza alla colistina, che viene effettuato in pochi sistemi di sorveglianza. La colistina è l'ultima risorsa disponibile per combattere infezioni da gram negativi resistenti ai carbapenemi, e la resistenza a questo antibiotico è emersa in molti microrganismi negli ultimi anni.

Altri autori suggeriscono l'implementazione di test di monitoraggio della resistenza agli antibiotici,

tare linee guida nazionali e internazionali per il trattamento antibiotico.

La resistenza agli antibiotici è infatti una situazione che differisce da una regione all'altra, dipendendo dalla prevalenza/incidenza di una malattia infettiva, dalla tipologia di antibiotici e di test di suscettibilità utilizzati.

Una recente revisione dei sistemi di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza nel mondo (Diallo OO, Baron SA, Abat C, Colson P, Chaudet H, Rolain JM. Antibiotic resistance surveillance systems: A review. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;23:430-438. doi:10.1016/j.jgar.2020.10.009) ha individuato 71 diversi sistemi di sorveglianza, per lo più relativi all'uomo, con monitoraggio di microrganismi resistenti di rilevanza globale: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*; alcuni sistemi monitorano anche la resistenza agli antibiotici negli animali e nei batteri commensali.

come l'identificazione rapida di ESBLs (extended spectrum β -lactamases) e carbapenemasi, che è fondamentale per prevenire la loro diffusione e per ottimizzare l'intervento terapeutico una volta identificati.

In ultimo, alcuni autori suggeriscono il monitoraggio della resistenza agli antibiotici anche nei commensali del microbioma.

Un sistema di sorveglianza ottimale dovrebbe includere diversi attori: medici, epidemiologi, veterinari, farmacisti, nell'ottica di un controllo "One Health" della diffusione dell'antibiotico-resistenza, combinando dati provenienti da diverse fonti (uomo, animali, ambiente), e armonizzando le tecniche analitiche (identificazione di una MIC universale per gli antibiotici), con la creazione di un database pubblico comprendente anche dati epidemiologici, demografici e clinici.

Un sistema così strutturato permetterebbe di monitorare l'evoluzione dell'antibiotico-resistenza e di uniformare interventi mirati a controllarne e ridurre la diffusione su larga scala.

¹ Prevalenza: indica la proporzione di individui di una popolazione che, in un dato momento, presenta la malattia

² Incidenza: indica la proporzione di individui che sviluppa la malattia in un determinato periodo di tempo

A questo punto non ci siamo dimenticati di SARS CoV2. Ma come vengono affrontate queste emergenze nei nostri ospedali? La recente pandemia CoVID-19 costituisce un modello per studiare moderni approcci metodologici di gestione dell'emergenza infettiva.

Il Laboratorio di Microbiologia dell'ASO di Alessandria si configura come HUB della rete delle microbiologie piemontesi dell'Area Omogenea Sud Orientale. Nell'ultima emergenza pandemica (CoVID-19) il reparto, come tutta la comunità scientifica, si è trovato a far fronte all'emergenza. La crescente domanda di tamponi, a partire da marzo 2020, ha portato l'azienda a dover reingegnerizzare completamente il processo produttivo, al fine di garantire una risposta rapida, non solo ai tamponi dei pazienti interni, ma anche ai tamponi provenienti dall'azienda sanitaria territoriale. Inoltre, il 6 marzo dello stesso anno, la Giunta regionale della regione Piemonte ha scelto il laboratorio di microbiologia dell'ASO di Alessandria per l'elaborazione dei test molecolari su tampone nasofaringeo per l'individuazione delle infezioni da Covid-19. Consapevoli dell'enorme aumento delle richieste d'esame è stato necessario non solo aumentare la capacità produttiva del laboratorio, ma analizzare profondamente il processo per identificare potenziali inefficienze. Abbracciando pertanto il progetto *Lean Production* (insieme di principi, metodi e tecniche per la gestione dei processi operativi, che mira ad aumentare il valore percepito dal cliente finale e a ridurre sistematicamente gli sprechi) nel laboratorio di Microbiologia dell'AOAL è stato necessario attuare una serie di modifiche che portassero al miglioramento dei metodi, dei tempi e nell'organizzazione del reparto.

I tempi medi di refertazione (TAT) dei tamponi Covid19, provenienti da diverse realtà, nel mese di marzo 2020 sono stati di 36 ore comprendenti la presa in carico dei campioni, l'accettazione, l'aliquota in provetta secondaria, processazione, la refertazione, l'aggiornamento in piattaforma e congelamento dei tamponi positivi. I laboratori dell'Azienda Ospedaliera di Alessandria erano dotati di solo 2 strumenti configurati alla processazione dei tamponi Covid-19: MG 24 e COBAS Z 480 (lavoro fisicamente impegnativo e dispendioso; 2 TLB impegnati dalle 08.00 alle 20.00 per 3 sedute di 24 tamponi ciascuna).

Le contromisure implementate sono state:

- la creazione del *Covid Center*; è stato necessario riorganizzare l'attività COVID prendendo in considerazione spazi, risorse umane, risorse informatiche, percorsi produttivi e collaborazioni al fine di garantire efficienza al sistema. La collaborazione con il Centro Trasfusionale ha garantito in fase di emergenza la produzione nei fermi macchina e la gestione dell'urgenza notturna senza risorse aggiuntive

- l'incremento dell'organico; una parte del personale già in forze alla microbiologia è stato affiancato da nuove assunzioni a tempo determinato ed assegnato alla produzione dei tamponi Covid-19. Successivamente, nella seconda e terza ondata, in funzione dell'introduzione di una nuova tecnologia ad alta automazione, parte del personale è stata riassegnata alla diagnostica microbiologia istituzionale garantendo una tournazione nei settori Batteriologia, Parassitologia, Micologia, Sierologia, Biologia Molecolare e Controlli Ambientali ed estendendo l'orario di apertura del laboratorio dalle 08.00 alle 20.00 sette giorni su sette;
- l'implementazione tecnologica con nuove tecnologie ad alta produttività e flessibilità al fine di assicurare rapidità per i casi urgenti e massimizzazione della produzione. Il laboratorio dispone di 4 linee produttive molecolari e di 2 linee di test antigenici, La produzione nel 2020 è stata di circa 100.000 test.
- L'utilizzo dei POCT (POINT OF CARE TESTING) nel mese di Novembre 2020 è stato concertato con la Direzione Generale l'acquisizione di strumentazione e reagenti per un test antigenico rapido (Tag) gestito in POCT (Point of care testing). Secondo vari studi pubblicati su *Nature* ed altre riviste internazionali e siti di divulgazione scientifica, la curva di rilevazione dei TAG è uguale a quella dell'isolamento colturale del virus. Questa considerazione assunse un'importanza decisiva nella scelta dei test da utilizzare in quanto si veniva a delineare in modo chiaro come il test molecolare fosse più sensibile e quindi maggiormente idoneo ad intercettare precocemente i contagiati/infetti mentre il test TAG fosse maggiormente in grado di identificare i pazienti a maggior rischio di trasmissione. Per l'azienda di Alessandria, l'utilizzo dei test antigenici veniva ritenuto strategico perché era potenzialmente in grado di produrre vantaggi in termini di controllo dell'infezione, inizio della terapia, ottimizzazione dei costi di gestione del paziente in ammissione ed in dimissione. La scelta di un test adatto alla gestione POCT doveva garantire oltre alle performance analitiche che devono essere alte sia in termini di sensibilità che di specificità, la tracciabilità del risultato, la sicurezza per l'ambiente e per l'operatore, la semplicità d'uso. Per queste ragioni è stato costituito un Gruppo di Lavoro (GdL) per la gestione dei POCT.

Il GdL POCT controlla e monitora le operatività e le procedure a garanzia della gestione sicura delle apparecchiature come la formazione del personale, l'approvvigionamento dei reattivi, la manutenzione, i controlli e lo smaltimento dei reagenti e dei consumabili etc. Ogni strumento è stato inventariato e ha un proprio registro dove vengono registrate le operatività principali, le manutenzioni, i controlli, i guasti e le eventuali problematiche. Il test viene

eseguito con l'utilizzo di uno strumento di lettura in fluorescenza microfluidica (strumentazione di terza generazione) LumiraDx, Dumat Business Park Alloa FK10 2PB, Regno Unito. I setting assistenziali che utilizzano Tag sono : Pronto Soccorso , Hotspot scolastico, pre-ricovero, screening dipendenti e reparti degenza. Il laboratorio di microbiologia gestisce 10 strumenti.

Prima dell'introduzione sono stati eseguiti dei test di valutazione delle performance diagnostiche i cui risultati sono stati pubblicati.

Sono stati analizzati i risultati di tutti i pazienti che sono stati sottoposti sia a tampone antigenico che a tampone molecolare nell'intervallo Ottobre 2020 - Gennaio 2021. Dei 792 tamponi eseguiti, 144 antigenici sono risultati positivi a fronte di 166 molecolari positivi. Il test antigenico è risultato positivo

in 30 casi corrispondenti a test molecolari negativi ed al contrario è risultato negativo in 52 casi con test molecolare positivo. Pertanto, la sensibilità clinica è risulta essere del 68,7%, la specificità del 95,2%, il valore predittivo positivo del 79,2% e il valore predittivo negativo del 91,9%. Un test antigenico positivo è 3,8 volte più probabile che anche il test molecolare risulti positivo piuttosto che negativo. Al contrario in presenza di un test antigenico negativo è 0,08 volte più probabile che il test molecolare risulti positivo.

Nel mese di Febbraio 2021 è stato avviato uno studio segnalato al CE per la sorveglianza attiva dei pazienti ricoverati eseguendo più di 1500 tamponi permettendo di monitorare la situazione interna all'ospedale evitando lo sviluppo di pericolosi cluster epidemici.

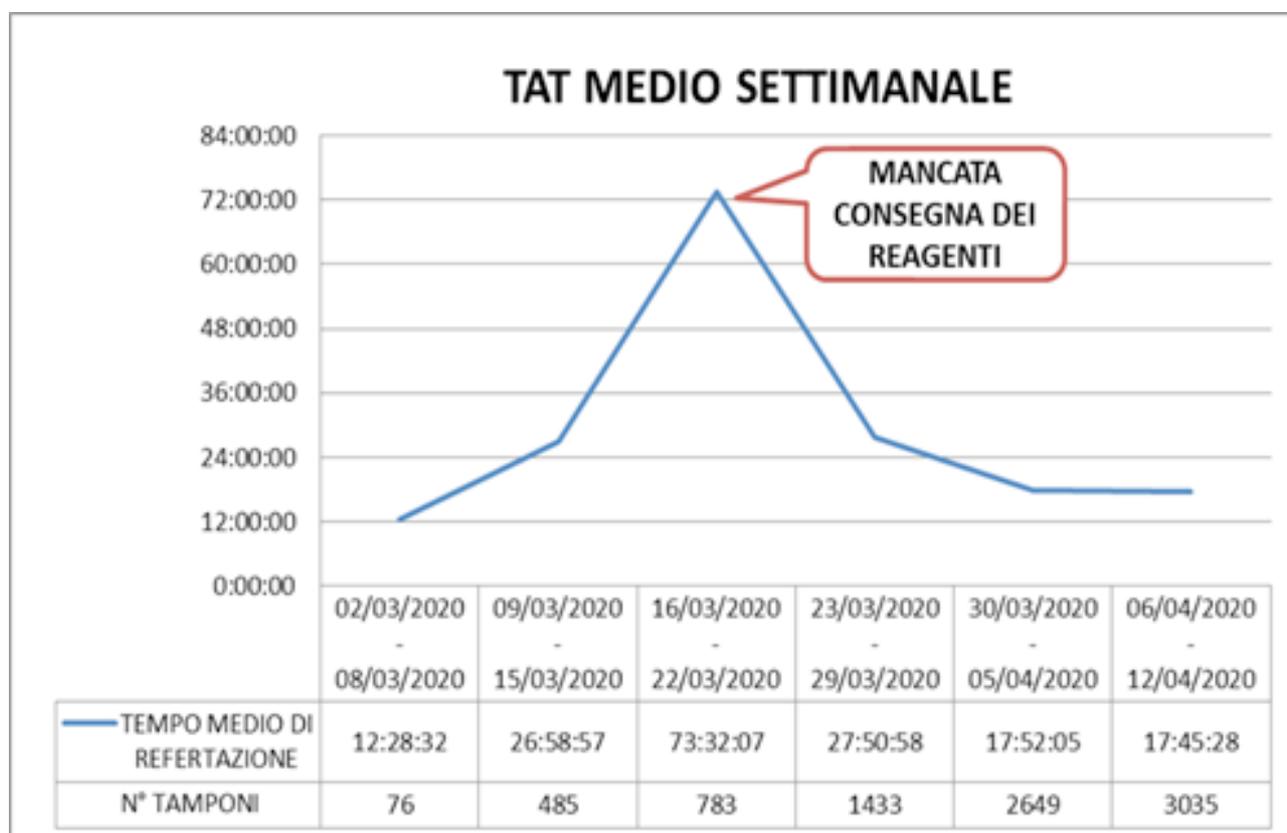


Figura a - Tempo medio di Refertazione dei tamponi processati nell'ospedale di Alessandria da marzo 2020 a giugno 2020. Nella settimana del 16 marzo il TAT è quintuplicato a causa della mancata consegna dei reagenti.

LA LENTEZZA

La lentezza: dove serve ancora un esame colturale accurato e saggi di sensibilità precisi

Le responsabilità del laboratorio di microbiologia clinica e di chi in esso opera, spaziano dalla caratterizzazione dell'agente eziologico causale di una determinata infezione all'identificazione di focolai di malattie globali. I quesiti diagnostici che giornalmente questo si ritrova a fronteggiare diventano sempre più complessi: invecchiamento, comorbosità, insorgenza di un repertorio di agenti patogeni nuovi, riemergenti e multi/ultra resistenti sono alcuni dei motivi che spiegano quanto il microbiologo clinico ed il laboratorio di microbiologia in generale, rivestano un ruolo fondamentale per garantire una corretta assistenza sanitaria. Le decisioni mediche infatti, scaturiscono da un' accurata analisi dei risultati di laboratorio che rappresentano il punto di partenza dell'intero iter diagnostico di una patologia infettiva. Nella diagnosi microbiologica, l'ottimizzazione dei flussi di lavoro, delle risorse sia materiali che umane, l'approccio a nuove tecnologie, l'aumento dell'efficienza per far fronte al carico di lavoro sono anch' essi pilastri essenziali sui quali si deve basare il lavoro del microbiologo. Tutto ciò, muove dalla necessità di mantenere alta la produttività continuando però a garantire e mantenere la qualità analitica. Se l'automazione ha interessato sin da subito settori e discipline diagnostiche come la chimica, l'ematologia e la biologia molecolare, non è stato così facile invece il suo debutto nella microbiologia classica. Il motivo di ciò risiede in problematiche come ad esempio la complessità e la variabilità dei tipi di campioni, i numerosi processi analitici diversi ed il volume insufficiente di campioni. Ancor più di tutte le metodiche nuove ed automatizzate che si stanno evolvendo continuamente, la microbiologia tradizionale può essere metaforicamente identificata come una piramide delle responsabilità dove ognuno ha il proprio ruolo: dalla validazione, all'organizzazione, all'esecuzione della metodica e all'interpretazione dei risultati di quest'ultima. Solo la stretta collaborazione tra tutte le figure coinvolte a diverso titolo nell'indagine microbiologica ed il rispetto di tutte le fasi delle corrette procedure può assicurare la piena valorizzazione dell'indagine. Il valore di una prestazione diagnostica di laboratorio deve sempre tenere conto di quale sia l'obiettivo principale del test e cioè garantire accuratezza e dare valore al paziente attraverso l'impatto che l'esame genera su di esso.

Le principali modalità di diagnosi sono :

- **DIAGNOSI DIRETTA:** importante perché volta a stabilire la presenza dell'agente patogeno, la sua identità e la sensibilità agli antibiotici direttamente nel campione. Gli strumenti di cui si avvale sono esame microscopico, esame colturale (isolamento), identificazione (a livello di specie) ed antibiogramma.
- **DIAGNOSI RAPIDA:** direttamente da campione o da coltura, si propone di individuare l'agente patogeno tramite la ricerca di antigeni o sequenze geniche.
- **DIAGNOSI INDIRETTA:** tesa a rilevare la risposta immunitaria e quindi anticorpale dell'ospite in risposta all'agente infettivo.

Le metodologie appartenenti alla diagnosi diretta, rappresentano ancora oggi importanti metodi alcuni dei quali effettuati manualmente, in cui la competenza dell'operatore, la qualità, il giusto tempo dell'esecuzione dell'esame, i controlli di qualità esterni ed interni, l'adeguata interpretazione dei risultati sono tutti requisiti essenziali e necessari.

L'esame microscopico fornisce informazioni utili per:

- porre diagnosi presuntiva, a seguito della evidenziazione di microrganismi e delle loro caratteristiche (tintoriali, morfologia, disposizione)
- guidare le decisioni del Microbiologo (scelta di idonei presidi diagnostici) e del Clinico (rapida formulazione della terapia)
- stabilire la idoneità del campione

Il campione può essere osservato: "a fresco", ossia non fissato; adatto per la ricerca di microrganismi difficilmente colorabili e per lo studio di alcune proprietà biologiche (forma, organizzazione, motilità, reattività chimica e/o sierologica) o previa fissazione (fisica o chimica) e successiva colorazione, per la ricerca "mirata" di specifici gruppi microbici/patogeni.

La scelta della tecnica microscopica da impiegare dipende dal patogeno di cui si sospetta la presenza.

L'esame colturale si articola in tre fasi:

1. Isolamento della specie batterica
2. Identificazione della specie batterica
3. Eventuale antibiogramma

L'isolamento costituisce la tecnica di maggior impiego nella diagnostica microbiologica. Prevede la scelta di idonei terreni di coltura, la semina del microrganismo, l'incubazione e la lettura ed interpretazione dei risultati. I terreni di coltura possono essere distinti in base allo stato fisico (liquidi come i brodi o solidi) o in base alla tipologia di informazioni che essi possono fornire. Tra questi:

- **TERRENI NON SELETTIVI:** consentono la crescita batterica di molte delle specie note. Per citarne uno l'agar sangue.
- **TERRENI SELETTIVI:** consente la crescita di una o alcune specie batteriche inibendo la crescita di altre.
- **TERRENI ELETTRIVI:** favoriscono la crescita di una o alcune specie ma non inibiscono la formazione di altre.

- TERRENI DIFFERENZIALI: consentono di differenziare le specie batteriche sulla base delle caratteristiche biochimiche.

La semina del campione, è finalizzata all'ottenimento di colonie isolate, ossia sufficientemente distinguibili, necessarie per la successiva caratterizzazione del ceppo (es. identificazione, antibiogramma). Pertanto, soltanto i terreni agarizzati possono essere utilizzati a tal fine. Il terreno da impiegare viene adeguatamente scelto sulla base della tipologia del campione prelevato e del sospetto diagnostico.

Attraverso l'utilizzo di un'ansa sterile o di una spatola, il campione viene distribuito sulla superficie del terreno in modo da avere la formazione di colonie ravvicinate nel primo tratto di semina e colonie isolate nell'ultimo tratto. Al fine di caratterizzare l'isolato (identificazione, test antibiotico-sensibilità), una singola colonia verrà prelevata in sterilità, quindi coltivata nuovamente (sub-coltura) in adeguato terreno al fine di ottenere una coltura pura del microrganismo, ossia formata da cellule "clonali" (derivanti tutte dalla stessa cellula madre "progenitrice"). Una coltura batterica pura rimane essenziale per lo studio della sua virulenza, della sua suscettibilità agli antibiotici e della sua sequenza genomica per facilitare la comprensione e il trattamento delle malattie causate. A seguito della semina del campione su opportuno terreno, esso verrà posto in un incubatore, in condizioni ottimali in termini di temperatura, tensione di O₂ e tempo per la crescita del microrganismo. Il tempo richiesto per la crescita dei batteri varia a seconda della specie batterica considerata.

Gli intervalli temporali si differenziano notevolmente se consideriamo ad esempio alcuni tra i principali microrganismi di rilevanza clinica come *Escherichia coli* e gran parte dei patogeni che impiegano un tempo di 20-30 min sino ad arrivare al *Treponema pallidum* (agente eziologico della Sifilide) che raggiunge le 33h o *Mycobacterium tuberculosis* 18h. Tra i metodi di identificazione, dal punto di vista clinico il più importante è costituito dall'antibiogramma, che è un test in vitro eseguito per rilevare la presenza o l'assenza di resistenza di un ceppo batterico ad una serie di antibiotici utilizzabili per il trattamento dell'infezione sostenuta da un determinato ceppo. L'antibiogramma comprende due tipologie di esecuzione:

1. Metodi genotipici: rilevano i geni di resistenza
2. Metodi fenotipici: possono essere di tipo qualitativo e determinano se un microrganismo è sensibile, resistente o sensibile ad alte dosi ad un determinato antibiotico o quantitativo cioè rilevano la concentrazione Minima di Antibiotico (MIC) in grado di inibire, in condizioni sperimentali prefissate, ogni segno visibile di crescita del microrganismo.

I test principalmente utilizzati sono: il metodo Kirby Bauer, la micro-diluizione in brodo (BMD) e l'E-test. Il metodo Kirby-Bauer è una diffusione su disco, che prevede la misurazione in millimetri dei diametri di aloni di inibizione che si creano intorno

ai dischi contenenti l'antibiotico testato; più spesso viene utilizzata la micro diluizione in brodo BMD (metodo che può essere automatizzato). L'E-test è un metodo manuale, eseguito su agar, usando un strisce di carta con un gradiente di concentrazione continuo di un dato antibiotico. Comunemente, però, per avere risultati di sensibilità rapidi e per saggiare un gran numero di test, viene usato un sistema automatizzato, come, ad esempio, il Vitek2 (Biomerieux). In ogni caso, partendo da una coltura pura o da una colonia isolata il tempo necessario è di 24/48 ore. Oltre a predire la terapia mirata con l'antibiotico testato, l'antibiogramma è ancora importante per la sorveglianza e per l'epidemiologia delle infezioni gravi. Per concludere, il microbiologo clinico deve eseguire ed interpretare i saggi di sensibilità in vitro sfruttando il tempo necessario, garantendo accuratezza ed esponendo la refertazione in modo chiaro e comprensibile. Inoltre la variabilità biologica del mondo microbico può essere in parte superata attenendosi a rigorosa standardizzazione di tutte le fasi analitiche e post-analitiche ed effettuando controlli di qualità esterni ed interni secondo i tempi prestabiliti.

Nonostante il mondo microscopico possa sembrare inavvicinabile ai nostri sensi, esistono delle metodiche relativamente semplici che ci permettono di identificare il tipo, la specie ed il ceppo di batterio presente in una coltura.

Dal momento che non è possibile osservare direttamente ogni batterio, né leggere e interpretare il genoma di ogni singolo individuo della colonia, dobbiamo affidarci ad una serie di reazioni biochimiche per stilare la "carta d'identità" del microrganismo presente nel nostro isolato. Inizialmente questo veniva fatto usando delle provette contenenti dei substrati di coltura specifici. Il progresso ha poi portato alla sostituzione delle provette con delle micro-gallerie biochimiche contenenti anche diverse decine di capsule con relativi reagenti e condizioni.

Il procedimento è lo stesso per entrambe le metodiche e risulta piuttosto semplice: aliquote di isolato vengono inoculate nei substrati e, se il batterio trova le condizioni ideali di pH, temperatura, atmosfera e fonti di carbonio, prolifera. Crescendo, le colonie batteriche consumano il substrato fornito, producendo metaboliti. Aggiungendo delle sostanze cromogene al substrato, che quindi assume colori interpretabili, è possibile osservare ad occhio nudo quali reazioni biochimiche si stanno svolgendo. Una volta ottenuti i risultati è possibile confrontare le proprietà dell'isolato con quelle di tutti i microrganismi raccolti nelle banche dati disponibili, quindi di risalire alla specie che costituisce di fatto il nostro campione.

Ovviamente non basta riconoscere il profilo biochimico di un batterio per combatterlo, infatti, con il crescere del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, è necessario stilare un profilo delle debolezze e delle resistenze che sia più dettagliato, preciso e veloce possibile. Un livello ottimale di queste qualità è stato raggiunto grazie all'avvento della semi-

automazione, che sfrutta gli stessi principi dei saggi manuali riducendo notevolmente tempi, costi e probabilità di errore.

Come per il profilo biochimico, anche quello antibiotico viene stilato testando diversi principi attivi a diverse concentrazioni, in modo da fornire indicazioni utili al confronto con i dati EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) l'organo istituzionale europeo che si occupa di fornire annualmente dati aggiornati per la lettura dei test di sensibilità agli antibiotici. Lo scopo di questa organizzazione è quello di standardizzare la lettura di questi test, in modo da uniformare i trattamenti e tenere costantemente sotto osservazione l'eventuale diffusione di ceppi resistenti.

Il microbiologo, quindi, una volta identificato il bersaglio e conosciute le sue debolezze, è in grado di mettere in campo le conoscenze necessarie per eliminarlo, o quantomeno limitarne o impedire la proliferazione.

Risulta quindi ovvio quanto sia importante la fase di riconoscimento per permettere al paziente di ricevere il corretto trattamento, quindi di sopravvivere o meno. La qualità del lavoro del microbiologo è letteralmente una questione di vita o di morte!

In Italia, dal 2001 l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) coordina in ambito umano il sistema di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza AR-ISS, costituito da una rete di laboratori ospedalieri di microbiologia clinica (tra questi anche quello dell'Ospedale Sant'Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria) reclutati su base volontaria, con l'obiettivo primario di descrivere frequenza e andamento dell'antibiotico-resistenza in un gruppo di patogeni rilevanti dal punto di vista epidemiologico e clinico. I dati di antibiotico resistenza vengono estratti dalla routine diagnostica.

Il lavoro di sorveglianza è un processo lento ed accurato, solitamente i dati vengono raccolti per 3 anni e successivamente viene pubblicato un report che mostra l'andamento nazionale dell'antibiotico-resistenza nell'arco del triennio. L'obiettivo principale del progetto è quello di migliorare il sistema di sorveglianza e sensibilizzare gli operatori del settore.

L'accuratezza della raccolta dati è il valore principale per la realizzazione di un report nazionale ed anche internazionale (nel caso del progetto GLASS) con dati attendibili, che offra informazioni corrette sull'andamento del fenomeno.

È per questa ragione, che l'obiettivo principale del progetto AR-ISS è quello di contrastare l'antibiotico resistenza focalizzandosi sugli obiettivi, le tecniche e le modalità con cui i dati vengono raccolti. Il protocollo del progetto fornisce, infatti, i requisiti minimi che ogni laboratorio deve avere per standardizzare tutti i metodi e le tecniche con cui i dati vengono rilevati e forniti, per garantire la riproducibilità dei risultati.

Il lavoro lento, accurato e standardizzato cioè reso unico ed uguale per tutti i laboratori che forniscono i dati è fondamentale ed è quindi importante che ci siano operatori che svolgano il lavoro con metodo, allo scopo di mettere insieme i risultati in maniera corretta.

Nel 2015, l'OMS ha lanciato il progetto GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System) per rafforzare l'informazione dell'antibiotico resistenza a livello globale. Il primo report è stato pubblicato nel 2017 quindi si tratta di un progetto giovane ma che ha come obiettivo quello migliorare la nostra comprensione dell'entità del fenomeno. Per il primo rapporto, 40 paesi hanno fornito informazioni dai loro sistemi di sorveglianza nazionali e 22 hanno anche fornito dati sui livelli di resistenza agli antibiotici.

Secondo il rapporto GLASS 2017 i batteri resistenti più comunemente riportati sono stati *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, seguiti da *Salmonella*. Il sistema non include però i dati sulla resistenza del *Mycobacterium tuberculosis*, che causa la tubercolosi, dal momento che l'Oms lo monitora dal 1994 separatamente e fornisce aggiornamenti annuali nel rapporto globale sulla tubercolosi.

In Italia, dal rapporto AR-ISS 2019 emerge un nuovo aumento nella percentuale di isolati di *Klebsiella pneumoniae* resistenti ai carbapenemi e multi-resistenti ed una percentuale particolarmente alta di multi-resistenza osservata per *Acinetobacter baumannii*.

LA RAPIDITÀ

Il TAT o Tourn Around Time ovvero il tempo di comunicazione “della risposta” referto” al quesito diagnostico è uno degli elementi chiave del servizio di laboratorio ed è spesso utilizzato come indicatore chiave delle prestazioni dello stesso. La qualità può essere definita come la capacità di un prodotto o servizio di soddisfare le esigenze e le aspettative del cliente. La letteratura rivela una varietà di approcci differenti alla definizione di TAT. La TAT può essere classificata per test (es. Potassio), priorità (es. Urgente o di routine), popolazione servita (es. Ricoverato, ambulatoriale, ED) e le attività incluse. Un'altra classificazione può essere fatta sui periodi di tempo, separando le fasi nelle fasi di pre-analitica (ordine di preparazione), analitica (analisi) e post-analitica (rendicontazione all'azione). Queste divisioni sono state spesso utilizzate per classificare errori e ritardi e sono a volte usate per la descrizione di TAT.

Accuratezza, precisione, tempestività e autenticità sono i quattro pilastri di servizi di laboratorio efficienti. I clinici a volte non considerano la tempestività come un attributo importante e si concentrano invece sul miglioramento delle complessità analitiche dell'elaborazione del campione. Tuttavia, la tempestività espressa come tempo di consegna (TAT) viene spesso utilizzata dai medici come parametro di riferimento per le prestazioni di laboratorio. I medici dipendono da TAT veloci per ottenere la diagnosi per il trattamento precoce dei loro pazienti e per ottenere la dimissione precoce del paziente dai reparti di emergenza o dai servizi ospedalieri di degenza. La valutazione e il miglioramento dei tempi di consegna sono essenziali per la gestione della qualità del laboratorio e per garantire la soddisfazione del paziente.

Le indagini di laboratorio sono essenziali nella gestione del paziente e vengono enfatizzate le qualità dei rapporti dei test. Per lo più i servizi di laboratorio sono diretti a fornire un rapporto rapido e affidabile a un costo ragionevole. Non esiste una definizione chiara di TAT, in merito a quale periodo dovrebbe essere incluso nella determinazione della TAT per un test specifico. Per il personale di labo-

ratorio, sarebbe dal momento della ricezione del campione in laboratorio, fino alla generazione del referto. Tuttavia, per un clinico, sarebbe appropriato definirla tale dal momento della richiesta di un test, fino al momento in cui ricevono il referto. Il TAT non sarebbe simile per i test di routine rispetto ai test STAT/urgenti. TAT sarebbe diverso per ICU/ servizi di emergenza. Le cause dello scarso livello di soddisfazione da parte degli utenti di laboratorio includono test statistici e di routine TAT e test statistici TAT sono considerati dalla maggioranza come l'indicatore più importante del funzionamento dei laboratori. L'informatizzazione ospedaliera con la registrazione del tempo dalla richiesta del test, la raccolta del campione, la generazione di report e la ricezione del report da parte del medico aiuterebbe a generare TAT. L'analisi dei valori anomali in TAT in un laboratorio fornisce informazioni sulle cause del ritardo nella TAT e sulle aree che devono essere migliorate.

La microbiologia, oggi, deve essere pensata nelle dimensioni del tempo e dello spazio del ciclo diagnostico ed in relazione alla gravità del quadro clinico facendosi garante della qualità del processo, presidiandone tutte le fasi.

Il tempo di risposta microbiologico locale (TAT) per ciascun test è definito come il tempo dal ricevimento del campione nei laboratori di patologia al momento in cui il referto è disponibile al richiedente (nella maggior parte dei casi per via elettronica). I TAT sono specifici per singoli test o tipi di campioni. Alcuni test microbiologici hanno TAT concordati a livello nazionale o sono concordati con gli utenti del servizio, ad esempio test di screening prenatale e test molecolari sulla salute sessuale.

In generale possiamo dire però, che rispetto ad altri reparti/laboratori, quello di microbiologia presenta tempi di TAT maggiori rispetto agli altri. Questo avviene perché la maggior parte dei test microbiologici si basa ancora sulla coltura di batteri che richiedono un'incubazione per giorni anziché per ore. Ulteriori test di conferma, come ad esempio il test di sensibilità antimicrobica si basa anche sulla crescita dei batteri per un ulteriore periodo di tempo.

Alcuni esempi di TAT per determinati test microbiologici:

TEST	TAT
Emocolture	<7 giorni
Liquido cerebro-spinale	<4 giorni
Tamponi nasali, buccali, oculari, auricolari, pre-operatori, genitali; liquido pleurico; urinocolture; broncoaspirati; screening antibiotico-resistenza	<5 giorni
Liquidi sterili	<11 giorni

Le esigenze dei pazienti affetti da malattie infetti-

ve, in particolare quelle potenzialmente letali o su-

scettibili di essere causate da patogeni resistenti, hanno spinto lo sviluppo di tecnologie in grado di ottenere risultati entro le prime ore dalla sintomatologia con alti tassi di sensibilità e sensibilità. I pazienti devono essere trattati immediatamente e dunque è necessaria una TAT decisamente tempestiva, nel caso in cui questi presentino:

- Sepsis;
- Polmoniti;
- Meningiti e MTB;
- Gastroenteriti acute e gravi;
- Malattie infettive da importazione;
- Sorveglianza dei ceppi multiresistenti.

Per far fronte a questa problematica, si è sviluppato un miglioramento del processo per i pazienti del Pronto Soccorso. Lo staff del DEA prende in carico il paziente secondo un codice di gravità e prescrive gli opportuni accertamenti per sepsi, polmonite, meningite, gastroenterite e malattie da esportazione. Tutto questo processo solitamente si conclude entro le 4 ore dall'ingresso del paziente. Successivamente si procede con i test rapidi (1 ora circa) finalizzati ad inquadrare il paziente clinicamente e al trasferimento in un reparto ospedaliero. Se si presuppone che il paziente venga inserito in un reparto di Medicina, si procederà rapidamente con un trattamento adeguato per limitare le trasmissioni (per esempio come nel caso di sospetta presenza di Tuberculosis, Clostridium, HIV o polmonite); per quanto riguarda il reparto di Chirurgia invece occorre limitare il rischio di infezione del sito chirurgico nell'urgenza (soprattutto cercare di minimizzare la presenza di MRSA e MSSA); mentre per un reparto di Ostetricia occorre intercettare rapidamente le infezioni materno-fetali principalmente da Streptococchi ed agire tempestivamente con la terapia.

Il laboratorio di microbiologia deve sviluppare routine diagnostiche per la refertazione nello stesso giorno e implementare procedure di identificazione rapida e test di sensibilità agli antibiotici per pazienti e campioni speciali. Infatti, sono stati sviluppati nuovi approcci nella Microbiologia Clinica che giocano un ruolo fondamentale nella terapia antimicrobica come:

- Identificazione dei microrganismi con spettrometria di massa Maldi Tof (specialmente per sepsi e shock settico);
- Test multiplex ad approccio sindromico
- Test rapidi di suscettibilità agli antibiotici fenotipici e genotipici.
- Test sfruttano l'utilizzo di biomarker per individuare precocemente le infezioni batteriche e fungine
- Test in pcr real-time per identificare il microrganismo direttamente dal campione.

Al netto di una diagnosi posta, l'esito del paziente dipende dalla decisione terapeutica. L'efficacia della terapia è fondamentale, per decidere "cosa è giusto, cosa è meglio". Non solo l'effetto di una terapia in confronto con un'altra, ma se vi è una sostanziale modifica positiva dell'esito per il paziente, utilizzando la migliore terapia. A fronte di una malattia incurabile, ad esempio vi è da dubitare che un'efficace diagnosi sia sempre la cosa giu-

sta. La sostenibilità economica non può essere elusa. In alcuni casi questa valutazione impatta sul singolo esame, ma più spesso rientra nella valutazione organizzativa dell'uso di un nuovo esame per una popolazione.

Anche in microbiologia, come per altre specialità di laboratorio si possono utilizzare con vantaggio clinico ed economico test rapidi con le caratteristiche di essere adatti, alle necessità del P.O.C.T. Questi test però non sono ancora in grado di essere utilizzati senza dover poi ricorrere a quelli tradizionali, eseguibili solo nel laboratorio centralizzato da personale qualificato e con le corrette tempistiche. Il dipartimento di microbiologia sta cercando, con le nuove tecnologie, di sviluppare procedure diagnostiche per la segnalazione e attuare procedure di identificazione rapida e di test di sensibilità antimicrobica per pazienti e campioni speciali.

Le esigenze dei pazienti affetti da malattie infettive, in particolare quelle patologie causate da patogeni multi-resistenti (MDR), che ne rendono complicata la gestione, hanno fatto pressione sullo sviluppo di tecnologie in grado di ottenere risultati nelle prime ore dall'inizio della sintomatologia. Questi test sono stati sviluppati con una alta specificità ed 'una alta sensibilità. I test diagnostici rapidi (RDT) per le malattie infettive, con un tempo di consegna del referto inferiore a 2 ore (T.A.T), sono strumenti promettenti che aiutano a migliorare la cura del paziente, la gestione antimicrobica e la prevenzione delle infezioni di patogeni MDR soprattutto nei reparti dove è necessaria una certa urgenza. Oggigiorno si trovano in commercio numerosi test diagnostici rapidi, sia da utilizzare al letto del paziente (P.O.C.T) e sia da utilizzare in laboratorio di microbiologia. Il loro successo si basa sulle loro prestazioni, l'efficacia che hanno sulla gestione del paziente e soprattutto il loro beneficio in termini di ottimizzazione della terapia, con un impatto molto rilevante sugli outcome clinici e non del paziente stesso.

I miglioramenti che si sono avuti grazie allo sviluppo di test diagnostici rapidi derivano anche dal fatto che prima tratto i pazienti in maniera accurata e appropriata, prima posso risolvere l'infezione, quindi ridurre i supporti farmacologici e strumentali, e prima posso trasferire il paziente a un setting di cura di livello inferiore. Avere una diagnosi accurata dopo un'ora e mezza, anziché dopo 72 ore, si traduce in un enorme beneficio clinico. La diagnostica microbiologica rapida ha però un costo elevato e questo, purtroppo, almeno per ora ne limita il suo utilizzo, di fatto rappresenta ancora 'un lusso per pochi'. Per rispondere alla domanda 'chi va in diagnostica rapida?' è essenziale costruire dei percorsi clinici/diagnostici strutturati ed integrati tra di loro a partenza dalla stratificazione multi-parametrica (scores, dati microbiologici, biomarker, etc) del rischio che ha il singolo paziente di avere un'infezione grave da patogeni MDR. Questo di solito genera percorsi virtuosi di processo con benefici non solo clinici, ma anche indubbi vantaggi economici grazie all'ottimizzazione delle risorse, e condivide la necessità di un profondo cambiamento organizzativo e culturale per accogliere in pieno i benefici dell'innovazione tecnologica. Il clinico e il microbiologo clinico dovrebbero interagire tra loro

in modo assolutamente condiviso, infatti, una corretta richiesta di esami di laboratorio rapidi, laddove sia necessario, incide molto sulla riduzione, e soprattutto sull'ottimizzazione dei costi del laboratorio.

Per essere utile al nostro processo decisionale il test deve risultare accurato, deve cioè essere in grado di poter distinguere i pazienti portatori di una determinata malattia da quelli che non ne risultano affetti; un'indagine viene riconosciuta valida quindi, se è capace di modificare sensibilmente l'opinione iniziale del medico sulla probabilità della malattia prima dell'esecuzione del test stesso (la probabilità pre-test), aumentando in lui la convinzione che la stessa sia presente o assente (probabilità post-test). Un test sarà tanto più efficace nella pratica clinica, quanto più determinerà modifiche importanti dalla probabilità pre-test a quella post-test. Per queste ragioni è necessario che il clinico richieda test mirati, in modo tale che un risultato fuori le aspettative non incida sull'opinione primaria del clinico. Il normogramma di Fagan interviene in queste situazioni incerte per calcolare la probabilità percentuale della malattia. Con alcune formule si può dimostrare come è possibile interpolare la probabilità pre e post-test, riducendo il più possibile la possibilità di un errore diagnostico e di uno spreco di risorse sia economiche che di personale.

Un altro ambito molto importante riguarda i costi. Il costo di una terapia sbagliata, in termini di fallimento clinico, è certamente superiore al costo di un'indagine di biologia molecolare. Ma il costo ecologico di una terapia sbagliata, in termini di pressione antibiotica e selezione di resistenze, è inimmaginabile. Quindi, il problema del costo di acquisizione della metodica è risibile rispetto ai potenziali risparmi indotti da un uso coerente della stessa. Calcolare con precisione i costi effettivi della prestazione laboratoristica diventa complicato dal momento in cui c'è da inserirci anche la degenza del paziente in reparto o terapia intensiva in attesa di un risultato di laboratorio. Infatti, i test diagnostici rapidi indirizzano il clinico su scelte terapeutiche mirate, riducendo la degenza del paziente riducendo anche la somministrazione terapeutica andando ad incidere sensibilmente sulla possibilità di sviluppare ulteriori resistenze; questi test sono quindi molto efficaci ma non possono ancora sostituire metodiche di laboratorio tradizionali.

Nell'ultimo decennio la Medicina di Laboratorio ha consolidato la tendenza a creare grandi Laboratori

(hub) a carattere provinciale o di area vasta, affiancati dall'utilizzo di sistemi di analisi rapida come supporto diagnostico per l'emergenza clinica e per il governo di situazioni logistiche che richiedono lunghi tempi di attesa a causa del trasporto delle provette. Sebbene la tecnologia abbia raggiunto un livello tale da garantire prestazioni analitiche sovrapponibili a quelle ottenute dalla strumentazione dei Laboratori centralizzati, la sola dimensione tecnologica non basta a garantire il superamento di due sfide impegnative: assicurare un sistema complessivo di assicurazione della qualità e implementare una connettività che garantisca non solo la puntuale registrazione dei risultati, compresi gli allarmi strumentali e la completa tracciabilità, ma anche la comprensione dell'informazione analitica (contenuta nel referto) da parte del curante e del paziente.

La problematica che si viene a creare nell'avanzamento dello sviluppo dei test diagnostici rapidi riguarda l'organizzazione del laboratorio stesso. Nella installazione di un laboratorio centralizzato relativo alle emergenze diventa necessario l'apertura di esso 7 giorni su 7 e 24 ore su 24. Conseguentemente sarebbe necessario ampliare la forza lavoro con una ricaduta sui costi del laboratorio, con un riguardo particolare al rapporto costi/benefici relativo proprio alla diagnostica rapida.

Uno dei campi di maggiore applicazione in cui vengono utilizzati i test diagnostici rapidi sviluppati negli ultimi anni riguarda la sorveglianza dei patogeni MDR. Questo argomento è diventato molto importante negli ultimi anni proprio per gestire al meglio la terapia antibiotica mirata e la gestione del paziente affetto da patologie causate da patogeni multi-resistenti. Il test diagnostico rapido è capace di identificare con una alta specificità ed una alta sensibilità l'infezione di questi patogeni MDR e indirizzare il clinico in una terapia mirata ed efficace riducendo così la degenza del paziente; infatti questo approccio diagnostico ha trovato un largo utilizzo proprio in quei nosocomi che sono long term facility, ovvero che il paziente risiede per periodi più prolungati, comportano una maggiore esposizione a questa tipologia di patogeni multi-resistenti. Questi test diagnostici rapidi hanno fatto cambiare passo alla terapia antibiotica mirata, riducendo la somministrazione di antibiotici ad ampio spettro come terapia preventiva, facendo sensibilmente diminuire conseguentemente la possibilità da parte di questi patogeni di sviluppare ulteriori resistenze.

LA ROBOTICA

Durante gli ultimi anni i laboratori microbiologici hanno cominciato ad adeguarsi sempre di più alle necessità operative, in termini di efficienza e rapidità, mediante l'utilizzo di sistemi di identificazione microbica automatizzati, tuttavia l'elaborazione di campioni microbiologici e il workup colturale, in particolare, rimangono in gran parte compiti manuali. Da questo comprendiamo che l'automazione non rimuove il processo decisionale per il tecnico, ma piuttosto facilita l'organizzazione, riduce i tempi di lavoro ed elimina le attività dispendiose.

L'impressionante diffusione dell'automazione di laboratorio è stato fortemente catalizzato da un continuo processo di riorganizzazione della diagnostica di laboratorio secondo il modello paradigmatico "hub-and-spoke", dove le strutture del laboratorio sono sempre più organizzate all'interno di una rete che comprende laboratori periferici che effettuano test semplici (cioè di prima linea) e strutture centrali, dove grandi volumi di campioni vengono consegnati per l'esecuzione di test più specializzati.

I principali laboratori microbiologici automatizzati, rispetto ad altri laboratori, si basano sulla necessità di spazio senza il bisogno di un numero elevato di tecnici specializzati, ma solo di quelli necessari al controllo e alla valutazione dei risultati. L'organizzazione è fondamentale, un layout ottimizzato di postazioni di lavoro integrate impedirebbe infatti ai tecnici di spostarsi più volte da un analizzatore all'altro, minimizzando così il tempo inutilizzato per l'esecuzione di analisi multiple di strumentazioni differenti.

Nel rivedere le attuali opzioni disponibili per l'automazione nei laboratori di microbiologia, abbiamo scelto di dividere le soluzioni di automazione in due gruppi: strumenti che funzionano principalmente come processori di campioni e sistemi che offrono soluzioni di automazione di laboratorio di microbiologia totale. Le attività svolte dagli strumenti di processo possono includere l'inoculo di provette e terreni su piastra, subcoltura di colture di brodo, etichettatura delle piastre, codici a barre per il tracciamento dei campioni e preparazione dei vetrini.

Attualmente un laboratorio di microbiologia considerato come punto di riferimento provinciale deve possedere:

L'unità di inoculazione: Il primo passo per coltivare un microbo è l'inoculazione del campione del paziente su (o in) mezzi di crescita. Per necessità, un sistema TLA deve essere in grado di ospitare molti diversi tipi di campioni e deve essere in grado di inoculare una varietà di tipi di terreno, comprese le piastre di agar e le provette di brodo, oltre a preparare vetrini per microscopio per l'esame della colorazione di Gram. Questo comporta il riapplicare i contenitori dei campioni, il trattamen-

to preciso dei liquidi e l'apertura / chiusura delle piastre di coltura, tutto evitando la contaminazione sia del campione che del personale di laboratorio e mantenimento della biosicurezza.

Sistema di trasporto: Una volta che i supporti sono stati inoculati, devono essere spostati dall'unità di inoculazione all'incubatrice. Ciò viene generalmente ottenuto tramite un sistema di binari che devia automaticamente le piastre inoculate in incubatori con condizioni di crescita (atmosfera e temperatura) che ottimizzano il recupero degli organismi a seconda della fonte del campione, del tipo di terreno e del sospetto di agenti patogeni.

Sistema di incubazione: La funzione primaria di un incubatore in microbiologia è quello di fornire un ambiente favorevole per crescita di microrganismi, come il mantenimento della temperatura e dell'atmosfera ottimali (cioè ossigeno o, al contrario, concentrazione di anidride carbonica) per il successivo processo di imaging.

Sistema di imaging ad alta risoluzione: le immagini digitali di lastre sono i dati grezzi generati dai sistemi TLA. Anche se la visualizzazione di fotografie di lastre è un passaggio rimosso dalla visualizzazione del piatto stesso, questa innovazione ne offre diversi grandi vantaggi. Innanzitutto, la fotografia automatizzata elimina le variazioni del colore di sfondo e dell'illuminazione, ottenendo l'uniformità delle condizioni fotografiche standardizzate. La visualizzazione automatica dei piatti, piuttosto che rivedere le piastre di coltura reali gara

Total Lab Automation

L'introduzione del concetto di TLA (Total Lab Automation) nel laboratorio di Microbiologia clinica è essenzialmente legata all'incremento della domanda di test diagnostici in tale ambito. Tra i fattori che influenzano tale domanda vi sono il crescente invecchiamento ed aumento della popolazione a livello globale: ne consegue aumento dei ricoveri annuali e riduzione dei tempi di ricovero. Altri fattori rilevanti sono: la diffusione di patogeni antibiotico resistenti con necessità di un rafforzamento della relativa vigilanza (GDR); la contrazione del personale tecnico microbiologo 50% negli ultimi 30 anni (periodo 1993-2008) (PPB). La TLA risponde alle esigenze della nuova produttività del laboratorio microbiologico, riflesso del carico di lavoro clinico. Di specifico la TLA riduce il tempo di impiego dei tecnici di laboratorio nelle fasi preanalitiche ai test microbiologici del 50-70%. La TLA, tramite opportuno software di gestione (middleware), migliora la tracciabilità del campione: riduce la frequenza di mis-match tra campione e anagrafica del paziente e tra campione e medium di coltura. Si riduce significativamente l'errore preanalitico dei test diagnostici. La TLA infine controlla in maniera fine i parametri standard di coltura implementando la sensibilità e la velocità dei test diagnostici. (GDR) La TLA riduce il TAT (turn-around-time) del percorso diagnostico (e clinico)

umentando la capacità produttiva del laboratorio e quindi la sua efficacia. (PPB)

Lo scopo della TLA contestualmente all'iter diagnostico microbiologico è facilitare il processo decisionale dei dirigenti e tecnici impiegati in laboratorio. La TLA inoltre deve essere flessibile e adattarsi all'eterogeneità delle tipologie di campioni analizzati routinariamente.

La TLA dovrebbe costituire un sistema aperto nel quale sia possibile integrare moduli preanalitici, analitici e postanalitici di aziende diverse. (PPB) Il sistema di TLA si compone di: un modulo di inoculo; un modulo di trasporto del campione; un modulo di incubazione; un sistema di imaging ad alta risoluzione; un'interfaccia interattiva. I singoli moduli possono costituire delle isole di automazione e semiautomatizzare i processi analitici. La struttura del sistema TLA di microbiologia clinica rappresenta l'attuale paradigma dell'automazione al quale ci si potrebbe riferire più propriamente come automazione parziale. I sistemi di TLA più avanzati possono processare campioni su piastra per analisi di imaging ma non brodi o vetrini. L'integrazione di moduli per analisi biochimiche e di sensibilità agli antibiotici è teoricamente possibile ma altererebbe il flusso di lavoro sui campioni riducendo la produttività del laboratorio. D'altro canto l'integrazione nel sistema TLA della spettrometria MALDI-TOF implementerebbe l'efficacia della diagnostica in TLA sostituendo i test biochimici per la caratterizzazione dei microorganismi. (IB)

Il Kiestra Becton Dickinson e il WASPLab Copan rappresentano i due modelli più diffusi di sistema TLA, pertanto ci si riferirà ad essi per la trattazione tecnica della TLA. I sistemi di TLA si organizzano a partire dall'unità di inoculo la quale teoricamente deve essere sufficientemente flessibile da accogliere campioni di diversa natura (sputum, feci, tessuto osseo, sangue ecc.) e conservati in differenti tipologie di contenitori (container, tubi e tamponi con o senza terreno di trasporto). (ALB) La variabile che ha permesso di automatizzare l'inoculo del campione nel medium di coltura è stata l'introduzione dei tamponi in fase liquida, primo brevetto ESwab. Per tali unità di conservazione il campione risulta associato alla fase liquida del tampone. I moduli di inoculo automatizzati "liquid-based", pertanto, possono prelevare aliquote di campione dal tampone per inocularle nel medium di coltura. (PPB) L'InoquLA FA/MI costituisce il modulo di inoculo integrato al sistema Kiestra. Lo strumento si compone di un braccio meccanico che integra un modulo stappatore ed un puntale monouso in grado di trasferire aliquote di campione liquido dalle rispettive unità di conservazione al medium di coltura. (ALB) Una biglia magnetica rotante monouso quindi striscia il campione sul mezzo di coltura. L'InoquLA può inoculare 5 piastre simultaneamente e si presta anche alla preparazione di vetrini per esame cito-morfologico del campione. Lo strumento può accogliere sino a 30 tipologie di piastre e 7 di fiale colturali. L'inoculo di campioni non liquidi da parte dell'InoquLA è condotto in modalità manuale. Secondo la valutazione di Kleefstra et al.

L'InoquLA migliora la riproducibilità della fase di inoculo incrementando il numero di colonie isolate rispetto all'inoculo manuale. (PPB) WASP-DT è lo strumento di inoculo di WASPLab: un modulo stappatore universale stappa l'unità di conservazione campione. Un'ansa ad occhietto terminale connessa ad un braccio robotico e sterilizzata al calore media il prelievo del campione liquido ed il relativo striscio su medium. Un modulo pipettatore addizionale permette l'aliquotazione del campione e il relativo inoculo in brodi o vial per test molecolari e serologici. (ALB)

Il modulo trasportatore trasla quindi i terreni inoculati nel modulo incubatore. Il KiestraTLA adotta un nastro trasportatore bipiano che permette l'entrata e l'uscita simultanea di piastre dall'incubatore. Il sistema WASPLab adopera invece un singolo nastro di trasporto. Il modulo trasportatore connette tutti i moduli del sistema concretizzando l'automazione del processo diagnostico. Le piastre inoculate sono alloggiare in carosello all'interno dell'incubatore sia per il sistema KiestraTLA sia per il WASPLab. Un braccio robotico, connesso al modulo trasportatore ha accesso all'incubatore per traslare le piastre nel modulo di imaging (integrato dall'incubatore). Attualmente i moduli incubatori sono automatizzati solo per condizioni di coltura aerobiche. (ALB) ReadA e Image Acquisition Station sono i moduli di imaging rispettivamente per il KiestraTLA ed il WASPLab. Tali moduli acquisiscono immagini delle piastre a intervalli di tempo pre-impostati. La qualità delle immagini è garantita dall'eliminazione del rumore fondo dell'immagine da parte del software di imaging. Le immagini possono essere consultate da più dirigenti/tecnici in remoto sia per scopi diagnostici sia didattici. L'interpretazione delle immagini avviene da una stazione di lavoro ove il tecnico/dirigente interagisce con il sistema di TLA mediante il middleware da un'interfaccia informatica. Sulla base dei dati di imaging il tecnico può impartire alla strumentazione input per ulteriori manipolazioni quali sub-culture, prelievi di colonia, analisi mediate da altri moduli integrati. L'interpretazione dei dati colturali su interfaccia di imaging introduce la possibilità futura di adottare algoritmi di machine learning o IA per l'identificazione dei microorganismi sulla base del pattern morfologico delle relative colonie. Per quanto riguarda analisi in IA e machine learning si sono ottenuti risultati incoraggianti per saggi colturali cromogeni, saggi colturali da campione ematico e urinario, saggi di emolisi. (ALB) Una stima dell'impatto sulla produttività del sistema KiestraTLA è fornita dallo studio di Bentley et al. che ha monitorato un incremento di 2.6 volte dell'indice di produttività laboratoristica (misurato in n° campioni/personale/giorno) a seguito dell'installazione del sistema di TLA. (PPB)

Il sistema di TLA rialloca il tecnologo/dirigente dal bancone di lavoro ad un'interfaccia informatica riducendo il numero di contatti tra egli ed il campione e quindi il rischio di contaminazione per entrambi. La produttività del laboratorio è incrementata sia per la possibilità tracciare il campione in ogni fase del processo analitico 24 ore al giorno sia

per la riduzione del numero di attività manuali che routinariamente coinvolgono il tecnologo al banco da lavoro. (ALB e IB) Si è stimato che la TLA riduca del 43% il tempo di pre-analisi impiegato nell'inoculo e nel trasferimento delle piastre dalle cappe agli incubatori. (IB) L'implementazione del controllo di qualità del processo diagnostico in TLA ha permesso una riduzione dei tempi di refertazione di emocolture positive di 24 ore e di urinocolture positive di 1.5 ore. (IB) Per quanto riguarda la referenziazione di colture negative l'allungamento dei tempi a 30 ore a partire dalle 14 ore canoniche è imputabile ad una modifica delle linee guida di protocollo. (TT) Tali dati correlano con un miglioramento della gestione clinica del paziente: in particolare per quanto riguarda l'effetto della TLA sul TAT delle emocolture è apprezzabile una riduzione del 12% della mortalità a 30 giorni. (IB) Malgrado le migliorie nell'efficienza di processo apportate dalla TLA risulta difficile quantificare tutti i singoli benefici nella gestione clinica del paziente. La futura integrazione di test di sensibilità agli antibiotici e del MALDI-TOF, attualmente sussistenti in isole di automazione, ai sistemi di TLA dovrebbe contribuire a ridurre del 40% il TAT di tutto il processo di laboratorio. (ALB)

Il futuro prossimo della microbiologia clinica automatizzata riguarda il riadattamento degli algoritmi analitici applicati in TLA. Gli attuali dati di performance, derivati dall'applicazione di protocolli di processo manuale alla TLA, devono essere confrontati con i dati di processo manuale e semiautomatico al fine di implementare il flusso di lavoro in automazione. (IB)

La coltura in fase liquida

La microbiologia in fase liquida ha portato ad un notevole sviluppo tecnologico nei laboratori di microbiologia, migliorando radicalmente il flusso di lavoro in ambito diagnostico. Introdotta con l'avvento dei tamponi floccati, prodotti dall'industria italiana Copan nel 2005 e con l'introduzione dei primi processori automatizzati, come il Walk-Away Speciment Processor (WASP) nel 2008, la microbiologia in fase liquida offre una serie di vantaggi sia in termini di efficienza del recupero dei microrganismi, sia nella facilità di campionamento, trasporto e conservazione del materiale biologico. In particolare, l'ottimizzazione dei campioni clinici permette:

- Una riduzione dei costi, dato dal minor numero di dispositivi utilizzati;
- Un risparmio di tempo per il personale medico e/o infermieristico (meno confusione nella selezione del dispositivo di raccolta e meno campioni da raccogliere);
- Un risparmio di tempo per il personale di laboratorio (meno campioni da gestire per le singole indagini);
- Miglioramento del comfort del paziente, in quanto si può evitare di raccogliere più campioni.

I vantaggi della microbiologia in fase liquida inoltre, combinata all'uso di processori automatizzati, permette la standardizzazione del processo di semina e la conservazione della vitalità dei microrganismi. Considerando l'epoca attuale, in cui si evidenzia una riduzione dei finanziamenti per i laboratori associata ad una carenza di tecnici di laboratorio formati, risulta ovvio il forte interesse per l'automazione, in quanto andrebbe a ridurre le richieste di lavoro per l'elaborazione dei campioni.

La microbiologia in fase liquida viene oggi impiegata in un'ampia varietà di test, che includono la colorazione Gram, test colturale, test di attività microbica residua e test molecolari. Si può quindi affermare che la possibilità di utilizzare un unico dispositivo di raccolta per diverse indagini garantisce un miglioramento dal punto di vista qualitativo, in termini di uniformità del campione e standardizzazione delle procedure, senza influire sulla sensibilità ma bensì migliorando il flusso di lavoro e riducendo il tempo di elaborazione.

I tamponi costituiscono un metodo facile per la raccolta dei campioni e nonostante siano considerati inferiori ai fluidi corporei, aspirati o tessuti, il loro basso costo e la loro facilità d'uso li ha resi popolari tra il personale clinico. Nel corso degli anni i campioni microbiologici sono stati raccolti utilizzando tamponi di vario tipo, con punta di cotone, in dacron (fibre di poliestere), rayon (fibre di cellulosa rigenerata) e alginato di calcio. Questi possono essere contenuti in provette di plastica o vetro, con o senza mezzo di trasporto.

I classici tamponi presentano generalmente un sottile stelo con all'estremità un materiale assorbente che va a prelevare il campione biologico. I primi tamponi presentavano uno stelo in legno e del cotone idrofilo all'estremità. Questo ha costituito un problema in passato, perché il cotone contiene acidi grassi che possono inibire alcune specie batteriche ed allo stesso tempo gli steli di legno sono risultati contenere anch'essi sostanze inibitorie. Per questo motivo successivamente si è scelto di utilizzare materiali alternativi, come i tamponi dacron costituiti da fibre di poliestere, i tamponi in rayon con fibre di cellulosa rigenerata oppure tamponi in nylon, con fibre sintetiche come le poliammidi.

Nei primi anni del 2000 sono stati sviluppati da Copan i tamponi floccati in nylon. Lo sviluppo di questi nuovi tamponi è nato dalla necessità dei laboratori di microbiologia di trovare nuovi metodi di raccolta dei campioni per massimizzare la sensibilità di una serie di test molecolari e ridurre il numero di test falsati dovuti a tecniche di raccolta inadeguate del campione.

I tamponi floccati sono costituiti da migliaia di fibre corte in nylon, posizionate perpendicolarmente alla punta di un applicatore mediante un processo di floccaggio. Questa particolare struttura permette di raccogliere un volume maggiore di campione

rispetto ai tamponi tradizionali, che sono generalmente avvolti in fibre che agiscono come una superficie assorbente, andando ad intrappolare gran parte del campione all'interno di tali fibre. Inoltre, le fibre del tampone floccato, a contatto con il mezzo liquido, rilasciano automaticamente ed in maniera completa il campione, permettendo quindi una facile eluizione del materiale raccolto.

In genere questi tamponi presentano un'asta in plastica dotata di un punto di rottura chiamato "break-point", che consente la rottura dell'asta nella provetta. In alternativa, le aste dei tamponi possono essere realizzate in alluminio, più flessibili e adatte per prelievi difficoltosi. Anche le dimensioni dei tamponi floccati sono variabili: esistono tamponi floccati standard, tamponi sottili per prelievi ad esempio oculari ed uretrali ed infine tamponi pediatrici.

I tamponi floccati sono anche privi di DNA umano, inibitori della PCR, RNAsi negativi e senza DNAsi. Sono più costosi rispetto ai tradizionali tamponi in cotone o dacron, ma la loro doppia applicazione per colture e test molecolari riduce i costi di stoccaggio ed i tempi di esecuzione dei test.

Il tampone floccato più rappresentativo è sicuramente il tampone ESwab, un particolare tampone floccato in nylon a cui viene aggiunto 1 ml di un mezzo liquido di trasporto definito Amies. Il sistema Eswab semplifica la raccolta dei campioni e costituisce l'unico sistema liquido che supporta il recupero di tutti i tipi batterici, sia aerobi che anaerobi, così come anche quelli particolarmente difficili da coltivare.

Il sistema Eswab viene utilizzato per vari tipi di campioni microbiologici, come campioni genitali, nasali, orofaringei, oculari, auricolari ed anche su una serie di ferite. Dopo il prelevamento del campione, con questo sistema si possono andare ad effettuare una serie di test: una coltura in semina automatica con il sistema WASP, la preparazione di uno striscio per Gram, rilevamento diretto di antigeni batterici e tossine, saggi molecolari.

Per ogni tipo di campione deve essere impiegato un determinato tipo di tampone, il quale può essere combinato con un particolare tipo di brodo di arricchimento per la ricerca selettiva di uno specifico microrganismo:

- I campioni respiratori derivanti da lavaggio broncoalveolare, aspirato bronchiale ed espettorato possono essere ad esempio pretrattati con una soluzione SL contenente ditiotreitolo, per andare a dissolvere il muco, molto presente in questi tipi di campioni.
- I campioni fecali vengono prelevati mediante l'uso di tamponi fecali FS, progettati per la raccolta, il trasporto e la conservazione di tali campioni; presentano un particolare mezzo FS, che corrisponde ad una formula modificata del brodo Cary Blair, il cui uso è destinato a sostenere la vitalità degli enterobatteri.

- I campioni retto-vaginali per l'indagine di Streptococco di gruppo B vengono raccolti invece con un normale tampone floccato in associazione ad un brodo LIM, specifico nella rilevazione di questo batterio. Il brodo LIM è una modifica del brodo Todd Hewitt, in cui la presenza di antibiotici inibisce la crescita della normale flora batterica garantendo l'isolamento e la conservazione dello Streptococco B.
- Esistono poi tamponi utilizzati per prelevare campioni da ferite, come ulcere o infezioni chirurgiche; anche questi possono essere arricchiti con dei brodi come HB&L (Alifax) per effettuare esami colturali o test di attività antimicrobica residua.
- Un brodo di arricchimento più recente è il BHI, impiegato per preservare la vitalità dei microrganismi in quei campioni per i quali non è possibile effettuare la coltura al momento della consegna del campione, oppure qualora si voglia preservare la vitalità dei microrganismi per ritardare alcuni saggi molecolari.
- Oltre alla ricerca di batteri, alcuni tamponi vengono impiegati per la ricerca di Virus, grazie alla presenza di un terreno di trasporto specifico per virus.

I vantaggi nell'uso di un tampone floccato associato ad un processatore automatico come il WASP, rispetto ad un metodo manuale in cui viene impiegato un normale tampone in fibra, sono stati dimostrati in molti studi.

Tra questi, uno studio riportato sul Journal of Clinical Microbiology nel 2011 si è posto l'obiettivo di confrontare la sensibilità di rilevamento del batterio *Staphylococcus aureus*, utilizzando un tampone nasale Eswab con WASP ed un normale tampone con processazione manuale. Tale studio ha dimostrato che l'uso dei tamponi Eswab aumenta il recupero del microrganismo rispetto al tampone tradizionale, in aggiunta al fatto che la possibilità di automatizzare l'elaborazione consente di migliorare potenzialmente l'efficienza. Questo studio ha dimostrato anche che l'elaborazione automatica dei campioni ha richiesto un tempo nettamente inferiore rispetto all'elaborazione manuale.

I tamponi Eswab quindi risultano più sensibili dei tamponi in fibra e la loro sensibilità può essere aumentata ulteriormente con l'aggiunta dei vari brodi di arricchimento.

La semina robotica

Con il termine di semina si intende l'operazione attraverso la quale si immette un inoculo - poche cellule vive - di un campione contenente microrganismi a contatto con terreni di coltura allestiti in piastra e in provetta. A questo punto le piastre/provette vengono poste in incubatore a 37° per un certo periodo di tempo, in seguito le cellule batteriche inoculate si saranno moltiplicate in modo tale da formare colonie ben visibili ad occhio nudo. Nel contesto di un sistema di TLA le precedenti opera-

zioni sono eseguite dal modulo di inoculo del campione su piastra, come descritto in precedenza. I moduli di semina dei sistemi automatizzati standard WASPLab e Kiestra sono rispettivamente il WASP-DT e l'InoqUA. Tali moduli sono ottimizzati per l'inoculo di campioni urinari.

Il WASP-DT (ideato dalla ditta bresciana Copan) è una piattaforma universale che stappa, semina e tappa automaticamente i campioni. Costituisce un sistema completo che copre le diverse attività nel campo della batteriologia: la semina del campione su terreni di coltura in piastra o l'inoculo in brodo di arricchimento, lo striscio di vetrini per colorazione Gram. La fase preanalitica di inoculo del campione è adjuvata da un sistema di lettura di codice a barre. Tale sistema associa il campione ai dati anagrafici del paziente depositati nel L.I.S. (Laboratory Information System). Il sistema identifica la tipologia del campione associando ad essa un protocollo di processazione programmabile direttamente.

I passaggi operativi del WASP-DT sono i seguenti. Lo strumento identifica e traccia l'anagrafica del campione scansando il codice a barre su di esso etichettato. Il modulo quindi stappa il campione e verifica la presenza di materiale. Segue il prelievo del campione ad opera di un'ansa, la verifica della presenza di materiale sull'ansa e quindi la sua semina su piastra. L'ansa viene sterilizzata per poter ripetere la precedente procedura. La piastra è infine etichettata per ottemperarne il tracciamento ed è caricata su colonne di accesso al modulo incubatore. Ogni colonna indirizza la piastra in un ambiente a specifiche condizioni d'incubazione.

L'InoqUA di Kiestra si distingue dal WASP-DT per la tecnica di semina. Il BD Kiestra pipetta un'aliquota di campione di circa 10 QL. Biglie magnetiche rotanti distribuiscono quindi il campione aliquotato su di una piastra con un movimento a zig zag.

È interessante notare che l'inoculo con il metodo a biglie magnetiche InoqUA ha mostrato una zona più ampia di distribuzione di colonie discrete dovute alla sua capacità di coprire l'intera superficie della piastra rispetto a quella ottenuta con tecnica manuale o loop straking Wasp che invece hanno accesso limitato ai bordi della piastra.

In uno studio del 2015 che mette a paragone le tecniche manuali con quelle automatizzate, un graduale aumento del numero di colonie discrete è stato osservato con gli approcci di striatura InoqUA e WASP.

L'efficienza di semina in entrambi i casi viene stabilita tramite la conta delle piastre e nel caso della semina di campioni di urina, una coltura viene definita positiva se sono presenti 1 o 2 potenziali patogeni alla concentrazione uguale o maggiore di 10^4 CFU/mL. La qualità di inoculazione viene valutata misurando diversi parametri come la presenza di colonie isolate e la loro distribuzione nella piastra di semina. questo è un fattore critico in quanto

una scarsa crescita delle colonie aumenta il tempo necessario per ottenere dei risultati, di tempo pratico e anche in termini di costi.

Secondo uno studio condotto sempre nel 2015 le piastre seminate tramite BD InoqUA risultano di più facile lettura rispetto a "loop - plated coltures", altresì lo streaking patterns risulta essere più consistente di quello prodotto con tecniche manuali. Anche il volume di campione inoculato comporta alcune differenze. Se utilizzato un volume di 1 QL, si nota una significativa mancanza in termini di precisione e accuratezza soprattutto in caso di semina manuale con l'utilizzo di un'ansa calibrata. Questa mancanza viene riscontrata anche se il volume inoculato è di 10 QL ma viene effettuata una semina manuale se comparata con una semina automatizzata. Un altro aspetto messo in rilievo in questo studio è che lo strumento BD InoqUA ha prodotto dall'11 al 17% in più in termini di colonie recuperate e isolate rispetto ad un metodo manuale, oltre ad essere più preciso rispetto ai risultati ottenuti tramite tecnica manuale.

In conclusione, comparati a metodi manuali, i processi automatizzati tramite l'utilizzo di robot come il Klestra e il Wasp, migliorano la qualità e la standardizzazione dei processi di semina, contribuiscono ad un totale miglioramento del workflow, riducono il tempo di refertazione oltre ad ottenere risultati più accurati. Ne evince una più efficiente gestione in termini di costi, manodopera ma ancora più importante, una migliore gestione del paziente che ottiene in tempi dimezzati dei risultati più precisi e sicuri.

Nel laboratorio di microbiologia, dell'ospedale SS. Antonio e Biagio di Alessandria, è presente il modello WASP dell'azienda Copan. Quest'ultima è un'azienda bresciana ed è il principale produttore al mondo di sistemi di prelievo e conservazione per la microbiologia.

I modelli strumentali di Copan sono a sistema chiuso: i macchinari sono compatibile soltanto con reattivi prodotti dalla Copan ed a differenza dei sistemi aperti non possono integrare prodotti di marche diverse. Il vantaggio di un modello a sistema chiuso riguarda la standardizzazione del setting operativo e quindi la riduzione della frequenza di manutenzione.

Presso l'azienda ospedaliera è presente il modello Colibri, che è in grado di:

- preparare automaticamente sospensioni microbiche, da diversi tipi di colonie di batteri, direttamente dalla coltura su piastra di agar;
- fornisce risultati comparabili a quelli ottenuti con una preparazione manuale;
- standardizza la preparazione di sospensioni microbiche per AST (Antimicrobial Susceptibility Testing) e piastre di purezza;

- riduce la contaminazione delle piastre ma diminuisce anche l'esposizione ad agenti patogeni, migliorando la sicurezza del personale.

Il macchinario WASP col sistema Colibrì automatizza la preparazione dei campioni, che arrivano già etichettati al laboratorio e sono contenuti all'interno di provette come tamponi o come campioni liquidi (urine, liquor, liquido seminale). Il robot presente nel laboratorio di Alessandria è capace di riconoscere solo due tipi di rack porta-provette, quello verde contenente campioni di urine e quello bianco per tutti gli altri tipi di campioni. Questi rack sono posti dallo strumento su di un rullo che trasla le provette dinanzi al lettore dei codici a barre. Il robot si caratterizza per differenti modalità di destinazione di processo dei campioni. Tali modalità si caratterizzano per un differente grado di automazione. La modalità LIS dipendente è completamente automatizzata: il LIS interfaccia il lettore di etichette all'unità di processamento del campione. Il lettore di codici a barre individua un determinato tipo di protocollo associato al codice campione secondo le informazioni depositate nel LIS. Lo strumento quindi effettua la semina su piastra, stampa l'etichetta del codice di accesso e la applica alla piastra stessa di modo da poterla associare al proprio campione iniziale anche nelle fasi successive di processazione.

Colibrì può anche operare secondo una modalità semi-automatica dipendente da operatore per la quale quest'ultimo applica singolarmente le etichette codice ad ogni piastra colturale. Lo strumento può infine operare secondo una modalità automatica barcode.

Una volta scansionato il codice a barre sul campione, ad esso viene applicato un protocollo di interesse che deve però essere inserito manualmente dall'operatore, tramite monitor.

Ogni protocollo viene nominato e all'interno di esso vengono scelti:

- tipo di ansa (presente solo il loop 10)
- tipo di terreno di coltura (agar cioccolato, agar sangue, agar MacConkey, CNA, SDA)

- tipo di semina (un quadrante, due quadranti, ad albero..)

- vortex

Dopo che è stato letto il protocollo, il robot preleva la provetta e svita il tappo grazie ai bracci Tarzan. Una volta svitata la provetta, nell'area di semina Jane, viene immersa l'ansa per raccogliere il campione e poi seminarlo sulla piastra selezionata dal protocollo. Le piastre vengono prese dai 9 caroselli della macchina. Ad ogni carosello corrisponde un tipo diverso di terreno di coltura. Dopo la semina, viene stampata l'etichetta corrispondente e viene adesata alla piastra. Le piastre seminate vengono sovrapposte in pile da 12 e poi fatte uscire dal macchinario.

Una volta uscite, è compito dell'operatore suddividerle in base al paziente, grazie alle informazioni contenute sull'etichetta, che riporta:

- nome e cognome del paziente
- protocollo
- data
- reparto
- numero di piastre attese per quel paziente

Il robot ha portato sicuramente ad una velocizzazione delle operazioni di semina e analisi ma ha bisogno di essere impostato e controllato.

Il ruolo del tecnico di laboratorio diventa sempre di più quello di supervisore del macchinario e sempre meno di operatore sul campo.

Il tecnico avrà il compito di: suddividere i campioni nei due rack riconosciuti; inserire manualmente i protocolli; caricare i 9 caroselli della macchina con le apposite piastre; suddividere le piastre seminate in base all'etichetta; metterle in coltura a 37° o in CO2.

L'operatore deve comunque seminare manualmente in caso di rottura del macchinario o in alcuni campioni particolari in cui è preferibile una semina manuale piuttosto che una automatizzata. Questo è il caso di particolari biopsie che necessitano di esami aggiuntivi e del liquido seminale poiché è presente in basse quantità.

LO SPAZIO

A partire dal 1950, la messa a punto di nuove tecnologie automatizzate ha permesso di processare un gran numero di campioni ed eseguire molti esami in laboratori centralizzati ed a costi ridotti. La spedizione dei campioni presso laboratori centralizzati e l'attesa del risultato per giorni o settimane, è così diventata una cosa normale. La necessità crescente di avere i risultati di alcuni test in tempi brevi ha poi comportato la diffusione di strumentazioni portatili e di facile utilizzo. La scienza medica si è evoluta nuovamente. Oggi, i laboratori di analisi rivestono ancora un elemento centrale per l'esecuzione della maggior parte degli esami ma sono affiancati dalla possibilità di eseguire alcuni test fuori dal laboratorio, in qualunque posto ci si trovi. Si definisce POINT OF CARE TESTING (POCT) l'esecuzione di analisi chimico cliniche eseguite da personale medico o infermieristico vicino al punto di cura del paziente con il presupposto che il risultato sia disponibile immediatamente o in un lasso di tempo molto breve. Le analisi di laboratorio determinano il 60-70% delle decisioni cliniche poiché la necessità di avere risultati in tempi più brevi ha fortemente potenziato la possibilità di eseguire le analisi "salva vita" al letto del paziente. I dispositivi POCT possono trovare applicazioni in molteplici situazioni: in ambiente domestico, al livello ambulatoriale, nei reparti di pronto soccorso, nei reparti di contenimento per malattie infettive, nelle ambulanze, in centri militari, su navi da crociera, in corrispondenza di aree nelle quali è accaduto un incidente o anche negli space shuttle. I dispositivi POCT possono essere sotto varia forma e basarsi su diversi principi. Si distinguono POCT di "emergenza", POCT da "ricovero" e POCT "self testing". Possono essere "dipstick" come quelli usati per l'analisi delle urine, dispositivi palmari come i glucometri, o analizzatori molecolari sofisticati come quelli per la rilevazione di malattie infettive. Sia l'esecuzione del test direttamente "al letto del paziente" da parte del clinico con dispositivi palmari che la raccolta di un piccolo quantitativo di sangue dal paziente ed il trasferimento del campione in un dispositivo sito nelle vicinanze. I POCT per autocontrollo possono essere utilizzati anche direttamente dal paziente si pensi ad esempio ai dispositivi per il controllo della glicemia in pazienti diabetici e il test di gravidanza. Così come tutte le procedure sanitarie che si stanno evolvendo per essere sempre più incentrate sul paziente, i POCT stanno diventando sempre più diffusi. Un sistema POCT deve avere le seguenti caratteristiche: risultati in tempo reale; strumentazione di facile uso; minimo volume di sangue richiesto; archiviazione e tracciabilità dei dati. Tuttavia, per assicurare la migliore qualità possibile, è importante che questi test vengano utilizzati in associazione e non in sostituzione di test eseguiti in laboratori clinici specializzati quindi, la qualità delle analisi svolte presso i POCT deve essere assicurata con le

stesse modalità delle analisi effettuate presso il laboratorio clinico di riferimento.

Per quanto riguarda il futuro dei POCT negli ultimi 20 anni sono stati compiuti numerosi sforzi per migliorare sempre di più le tecnologie alla base dei POCT, al fine di renderli maggiormente sensibili e specifici. Con l'introduzione di nuove tecnologie, verranno introdotti nuovi dispositivi POCT, in grado di essere utilizzati nei reparti di emergenza, in corso di operazioni chirurgiche e negli ospedali, per la valutazione, ad esempio, dell'emocromo e della presenza di overdose. Nuovi test potranno essere utilizzati, per esempio, nella diagnosi precoce del cancro, come il cancro alla cervice e in più saranno sviluppati nuovi POCT basati su metodiche molecolari come la PCR. Nelle aree del mondo in via di sviluppo e nelle regioni rurali, l'uso dei POCT è motivato dalla necessità di fornire opzioni migliori per la diagnosi ed il trattamento di malattie come la malaria, l'HIV e la tubercolosi. La diagnosi di malattie infettive è una parte del mercato in crescente aumento. Questi POCT si prefiggono di diagnosticare velocemente le infezioni così da permettere un trattamento immediato, al fine di prevenire la diffusione e quindi la comparsa di epidemie. Un'altra area d'interesse riguarda lo sviluppo di test da eseguire su chip miniaturizzati, in grado di fornire una grossa mole di risultati utilizzando solo piccole quantità di campione e senza necessità di manipolazione dello stesso. I test POCT verosimilmente, non sostituiranno mai i test eseguiti in laboratori clinici ma saranno comunque una parte sempre più importante nella gestione del paziente, nel miglioramento della qualità della vita e nell'ampliamento della disponibilità dell'assistenza sanitaria, anche nelle aree del mondo più disagiate.

LEGISLAZIONE POCT

La realtà della regolamentazione dei POCT è molto diversa nelle nazioni del mondo. Le Nazioni in possesso di una legge nazionale sono 3: Australia, Canada e Stati Uniti. La realtà italiana, così come quella di tanti altri paesi è distante dall'istituzionalizzazione definitiva, in quanto manca un pronunciamento del governo sull'argomento. Infatti, la gestione organizzativa e l'aspetto delle responsabilità sono affidate alle regioni. Tuttavia, solo alcune regioni, quali Lombardia, Piemonte, Marche, Friuli, Toscana e Emilia Romagna hanno elaborato delle linee guida.

I POCT rappresentano un supporto al Servizio Medicina di Laboratorio e la loro gestione deve quindi essere sotto il controllo del Laboratorio, il quale se ne assume piena responsabilità.

I test decentrati, devono produrre risultati assolutamente comparabili con quelli del laboratorio, inclusa l'aderenza agli standard della buona pratica di laboratorio, che comprendono:

- la Gestione per la qualità (QA),
- il controllo di qualità interno (QCI)
- la partecipazione a controlli esterni (VEQ)

La Qualità dell'analisi deve essere monitorata, documentando correttamente le attività che sono svolte. Per fare questo occorre costruire un sistema che governi in maniera adeguata il processo di laboratorio.

L'Ente Italiano di Accreditamento (ACCREDIA) ha stabilito alcune linee guida che regolamentano lo svolgimento dell'attività dei POCT da parte dei Laboratori Medici, al fine di assicurare la correttezza e l'affidabilità dei risultati.

Perché un laboratorio possa svolgere attività di POCT deve richiedere e ottenere l'accreditamento, ai sensi delle norme:

- **ISO 22870-2006** Point of care testing (POCT) - Requirements for Quality and Competence ISO 15189:2003 Medical Laboratories Particolare Requirements for Quality and Competence
- **EN ISO 22870:2006** Point of care testing (POCT)

In particolare, la seconda norma, introduce requisiti integrativi, applicabili alla gestione e all'esecuzione degli esami Point of Care.

Il concetto di riferimento è che la gestione degli strumenti decentrati debba rientrare in un sistema di qualità gestito con pieno coinvolgimento del Laboratorio centrale e di tutti gli attori principali.

È di fondamentale importanza anche la formazione e l'addestramento del personale addetto all'esecuzione delle analisi POCT, al fine di eseguire correttamente l'analisi garantendo la qualità del dato analitico.

Al fine di garantire che la qualità dei POCT rispecchi quella del laboratorio che ne ha ordinato lo svolgimento, è opportuno costituire una Commissione Aziendale Multidisciplinare (commissione POCT) e di un Comitato esecutivo (Comitato o Gruppo POCT), i quali svolgono il ruolo di monitoraggio, di formazione del personale e che si assumono la piena responsabilità nella gestione dell'attività decentrata.

Commissione POCT

È costituita di norma da:

- Direttore Sanitario
- Direttore di Dipartimento del Laboratorio
- Direttore di Farmacia
- Dirigente dell'Area Tecnico Sanitaria Aziendale
- Dirigente dei Servizi Infermieristici

I quali possono servirsi del supporto di altre figure interne all'Azienda al fine di ottenere un parere consultivo, tra cui:

- Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB)
- Responsabile Ingegneria Clinica
- Responsabile dei sistemi informativi

Prima di introdurre un'attività di POCT, è necessario che questa venga valutata e approvata dalla commissione e, se conforme ai requisiti, verrà inserita nel manuale della qualità del laboratorio.

Competenze e responsabilità professionali

DIRETTORE DI LABORATORIO

Garantisce:

- L'integrità del sistema di gestione di qualità sia mantenuta quando questo venga rielaborato ed implementato
- Gli obiettivi di qualità dei POCT siano stabiliti e misurabili
- La pianificazione del sistema di gestione di qualità e gli obiettivi di qualità siano gestiti in accordo con le specifiche richieste
- Lo sviluppo di un adeguato programma di addestramento del personale coinvolto. Solo il personale che avrà dimostrato la competenza necessaria potrà eseguire gli esami su sistemi POCT.

Eventualmente il Direttore può assegnare la responsabilità del training di uno specifico POCT e/o strumento ad un Tecnico Sanitario di Laboratorio Biomedico (TSLB).

La responsabilità spetterà quindi al Direttore di Laboratorio, o alla persona designata.

COORDINATORE TECNICO

È responsabile della supervisione tecnica per tutti i sistemi POCT:

- Controllo di processo e controllo di prodotto
- Programmazione e monitoraggio della manutenzione
- Controllo delle istruzioni d'uso degli apparecchi e delle procedure
- Verifica delle fasi pre e post analitiche
- Valutazione di una nuova strumentazione
- Verifica della correttezza delle operazioni strumentali
- Inventario dei sistemi POCT
- Gestione magazzino
- Punto di riferimento per gli utilizzatori dei POCT

COORDINATORE INFERMIERISTICO

- Figura di collegamento tra i POCT ed il Laboratorio per tutte le aree infermieristiche ed il personale non di laboratorio coinvolto
- Collaboratore nei programmi di educazione ed addestramento del personale
- Riferimento per il Coordinatore Tecnico / consulente Tecnico

Il progresso tecnologico ha reso questa tecnologia più affidabile, ma restano rischi legati all'impiego di personale non sufficientemente addestrato, alla inadeguata supervisione, la mancanza di accreditamento dei POCT, all'assenza di schemi per il controllo di qualità e l'inappropriata interpretazione dei dati.

Per questo, in nessun caso il POCT va scambiato per un equivalente del Laboratorio Centrale, ma sempre e solo come un suo supplemento e in casi in cui ci si basa su risultati ottenuti in POCT per assumere decisioni clinicamente critiche è opportuno prevedere un passaggio di verifica da parte del Laboratorio.

Il concetto trainante dei POCT è quello di eseguire i test nel modo più comodo e immediato, in quanto possono essere eseguiti direttamente vicino al paziente senza la necessità di trasferire il campione nel laboratorio; anche grazie allo sviluppo delle tecnologie i POCT si stanno diffondendo sempre di più e per alcune persone rappresentano uno strumento quotidiano al quale affidano la cura della propria salute. Sono realizzati attraverso l'utilizzo di strumenti trasportabili, portatili e palmari e possono trovare applicazioni in molteplici situazioni come in ambiente domestico, al livello ambulatoriale, nei reparti di pronto soccorso, nelle ambulanze, e inoltre questi dispositivi possono essere usati da moltissime persone, inclusi i laboratoristi, i medici del pronto soccorso, i radiologi, gli infermieri o altre figure professionali sanitarie.

VANTAGGI

I POCT ormai rivestono un ruolo vitale nell'organizzazione dei servizi di salute pubblica, e se usati correttamente i dispositivi POCT possono essere molto efficienti e migliorare le cure cliniche fornite al paziente; per esempio in ambito domestico, per l'autocontrollo, consentono un monitoraggio più assiduo dei pazienti e quindi una migliore gestione della patologia. I dispositivi POCT sono cruciali in condizioni di emergenza e nelle sale operatorie, ad

esempio le persone con sospetta ictus possono beneficiare dell'uso di un dispositivo POCT per la misura del PT/INR e la valutazione delle capacità coagulative, prima della somministrazione della terapia oppure possono essere usati nelle sale operatorie durante operazioni di chirurgia cardiaca o di trapianto d'organo. I principali vantaggi si ottengono quando i risultati di un dispositivo POCT vengono immediatamente esportati su una cartella clinica elettronica, in questo modo i dati ottenuti possono essere condivisi subito con tutti i membri della squadra medica grazie all'interfaccia del software, diminuendo il turn around time (TAT), ovvero il tempo di percorso di una richiesta necessario all'ottenimento del risultato o della risposta del referto. Quindi i POCT presenterebbero dei potenziali vantaggi operativi, in quanto il triage ed il processo decisionale sarebbero più rapidi, infatti si riducono i tempi operativi, si ha la riduzione del tempo di cura post-operatorio, la riduzione del tempo di permanenza in sala urgenze, la riduzione del numero di visite ambulatoriali e infine anche la riduzione delle ospedalizzazioni.

SVANTAGGI

Sebbene la maggior parte dei dispositivi POCT siano progettati per essere di semplice utilizzo e con poco margine di errore, non sono completamente esenti da questi ultimi, in quanto le persone che usano questi dispositivi devono essere correttamente istruite sul loro utilizzo, perché alcuni test POCT per esempio quelli utilizzati per la scelta della variazione del dosaggio terapeutico dei farmaci possono comportare conseguenze gravi se non usati correttamente. Ovviamente non hanno la stessa sensibilità dei test di laboratorio e non possono essere considerati in generale dei test diagnostici, ma sono dei test di screening o meglio di monitoraggio, per esempio se il dato che rivelano è fuori norma deve essere convalidato da un test di laboratorio; quindi questi test devono essere utilizzati in associazione e non in sostituzione ai test eseguiti in laboratori clinici specializzati.

Possiamo concludere dicendo che i test POCT non sostituiranno mai i test eseguiti nei laboratori clinici, però si stanno compiendo numerosi sforzi per migliorare sempre di più le tecnologie alla base dei POCT, al fine di renderli maggiormente sensibili e specifici e saranno una parte sempre più importante nella gestione del paziente, nel miglioramento della qualità della vita e nell'ampliamento della disponibilità dell'assistenza sanitaria, anche nelle aree del mondo più disagiate.

L' INTELLIGENZA ARTIFICIALE

La microbiologia e la diagnostica infettivologica cavalcano, oggi, l'onda di un processo di trasformazione, complesso ed affascinante al tempo stesso, che se correttamente gestito può essere in grado di eliminare il superfluo ed il ridondante, così spesso presente nei laboratori microbiologici, per produrre risultati concreti e rapidi, mediante l'applicazione di regole, algoritmi e riferimenti, raccolti e consultabili in databases ove discriminare fra i cosiddetti "big data", al fine di aumentarne l'impatto nella gestione clinica e terapeutica delle malattie da infezione.

Nell'ottica dell'ottimizzazione dei processi e del potenziamento dei servizi diagnostici attraverso innovazione tecnologica e alta automazione, diventa preponderante il legame tra l'organizzazione dei laboratori e l'utilizzo di nuove tecnologie che possano consentire tempestività, qualità dei risultati ed efficienza dell'intero sistema.

Si punta ad una nuova microbiologia clinica, rapida e ad alta intensità diagnostica, che sappia rispondere alle esigenze del territorio con una disponibilità 24 ore su 24, ad una scienza che scardini l'idea tradizionalista di un laboratorio vecchio stampo e che si accinga all'immaginazione concreta di un laboratorio in un chip, sfruttando l'ampia potenzialità dell'intelligenza artificiale che oggi più che mai si fa strada tra i meandri complessi delle **reti neurali artificiali**.

Un sistema a rete neurale a somiglianza della mente umana configura in un modello matematico composto da neuroni artificiali in grado di elaborare grandi quantità di dati in ingresso apparentemente tra loro non correlati, e di produrre in uscita una decisione utilizzabile, basandosi su una modalità di apprendimento che rende possibile scoprire nella massa dei dati inseriti durante la fase di addestramento o training set del sistema, la correlazione cercata, la quale risulterà significativa se si sottoporranno all'esame del sistema campioni diversi da quelli usati nella fase suddetta. È questo un criterio di verifica generale e fondamentale della fase di apprendimento sia degli esseri umani sia della macchina: *"si è davvero imparato se si sanno risolvere problemi diversi da quelli usati come esempi durante l'apprendimento"*.

Qualora le uscite del sistema non corrispondessero ai risultati forniti dagli esperti umani potrebbe darsi il caso che siano stati trascurati dei fattori di influenza; in questi casi il modello deve essere sottoposto ad un nuovo ciclo di addestramento. Solo quando i risultati del sistema e degli esperti umani risulteranno compatibili, il modello potrà essere

sviluppato in un prodotto con i relativi hardware e software.

Un semplice neurone artificiale...

L'elemento di base di calcolo del circuito nervoso artificiale è spesso chiamato **nodo, unità o neurone**. Esso riceve un input da alcune altre unità, o anche da una fonte esterna. Ad ogni ingresso è associato un peso, che può essere modificato nella fase di apprendimento sinaptico. L'uscita a sua volta può servire da input per le altre unità.

Ciascuna unità svolge un'operazione molto semplice che consiste nel diventare attiva se la quantità totale di segnale che riceve supera la propria soglia di attivazione. Se un'unità diventa attiva, essa emette un segnale che viene trasmesso lungo i canali di comunicazione fino alle altre unità a cui essa è connessa; ciascun punto di connessione agisce come un filtro che trasforma il messaggio ricevuto in un segnale inibitorio o eccitatorio aumentandone o diminuendone al contempo l'intensità a seconda delle proprie caratteristiche individuali. Questi punti di connessione simulano le sinapsi biologiche da cui prendono spesso anche il nome.

Un insieme di tali elementi connessi in rete può, in linea di principio, svolgere qualsiasi tipo di calcolo aritmetico e funzione logica. Quando uno stimolo viene applicato ai neuroni d'ingresso della rete neurale, i segnali viaggiano in parallelo lungo le connessioni attraverso i nodi interni fino ai nodi di uscita la cui attivazione rappresenta la risposta della rete neurale. Ciascun nodo elabora solo l'informazione locale: questo significa che esso si attiva solo in funzione dell'informazione che riceve attraverso le proprie connessioni di ingresso, ma non sa né qual è lo scopo globale dell'elaborazione né quali operazioni vengono svolte dagli altri nodi ai quali non è collegato.

La rivoluzione del percorso clinico...

La mente artificiale, acquisendo sempre più dati, è in grado non solo di elaborare informazioni in crescita esponenziale ma di costruire da sé - essendo programmata per farlo - algoritmi interpretativi e decisionali in una nuova medicina predittiva e personalizzata, che catapultata la microbiologia clinica nell'era degli algoritmi, capaci di interpretare in frazioni di secondi moli enciclopediche di dati che il cervello umano, pur possedendo capacità logiche e mentali ben superiori a quelle delle macchine, non potrebbe neanche in decenni riuscire ad assemblare ed esaminare in termini quantitativi e qualitativi così sofisticati e performanti. Senz'altro si assiste ad una ibridazione dell'Uomo con la Macchina, una integrazione tra intelligenza biologica e intelligenza al silicio.

È enorme la potenzialità che questi modelli acquisiscono nella predizione di gravi patologie, quali quelle infettive dall'esordio non immediatamente chiaro e univoco, per una diagnosi microbiologica rapida e certa. Il valore concreto di questi nuovi approcci tecnologici è supportato da numerosi studi che, relativamente alla microbiologia clinica, nel quadro di malattie insidiose quali meningite o sepsi, confermano come l'applicazione di tecnologie informatiche possa fornire indici, punteggi e quindi bio-score, in grado di prevedere con una sensibilità e specificità elevate, un'infezione di eziologia batterica piuttosto che virale come nel caso di meningite, dalla cui discriminazione seguirà un diverso approccio e trattamento terapeutico al paziente, o ancora cimentarsi in un'analisi predittiva di sepsi a garanzia di un trattamento rapido e tempestivo.

Nell'uno e nell'altro caso, sono stati condotti studi scientifici attraverso i quali si vuole puntare il focus sulla rapidità ed affidabilità diagnostica.

Gli algoritmi del machine learning in supporto alla microbiologia: diagnosi differenziale di meningite...

Relativamente alla Meningite, nota infiammazione delle membrane che proteggono l'encefalo nel cranio ed il midollo spinale nel canale rachidiano, rispetto alla causa che l'abbia scatenata, è possibile distinguere 3 forme cliniche:

- Meningite infettiva: causata da virus, batteri o altri microrganismi;
- Non infettiva: causata da tumori, malattie autoimmuni, farmaci;
- Idiopatica: quando la causa della meningite rimane ignota.

Le forme infettive vengono a loro volta classificate in **virali** e **batteriche** in base al patogeno che le abbia determinate.

La forma **virale**, anche definita **asettica**, è la più comune; non ha, in genere, conseguenze gravi e si risolve nell'arco di 7-10 giorni.

La forma **batterica** è, invece, più rara quanto estremamente grave con conseguenze potenzialmente letali.

Il percorso tradizionale nella discriminazione tra le due forme, prevede che il medico ricorra all'analisi di un campione di liquido cefalorachidiano ottenuto con puntura lombare, così che si possa successivamente procedere allo studio di un diverso approccio terapeutico:

-infatti, la meningite batterica deve essere trattata fornendo una terapia antibiotica adeguata al fine di evitare conseguenze gravi, quali lo sviluppo di malattie invasive che possano condurre addirittura alla morte

-al contrario, fornire una terapia antibiotica non necessaria, in una forma virale, potrebbe portare a resistenza agli antimicrobici, a cambiamenti nel

microbioma umano e ad alti livelli di stress per i pazienti sofferenti.

Nella discriminazione tra le due forme infettive è stato testato, in studi recenti, il modello neurale di Machine Learning (ML), registrando risultati rapidi ed efficienti, raggiunti mediante l'applicazione di algoritmi, che simulando il cervello umano, apprendono e svolgono una determinata attività.

A marzo del 2021, è stato condotto, in Grecia, uno studio fondato sull'utilizzo della tecnica di Machine Learning, servendosi dei tre algoritmi di:

- Multiple Logistic Regression (MLR)
- Random Forest (RF)
- Naïve-Bayes (NB)

Gli stessi sono stati applicati a due gruppi di pazienti con meningite di età compresa tra 0-14 e >14 anni, utilizzando per i medesimi, come predittori, i seguenti parametri:

- neutrofili del liquido cerebrospinale (CSF)
- linfociti del CSF
- neutrofili in rapporto con linfociti (NLR)
- albumina nel sangue
- glucosio
- recettore dell'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasi solubile nel sangue (suPAR),
- proteina C reattiva nel sangue (CRP)
- rapporto tra linfociti (CSF) e PCR nel sangue
- sesso

Una volta definiti i predittori, la seconda fase dello studio è stata suddivisa in:

- **Training set:** insieme di dati che vengono utilizzati per addestrare un sistema supervisionato come una rete neurale, fissando il numero di punti di dati di training all'80% del set dei dati originali;
- **Testing set:** insieme di dati utilizzati per testare il modello addestrato, il quale rappresenta il 20% dei dati rimanenti.

In una terza fase, viene applicata una procedura di convalida incrociata adatta a ciascun modello, utilizzando solo una parte del training set ed esaminando quanto bene il modello abbia previsto il set di test.

Dopo la regolazione dei precedenti tre step, il modello viene utilizzato per prevedere i risultati corrispondenti ai valori predittori per ciascun paziente nel set di test, registrando, quindi, la percentuale di previsioni corrette.

Quando si applica una procedura basata sul Machine Learning, viene considerato un insieme di variabili (neutrofili CSF, NLR, albumina e così via) al fine di generare il valore previsto della risposta (cioè il tipo di meningite); questa previsione viene poi confrontata con il valore osservato al fine di calcolare la percentuale di casi virali e batterici correttamente previsti.

Dai risultati ottenuti nel presente studio, si può a tal fine concludere, facendo luce sul ruolo di metodo accurato nella previsione di meningite virale anziché batterica in un dato soggetto, svolto dal

modello di Machine Learning, il quale dall'inserimento di input quali i valori di neutrofili CFS, linfociti CSF, NLR, albumina, glucosio, sesso e CRP nella corrente principale dei sistemi di diagnosi assistita da computer ha permesso l'ottimizzazione della diagnosi differenziale.

La rete neurale nella predizione di batteriemia: Sepsifinder e valutazione del rischio...

Individuare una sindrome è spesso, per la difficoltà dell'identificazione in modo coerente a causa della variazione nell'interpretazione dei segni e sintomi, compito arduo; a tal proposito, addestrare una rete neurale convoluzionale atta a rilevare la sindrome dagli esami di laboratorio potrebbe permettere di raggiungere un'accuratezza simile o superiore a quella dei medici nel riconoscerla.

Le reti neurali convoluzionali sono potenti algoritmi che possono essere addestrati nel riconoscimento di segni relativi ad una condizione sindromica e che hanno diverse applicazioni: nel riconoscimento di immagini e video, nell'elaborazione del linguaggio naturale e recentemente nella bioinformatica, mostrando, ai nostri giorni, prestazioni equivalenti a quelle dei medici in un'ampia gamma di problemi clinici, tra i quali quelli caratterizzanti la ricerca della **sepsi**.

La recente definizione descrive la **sepsi** come un'insufficienza degli organi generata da una risposta infiammatoria abnorme dell'ospite nei confronti dell'infezione, e che mette in pericolo la vita, attestandola come emergenza medica, ovvero come sindrome, la cui gravità aumenta fino alla morte nello scorrere rapido del tempo: concetto che obbliga ad un profondo cambiamento nel management territoriale e ospedaliero.

L'elemento più grave in una sepsi, dal punto di vista clinico, è lo scompenso cardiocircolatorio dovuto al fatto che ci sia un'azione vasodilatatrice diffusa da parte delle sostanze chimiche, quali tossine, antigeni batterici e citochine del sistema immunitario liberati nel torrente circolatorio. La marcata vasodilatazione periferica, dovuta a rilascio della tensione muscolare della parete delle arteriole, porta a forte riduzione della pressione arteriosa e, quindi a insufficienza di circolo nei diversi organi.

Il tutto rende la sepsi un problema sanitario molto serio, avendo una mortalità molto alta, tra il 15% e il 60%. Di conseguenza è di fondamentale importanza predire, con la massima celerità, sensibilità e specificità, l'insorgere di una sepsi e la sua potenziale malignità in modo da intervenire prima della comparsa di seri problemi circolatori. A livello di ricerca base, sono stati creati alcuni algoritmi e score clinici per la predizione della mortalità da affiancare alla valutazione della batteriemia.

È considerata una patologia tempo-dipendente: prima si identifica, maggiori sono le possibilità di curarla in maniera efficace; più tempo si perde, maggiori sono le possibilità di morte fino ad arrivare ad avere solo 1 possibilità su 2 di sopravvivenza.

Un anticipo della diagnosi, porterebbe pertanto, un grande giovamento al trattamento successivo.

L'identificazione precoce dei pazienti con sepsi e il tempestivo inizio di un trattamento adeguato hanno un significativo impatto sulla sopravvivenza, la terapia precoce con antimicrobici appropriati è vitale: un mancato avvio della stessa aumenta la mortalità.

In questa ottica, si inserisce prepotentemente **Sepsifinder CPN (Causal Probabilistic Network)** sviluppato dalla Aalborg University (Danimarca), in collaborazione con il Beilinson Hospital (Israele), come un sistema di intelligenza artificiale capace di analizzare autonomamente i dati clinici, creando connessioni di reti neurali, al fine di offrire una valutazione predittiva del rischio di batteriemia e di morte precoce. Esso nasce dalla sovrapposizione di due modelli precedenti, sviluppati dagli stessi autori, chiamati Sepsis-B (predizione di batteriemia) e Sepsis-M (predizione di mortalità a trenta giorni). L'elemento clinico cardine per la valutazione del rischio di batteriemia e per la mortalità a trenta giorni è la frazione di neutrofili. Il modello incorpora dati di letteratura, casi clinici e le acquisizioni fondamentali in materia.

Il **Causal Probabilistic Network** è un modello stocastico di elaborazione di dati attraverso "punti nodali" (variabili misurabili) e "frecce" (relazioni causali tra i punti nodali). Le relazioni causali possono essere quantificate secondo probabilità condizionali e permettono inferenze su fattori sconosciuti, partendo dall'analisi di variabili note.

Immettendo i dati clinici iniziali, relativi a pazienti con "sospetta sepsi", insieme ai dati successivi, si è chiesto al machine-learning di trovare connessioni significative tra i dati iniziali e il tipo di outcome (in termini di sviluppo di batteriemia e di mortalità conseguente). Il modello, validato in tre data-set indipendenti, ha elaborato un algoritmo di riferimento per dare predizione di batteriemia vera o di morte a breve termine partendo dai dati iniziali di pazienti con sepsi solo sospetta.

L'Università di Aalborg ha poi sviluppato, sulla base della predizione di rischio dell'algoritmo Sepsifinder, un tool laboratoristico, chiamato TREAT Lab™, che analizza markers comuni di sepsi, sia clinici che laboratoristici (la versione base prevede l'analisi di piastrine, proteina C reattiva, bilirubina e frazione di neutrofili). La conseguente determinazione del rischio permette la selezione di pazienti con aumentata probabilità di batteriuria o di mortalità rispetto alle previsioni basate con metodiche standard.

Il modello Sepsifinder utilizza una serie di variabili di tipo clinico ovvero lo stato mentale, la febbre,

una ipotermia, tachicardia, apnea, edema polmonare, iperglicemia oppure variabili infiammatorie come la proteina C reattiva, la procalcitonina, la leucocitosi, l'incremento di cellule mature, variabili legate a danni d'organo come la coagulazione, incremento della creatina, e variabili emodinamiche.

Dal momento in cui la rete neurale riesce a cogliere tutti questi parametri, o perché il clinico le digita su di un computer oppure perché vengono direttamente catturati dalla stessa rete neurale connessa alla banca dati del laboratorio, si ottiene un modello probabilistico che si concentra sulla valutazione del rischio dei pazienti sospetti di infezione. Questa valutazione del rischio ha 2 scopi ovvero determinare la strategia diagnostica e quella terapeutica da adottare. In ogni caso la gravità della malattia è un fattore determinante.

Il gold standard attuale per la diagnosi di sepsi è l'emocoltura, che in genere richiede 2-4 giorni. In confronto, i nuovi test molecolari rapidi come la PCR eseguiti direttamente sul sangue, sono ancora più efficaci in quanto permettono di identificare il patogeno più velocemente, in 6-12 ore.

Lo svantaggio dei metodi molecolari è quello di essere molto più costosi e attualmente non è possibile eseguire questi test per tutti i pazienti sospetti di infezione al di fuori dell'unità di Terapia Intensiva.

Tuttavia, la previsione della batteriemia ha un potenziale commerciale significativo: infatti, come già accennato, metodi diagnostici rapidi possono identificare il patogeno eziologico nei pazienti con sepsi più velocemente delle emocolture.

Per cui la stratificazione accurata della popolazione in base alla probabilità di batteriemia e morte entro 30 giorni, garantisce che pazienti che necessitano maggiormente di una diagnostica rapida, possano trarne vantaggio. E questa stratificazione basata sulla valutazione del rischio consente un uso conveniente della diagnostica rapida sia su campioni di sangue diretti, che a valle di emocolture positive.

Pertanto, il modello Sepsis Finder permetterà di identificare i candidati da sottoporsi a test diagnostici rapidi attraverso la stratificazione basata sul rischio dei pazienti sospetti di infezione. In questo modo il clinico di laboratorio eviterà di scegliere test diagnostici rapidi costosi per pazienti per i quali il test non sarebbe conveniente. Per esempio, in una corte di 3589 pazienti, SepsisFinder è stato in grado di selezionare il 58% di pazienti, per i quali eseguire il test PCR non sarebbe conveniente.

Questa capacità di prevedere la batteriemia e la mortalità a 30 gg, e quindi di valutare il rischio, offrirà dunque l'opportunità di semplificare il workflow diagnostico, consentire cioè una diagnosi accelerata (uno o 2 giorni prima rispetto ai metodi convenzionali) e un trattamento migliore del paziente potenzialmente settico.

In conclusione, anticipare la sepsi riconoscendola già dai primi sintomi rappresenta un'importante opportunità per l'intelligenza artificiale di rivoluzionare l'assistenza sanitaria.

Trarre il massimo vantaggio dall'Intelligenza Artificiale (IA) non può però farci dimenticare che queste tecnologie non possono sostituire l'uomo: sono di enorme aiuto analizzando una quantità di dati impossibile per il cervello umano, ma è sempre quest'ultimo l'elemento che dà un senso ai dati analizzati. Sta all'uomo usare l'IA in modo virtuoso, dal punto di vista sia scientifico sia morale, senza mai dimenticare la dimensione etica del rapporto con il paziente.

Biomarcatori alla base delle reti neurali...

In entrambi gli studi condotti sulla previsione diagnostica in condizioni infettive particolarmente gravi e potenzialmente letali, mediante l'applicazione dei circuiti nervosi artificiali, hanno giocato un ruolo di prima linea **biomarcatori**, assunti ad indici dalla notevole importanza prognostica.

Un biomarcatore è un indicatore biologico, quale una sequenza di DNA o una proteina, derivante da una complessa risposta dell'ospite ad uno stimolo infettivo, rinvenibile nel sangue o nei campioni biologici, facilmente dosabile ed in grado di correlare con una data patologia o con una risposta ad un determinato trattamento.

Esso, è pertanto, clinicamente utile quando altamente sensibile, specifico per il processo che si vuole monitorare, facilmente rilevabile, capace di fornire risultati riproducibili su uno stesso campione; per tutte queste caratteristiche può essere assunto a variabile dinamica, la quale può essere rapidamente misurata per consentire un monitoraggio seriale del processo morboso in corso dettando eventuali cambi nella strategia terapeutica.

Facendo leva su queste proprietà i biomarcatori potrebbero assumere un ruolo preponderante nell'identificazione precoce di possibili stati patologici gravi, relativamente ai quali sarebbe auspicabile una diagnosi tempestiva perché consentirebbe di riconoscere precocemente i soggetti più a rischio e migliorerebbe l'outcome in molti di essi. Attraverso il dosaggio di parametri sensibili e specifici si potrebbero attuare trattamenti più precoci, mirati ed efficaci.

Una nuova sfida...

La sofisticazione di una Mente Artificiale tende ad affermare il proprio ruolo nello scenario rivoluzionario della nuova medicina predittiva e personalizzata, nella quale è coinvolta la branca della microbiologia clinica. Tuttavia, non mancano diverse critiche o segnalazioni di limiti e bias di cui tener conto riguardo alla performance e alla completa affidabilità degli attuali sistemi di machine learning e computer assisted medicine; non a torto bisogna sostenere la necessità di realizzare studi metodologicamente robusti, prospettici di confronto tra team di esperti che utilizzano sistemi basati su al-

goritmi e team che non li utilizzano. Solo in questo caso saranno realizzate, nel prossimo futuro, tecnologie effettivamente applicabili in contesti clinici reali anziché sperimentali.

La microbiologia dovrà in questa sfida futuristica conformarsi all'ineluttabilità ed al fascino del cambiamento, acquisendo sempre più consapevolezza della necessità di trasformazioni strutturali ed organizzative, spinte dalla tecnologia, che vanno possibilmente governate, ma che possono/devono condurre al superamento dei confini disciplinari e professionali tradizionali; dovrà ricercare le possibilità di dimostrare il valore aggiunto della Diagnostica di Laboratorio, con la riscoperta del "referto", l'impegno al lavoro di comunicazione all'interfaccia clinica-laboratorio e gli studi di outcome, alla luce di una sempre più accettata EBLM (evidence-based laboratory medicine).

Un futuro possibile, nel 2026 o anche prima...

L'informazione tecnologica progressivamente ha assunto un ruolo essenziale per il Laboratorio e ne è diventata veramente il sistema nervoso, in condizioni di connettere tutte le sue parti, farle funzionare, avvertirne i messaggi, elaborare i dati in conoscenze. Sistemi informatici di laboratorio completamente integrati sono un prerequisito per fornire un servizio clinico efficiente e per gestire il Laboratorio. A tal fine essi devono rispondere ai quattro livelli definiti dalla gestione operativa, dei dati, delle informazioni aggregate e della conoscenza, consentendo di registrare tutte le richieste per tutti i test, di tenere collegati on-line e in real-time tutti gli strumenti analitici, di registrare e valutare in tempo reale i dati del controllo di qualità, di validare automaticamente i risultati, di rilasciare elettronicamente gli esiti agli utilizzatori clinici, di implementare sistemi di supporto alla diagnosi per migliorare gli output clinici e di supportare gli interventi all'interfaccia clinica-laboratorio dei gruppi multidisciplinari come audit, gestione del rischio clinico, controllo della patologia ed epidemiologia.

Il laboratorio clinico che guarda al futuro dovrà caricarsi di un'architettura che contempli essenzialmente tre pilastri portanti:

- **funzionalità:** ovvero l'insieme delle funzioni eseguite o supportate dalla tecnologia
- **flessibilità:** nonché la modularità e scalabilità delle proposte tecnologiche, per essere pronti all'aumento dei volumi, alle modifiche organizzative e all'innovazione medica e assistenziale
- **futuribilità:** le scelte strumentali devono essere in grado di centrare adeguatamente gli obiettivi riorganizzativi e di preparare il Laboratorio a ogni cambiamento futuro, per quanto attiene sia la propria organizzazione interna (rete micro delle professioni e delle discipline) sia l'integrazione nella più vasta rete macro delle meta-organizzazioni.

La microbiologia clinica subirà, quindi, le più profonde innovazioni nel campo dei test di sensibilità alle terapie, del monitoraggio ambientale, dell'epidemiologia molecolare e dell'identificazione dei ceppi e degli agenti infettivi. Le malattie infettive saranno diagnosticate ampiamente con lab-on-chip costruiti per estrazioni, identificazioni e sequenziamenti automatici e miniaturizzati. Il monitoraggio delle malattie infettive sarà effettuato nel luogo di cura, in remoto dal Laboratorio.

In questa visione futuristica il 2026 è visto come l'anno in cui la tassonomia delle discipline e subdiscipline di laboratorio sarà sconvolta nell'ottica di un futuro pieno di opportunità mascherate da sfide e difficoltà...

"...Il futuro non si prevede, si inventa e agire e creare tecnologie nel presente è la sola macchina che abbiamo per viaggiare avanti nel tempo..."

IL SEQUENZIAMENTO GENICO

Sequenziare significa determinare l'ordine esatto dei monomeri che compongono una biomolecola: la prima ad essere sequenziata è stata una proteina, ovvero l'insulina.

Quando però si parla di sequenziamento spesso ci si riferisce, in modo implicito, alla ricostruzione dell'ordine dei nucleotidi che formano una molecola di DNA.

Il DNA contiene tutte le informazioni genetiche ereditarie alla base dello sviluppo di ogni organismo; determinarne la sequenza rappresenta il primo passo per comprendere le funzioni e la regolazione di ogni gene.

I primi metodi che permisero un sequenziamento "maneggevole" e che quindi potesse entrare nella routine di laboratorio, risalgono al 1977 e sono il **metodo chimico**, ideato da Allan Maxam e Walter Gilbert, e il **metodo enzimatico**, sviluppato da Frederick Sanger.

Nonostante le tecniche fossero entrambe efficaci, essendo il metodo enzimatico più semplice da automatizzare, più veloce e sicuro, fu quest'ultimo a imporsi nei laboratori e a essere commercializzato. Questo metodo rimase per molti anni il "gold standard" per il sequenziamento genico e ancora oggi continua ad essere utilizzato. Il metodo Sanger, inoltre, fornendo la possibilità di sequenziare frammenti più lunghi di DNA, portò alla creazione nel 1982 della GenBank, un database con lo scopo di raccogliere e mettere a disposizione di tutti le sequenze elaborate.

Nel 1986, la ditta Applied Biosystems introdusse nel mercato i primi sequenziatori automatici che permettevano di ridurre notevolmente i tempi necessari all'ottenimento di una sequenza: si poteva codificare circa 400.000 basi al giorno. L'arrivo sul mercato di questi sequenziatori diede la spinta per avviare il **Progetto Genoma Umano**, nel 1990: gli

obiettivi erano identificare tutti i geni presenti nel genoma umano e definire il corretto ordine delle 3 miliardi di basi che lo compongono.

Nel 2005, due anni dopo la conclusione del progetto, si apre l'era della **Next Generation Sequencing** (chiamata comunemente NGS), la tecnologia che più di tutte ha contribuito ad archiviare il metodo Sanger. Infatti, nonostante il successo del Progetto Genoma Umano, esso ha messo in evidenza i limiti del metodo enzimatico e quindi ha portato alla ricerca di tecnologie più innovative.

Esistono diversi tipi di sequenziatori NGS, spesso identificati con il nome della compagnia che li ha sviluppati, ricordiamo:

- **Roche 454 system.** Tecnologia nata nel 2005 e immessa sul mercato dalla ditta 454 Life Sciences (ora proprietà della Roche Diagnostic Corporation).
- **Illumina system.** Tecnologia introdotta dalla ditta Solexa nel 2006.
- **SOLiD.** Sistema introdotto nel 2007 dalla Applied Biosystem.
- **Helicos Genetic Analyzer system.** Presentato nel 2009 dalla ditta Helicos.
- **PacBio RS system.** Tecnologia immessa sul mercato nel 2011 dalla Pacific Biosciences.

Le metodologie di nuova generazione sono tecnologie ad alta resa: implementando un sistema dotato di maggiore processività, sono in grado di sequenziare fino a 600 miliardi di basi in circa 10 giorni, una differenza enorme rispetto al metodo Sanger, con il quale si arriva al milione di basi al giorno. Parallelamente c'è stata anche una drastica riduzione in termini di costi che ha portato il sequenziamento di una Mb a costare circa 1 dollaro, contro i 10.000 dollari necessari per ottenere lo stesso risultato con i vecchi metodi.

Di conseguenza, il sequenziamento di grandi genomi è diventato accessibile a molti laboratori, determinando una vera e propria rivoluzione nel settore. La genomica, infatti, è l'ambito che ha maggiormente beneficiato delle tecnologie di nuova generazione, in quanto l'analisi di un intero genoma, richiede un'elevata processività a causa della considerevole quantità di materiale da decifrare. Basti pensare che oggi si è in grado di sequenziare un intero genoma in pochi giorni, contro i 10 anni che ci sono voluti per decodificare il genoma umano con il metodo Sanger.

Le enormi quantità di dati ottenuti con le NGS hanno reso necessario lo sviluppo di nuove competenze per la loro gestione ed analisi: nasce da questa esigenza una nuova disciplina la Bioinformatica: essa utilizza gli strumenti informatici per descrivere dal punto di vista numerico e statistico i fenomeni biologici. Di fatto, una procedura importante, compito della bioinformatica, è l'**allineamento delle sequenze** per verificare se le nostre sequenze di interesse sono presenti all'interno di un

database di sequenze conosciute oppure se ne esistono di simili. L'allineamento permette di individuare regioni identiche o simili, ma anche eventuali mutazioni (inserzioni, delezioni e sostituzioni), ed esistono parecchi software di allineamento, tra i quali il più famoso è il BLAST. A questo punto è possibile arrivare all'identificazione di geni e degli elementi funzionali all'interno di una sequenza, nel processo definito **annotazione**. Possiamo quindi dire che lo scopo dell'analisi bioinformatica è in primo luogo quello di consegnare dati di sequenza ad alta qualità, mappati senza ambiguità al genoma di riferimento, annotati e classificati e quantificati con il massimo livello di precisione e contenuto informativo

Le reads generate con queste metodiche, però, sono comunemente piuttosto corte, quindi non possono essere utilizzate per sequenziare un intero cromosoma. Inoltre, le tecniche NGS possono portare alla perdita di informazioni "accessorie" importanti per comprendere la funzione dei geni e richiedono l'amplificazione iniziale delle sequenze di DNA che può introdurre errori casuali.

Per ovviare a questi limiti, la ricerca sta puntando verso nuove metodiche come, ad esempio, la **Nanopore Technology**, mostrata per la prima volta nel 2012. Questa tecnologia permetterebbe di sequenziare milioni di nucleotidi, senza ricorrere all'amplificazione dei frammenti di DNA.

Successivamente alla messa in commercio della prima piattaforma, le tecnologie NGS hanno notevolmente accelerato la crescita di vari settori di ricerca, consentendo di effettuare esperimenti che in precedenza presentavano notevoli ostacoli, soprattutto da un punto di vista economico.

Di seguito sono descritte le principali applicazioni della tecnologia NGS.

Sequenziamento de-novo: la determinazione della sequenza di un genoma per il quale non si dispone di dati di riferimento. La tecnologia 454 risulta particolarmente indicata in questo caso, perché permette il sequenziamento di reads più lunghe rispetto alle piattaforme SOLiD e Illumina.

Risequenziamento: sequenziare nuovamente un genoma già sequenziato (o una sua specifica porzione) con lo scopo di identificare eventuali difetti genetici. Questa tecnica è applicata con successo allo studio delle patologie umane: le informazioni che si ottengono, non solo possono contribuire alla comprensione dei meccanismi di sviluppo della patologia, ma possono anche fornire informazioni sul trattamento del paziente.

Sequenziamento del trascrittoma (RNAseq): il sequenziamento dell'RNA, a differenza di quello del DNA, permette di sapere cosa sta succedendo "in diretta" all'interno di una cellula. Il DNA è qualcosa di "statico" perché sempre uguale in tutte le cellule, invece, l'RNA "cambia" a seconda del tipo di cellula e della condizione alla quale deve rispondere.

Lo studio del trascrittoma permette di determinare le differenze di espressione di un gene nei vari tessuti, o nello stesso tessuto, in diverse fasi di sviluppo o condizioni e in risposta ai meccanismi di regolazione genetica ed epigenetica.

Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIPseq): metodica che permette di sequenziare le porzioni di DNA alle quali si ancorano proteine ad attività regolativa, in modo da identificare i loro siti di legame e capire cosa succede al variare delle condizioni.

RNA immunoprecipitation sequencing (RIPseq): versione alternativa del ChIPseq, in questo caso si sequenziano le porzioni di RNA alle quali si legano le proteine.

Whole genome bisulfite sequencing (WGBS): tecnica che permette di determinare lo stato di metilazione di un intero genoma. Con il sequenziatore Roche 454 è stato possibile migliorare il sequenziamento tramite bisolfito arrivando ad ottenere fino a 1600 sequenze, contro le 20 generate con i metodi precedenti.

Metagenomica: scienza che si occupa dello studio dei genomi di comunità microbiche direttamente nel loro ambiente naturale, evitando così il problema della coltura delle singole specie su terreni selettivi, in quanto, spesso, si tratta di organismi che non possono essere coltivati o che vivono in condizioni ambientali estreme o che sono patogeni.

Per l'analisi si possono utilizzare due metodiche alternative: il **sequenziamento 16S** o il **sequenziamento shotgun**.

Con il sequenziamento 16S si vanno a prendere in considerazione regioni specifiche del gene 16S. Questo gene contiene regioni conservate, uguali per tutte le specie batteriche, e regioni variabili, specifiche per ogni organismo: le prime rendono possibile il sequenziamento perché possono essere usate per costruire i primer per la PCR, le seconde,

Come abbiamo detto le tecniche di sequenziamento si sono evolute nel tempo, tant'è che è possibile distinguere varie generazioni.

Il sequenziamento di prima generazione comprende il **metodo di Maxam Gilbert** e **metodo di Sanger** che sono stati i primi due metodi ad essere stati approntati ed utilizzati.

Il **metodo Maxam-Gilbert** (Figura 1) permette di determinare la sequenza nucleotidica di una molecola di DNA radiomarcata ad una estremità con ³²P. Il campione di DNA viene denaturato e viene diviso in quattro aliquote uguali: ognuna di queste viene trattata con reagenti chimici che ne causano la metilazione o la rottura in corrispondenza di basi specifiche: in particolare il reagente specifico per le purine è il solfato di dimetile (DMSO), mentre il reagente specifico per le pirimidine è l'idrazina.

invece, rendono possibile distinguere le diverse specie tra loro, confrontando le informazioni ottenute con quelle contenute nelle banche dati.

Se, invece, si vuole sapere come i diversi microrganismi interagiscono tra loro, è necessario sequenziare il loro genoma utilizzando l'approccio shotgun. Questo metodo prevede la frammentazione casuale del campione e il sequenziamento di tutti i genomi presenti. Le reads ottenute vengono poi ricostruite e si associa ad ogni gene la sua funzione per capire poi come interagiscono.

Le applicazioni possibili sono innumerevoli e comprendono la caratterizzazione delle comunità microbiche umane a fini clinici e lo studio di popolazioni microbiche ambientali con lo scopo di identificare eventuali geni utili.

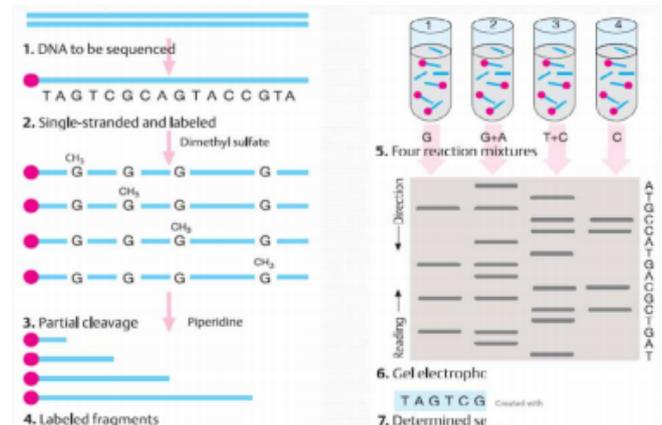
La maggior parte degli studi di metagenomica viene fatta con tecnologia 454 in quanto l'ottenimento di reads più lunghe facilita l'allineamento, o la costruzione de-novo, dei genomi microbici.

In circa 40 anni il sequenziamento genico ha fatto molta strada, e non accenna a volersi fermare.

Presto l'abbattimento dei costi favorirà l'arrivo di questa tecnologia anche nei paesi in via di sviluppo: un esempio che si può già fare è il **Global Virome project**, che mira ad individuare i principali virus trasmissibili all'uomo che, proprio in questi paesi, rappresentano un grave problema.

Inoltre, il **sequenziamento ubiquitario**, in futuro potrebbe diventare una realtà ed entrare nelle case di tutti diventando un importante sistema di monitoraggio della nostra salute. Arriverà il giorno in cui ci presenteremo dal medico con una chiavetta USB contenente i nostri dati genetici e potremo conoscere i farmaci e lo stile di vita più adatti ad ognuno di noi. Non sappiamo quando entreremo nell'era della **medicina** genomica, ma quando quel momento arriverà, il merito sarà anche degli incredibili progressi fatti negli ultimi anni dalla chimica del sequenziamento.

Operando in questo modo si genera una serie di frammenti, che, attraverso un'elettroforesi su gel di



poliacrilammide, vengono separati in base alla dimensione: alla fine della corsa elettroforetica, il gel viene sottoposto ad un'autoradiografia, mostrando un modello a bande, da cui la sequenza può essere letta direttamente.

Il metodo, detto **chimico**, è quindi limitato solo dal potere risolutivo del gel di poliacrilammide.

Il **metodo Sanger** (Figura 2) è considerato il "gold standard" del sequenziamento genico e si basa sull'utilizzo di **nucleotidi modificati** chiamati **dideossitri-fosfato (ddNTPs)**, che devono essere marcati radioattivamente o per fluorescenza: questi si differenziano dai normali nucleotidi per l'assenza del gruppo idrossilico in posizione 3' della molecola.

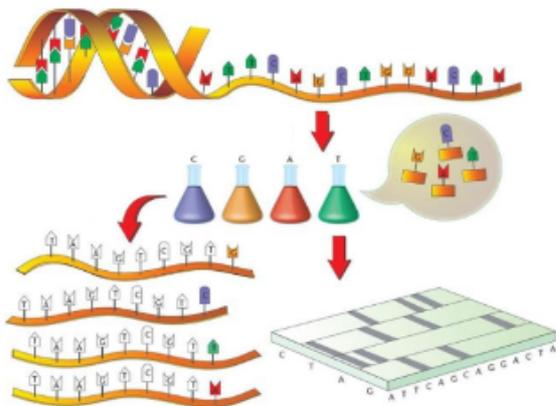


Figura 2. Schema del metodo Sanger

Il **metodo**, detto **enzimatico** perché richiede l'utilizzo dell'enzima DNA polimerasi,

interferisce con il processo di polimerizzazione durante la replicazione del DNA, poiché la modifica chimica e strutturale dei ddNTPs impedisce che un altro nucleotide si leghi ad essi, provocando l'interruzione della reazione di sintesi nel processo di replicazione del DNA. Il campione di DNA a singolo filamento da sequenziare viene diviso in quattro reazioni separate, in cui una DNA polimerasi opera incorporando i normali deossiribonucleotidi (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). A ciascuna di queste reazioni viene poi aggiunto solo uno dei quattro dideossinucleotidi (**ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP**) in piccole quantità e questo causa un blocco della polimerasi e dell'allungamento del filamento in sintesi.

Il risultato è una serie di frammenti di DNA, di lunghezza diversa, interrotti in corrispondenza di ogni ddNTP (in base a quello introdotto nella singola reazione). Questi frammenti, anche in questo caso, vengono separati attraverso un'elettroforesi su gel di poliacrilammide, successivamente sottoposto ad un'autoradiografia che evidenzia i nucleotidi marcati: la sequenza è, così, facilmente leggibile.

Con l'avanzare degli anni si è passati al sequenziamento di seconda generazione o **NGS (Next-Generation Sequencing)**, che ha permesso una riduzione dei costi e del tempo di analisi: con il

termine NGS (o "sequenziamento in parallelo") si indicano una serie di tecnologie che permettono di sequenziare genomi di grandi dimensioni in un tempo ridotto, grazie alla capacità di sequenziare in parallelo milioni di frammenti di DNA. Le tecniche di NGS permettono di sequenziare il DNA genomico (intero genoma, esoma, ampliconi), il trascrittoma (RNA totale, mRNA) e l'epigenoma, ma trovano applicazione anche nella **metagenomica**, ovvero lo studio del microbioma con tecniche che si basano sul **sequenziamento e l'isolamento del DNA** di tutta una comunità microbica.

Le strategie di analisi sono due, ovvero il **targeted sequencing** e lo **shotgun sequencing**. Il **metodo targeted sequencing** prevede l'amplificazione e il sequenziamento di una sequenza genetica target (solitamente per lo studio microbiologico, le sequenze studiate sono le porzioni variabili del 16S ribosomiale), mentre il **metodo shotgun sequencing** prevede che tutto il DNA venga frammentato e sequenziato.

I vari metodi di sequenziamento NGS sono un po' diversi, ma si basano su fondamenta comuni, come la frammentazione del DNA da analizzare, al fine di ottenere delle sequenze di lunghezza compatibile col range di sequenziamento della macchina utilizzata, creando così delle library. A questi frammenti vengono aggiunti, mediante ligasi, degli **adattatori**, ovvero delle piccole sequenze aggiuntive, che serviranno ad ancorare i frammenti sul supporto su cui poi avverrà l'amplificazione e il sequenziamento. In seguito, appunto, viene eseguita un'amplificazione, per ottenere numerose copie di ogni singolo frammento di DNA, generando dei **cluster**, e infine il vero e proprio sequenziamento.

I sistemi di sequenziamento adoperati sono molteplici, ognuno sviluppato da un'azienda differente, e tra questi i più importanti sono:

- **Roche 454 System**
- **Illumina System**
- **Applied Biosystem SOLiD**

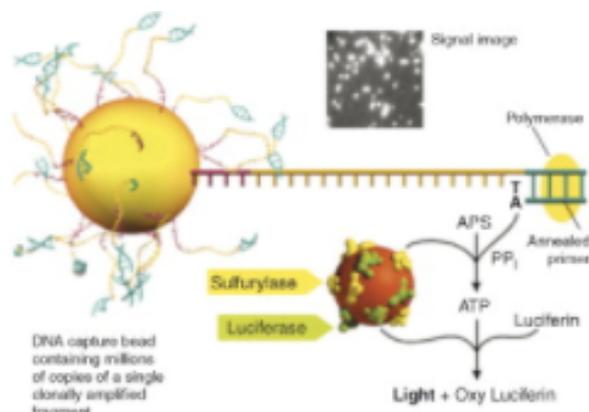


Figura 3. Schematizzazione della tecnologia 454. Nella **tecnologia Roche 454** (Figura 3), dopo la creazione delle library e l'incorporazione degli adatta-

tori, le singole molecole di DNA vengono denaturate e ibridate a singole **microsfere (o biglie)** rivestite da sequenze complementari a quelle degli adattatori: i frammenti di DNA, quindi, ricoprono le biglie e queste vengono catturate in goccioline di emulsione acqua-olio, nelle quali avviene la reazione di amplificazione. Vengono poi depositate nei pozzetti di una piastra "picotiter" per iniziare la fase di sequenziamento, che necessita di un primer di innesco e soluzioni contenenti i singoli dNTP. Il sequenziamento si basa sulla rilevazione del pirofosfato rilasciato dall'incorporazione di ogni dNTP durante la reazione di polimerizzazione: questo porta alla genesi di una luce visibile (che sarà proporzionale al numero di basi incorporate). Il segnale luminoso derivante da ciascun pozzetto viene elaborato per produrre una sequenza lineare.

Lo svantaggio di questa metodica sta nel fatto che compie degli errori in corrispondenza delle regioni omopolimeriche.

Nella **tecnologia Illumina** (Figura 4) la reazione di sequenziamento avviene su una **flow cell (cella di flusso)**: si tratta di una sorta di vetrino con 8 canali, sulla cui superficie sono legati dei primer e delle sonde complementari agli adattatori legati ai frammenti di DNA da sequenziare.

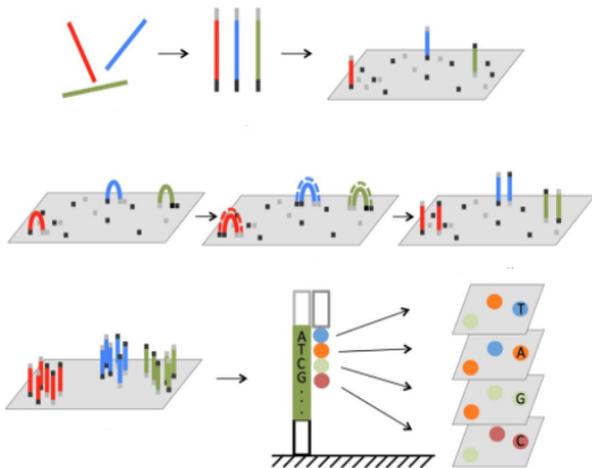


Figura 4. Schematizzazione della tecnologia Illumina

Il primo passo, quindi, è quello di creare le solite library e aggiungere ad ogni singolo frammento gli adattatori, che permettono l'ancoraggio alla flow cell. L'amplificazione, in questo caso, è un'amplificazione "a ponte", detta **bridge PCR**: i filamenti di DNA immobilizzati si "inarcano" e si appaiano con un primer adiacente, formando la tipica struttura a ponte. Ripetendo l'amplificazione per più volte otteniamo i cluster di circa 1000 molecole clonali (dette **ampliconi**).

Ogni cluster viene denaturato e viene fatto un lavaggio per eliminare i filamenti antisenso e mantenere solo i filamenti senso (forward). A questo punto inizia il sequenziamento di questi filamenti forward, ovvero un **sequenziamento mediante sin-**

tesi (SBS), che prevede un'idridazione con un primer complementare alle sequenze dell'adattatore, seguita dall'aggiunta di DNA polimerasi e di una miscela con i quattro ddNTP, ognuno legato ad un fluoroforo e ad un gruppo bloccante removibile.

Quando un ddNTP viene incorporato, il laser eccita il fluoroforo e permette di identificare la base incorporata, dopodiché un lavaggio rimuove il fluoroforo e il terminatore, permettendo l'inizio del ciclo successivo, in cui vengono rimesse tutte le basi e viene fatta nuovamente la lettura. Infine, un software registra le diverse emissioni di fluorescenza e le converte nella sequenza nucleotidica corrispondente.

Nella **tecnologia AppliedBiosystem SOLiD** (Figura 5), come nella tecnologia 454, i frammenti delle library vengono immobilizzati su biglie, fissate su un supporto di vetro privo di pozzetti, e clonati mediante una PCR in emulsione. La reazione di sequenziamento avviene grazie ad una DNA ligasi: ogni ciclo di sequenziamento necessita di un primer, una ligasi e quattro sonde dNTP, composte da otto basi, di cui due basi fissate e sei degeneri (cioè incapaci di appaiarsi a qualsiasi base della sequenza stampo), e da un marcatore fluorescente terminale; le ultime tre basi degeneri sono rimovibili.

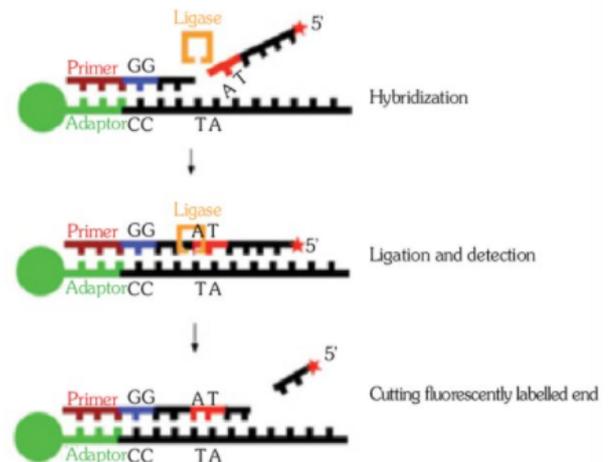


Figura 5. Schematizzazione della tecnologia AppliedBiosystem SOLiD

Una volta che la sonda si è appaiata alla sequenza stampo, si ha un'emissione di fluorescenza e, contemporaneamente, viene rotto il legame tra le basi generi 5 e 6, lasciando libera l'estremità 5' della quinta base della sonda e permettendo il legame con la successiva sonda. L'emissione luminosa è rilevata dalla strumentazione in modo da identificare il colore associato alla coppia delle prime due basi; dopo 5 cicli, la sequenza del frammento può essere dedotta.

A fine sequenziamento, lo strumento restituisce un file FASTQ, ovvero un formato di testo che include sia le sequenze che la qualità di ogni base: l'esi-

stenza dei **quality scores** è fondamentale in quanto permettono di escludere sequenze o eliminare

basi con una bassa qualità, per migliorare l'accuratezza dell'allineamento.

APPLICAZIONI IN MICROBIOLOGIA

Identificazione dei batteri

Una rapida e attendibile identificazione batterica è l'obiettivo principale della diagnostica microbiologica; da questo dipende la qualità della gestione clinica dei pazienti. Infatti, i metodi convenzionali, ovvero i metodi colturali e biochimici, hanno dei limiti nell'identificazione dei microrganismi; ad esempio, non possono essere applicati ai microrganismi che non hanno la capacità di crescere in coltura. Il sequenziamento genico può essere utilizzato per l'identificazione di diverse tipologie di microrganismi:

- Enterobatteri, come *Escherichia coli*
- Stafilococchi coagulasi negativi, come *Staphylococcus aureus*
- Streptococchi ed enterococchi
- *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*
- *Mycobacterium tuberculosis* e altri micobatteri
- *Chlamydia trachomatis*

I primi metodi che hanno permesso il sequenziamento degli acidi nucleici e le tecniche di Next Generation Sequencing, o NGS, sono risultate essere fondamentali per lo studio delle comunità microbiche, permettendo di comprenderne meglio la composizione e le proprietà funzionali. Nel 1995 è avvenuto il primo sequenziamento del genoma del batterio *Haemophilus influenzae*, un coccobacillo Gram negativo patogeno per l'uomo (figura 6). Il suo genoma è composto da 1.830.137 coppie di basi e da circa 1.743 geni. Sono state indicate anche le localizzazioni dei siti di riconoscimento per gli enzimi di restrizione Not I, Rsr II e Sma I.

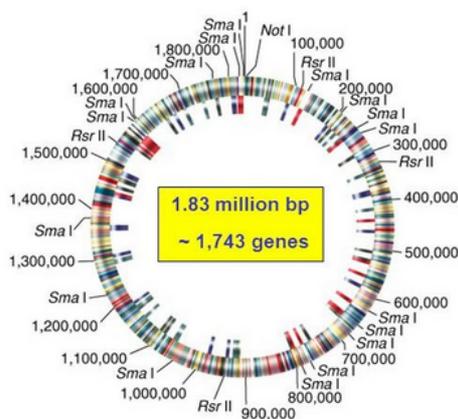


Figura 6. Genoma sequenziato di *Haemophilus influenzae*.

Successivamente alla pubblicazione dell'articolo relativo al sequenziamento del genoma di *Haemophilus influenzae* su Science, sono stati sequenziati altri genomi batterici, virali, archei ed eucariotici. Ad oggi, sono stati sequenziati i genomi di 276.022 batteri, 2.923 archei e 8.937 virus.

L'aumento esponenziale del numero di microrganismi di cui è stato sequenziato il genoma è il risultato di un'evoluzione delle tecnologie di robotizzazione che hanno permesso la riduzione dei tempi e dei costi dei metodi di sequenziamento. L'avvento del sequenziamento dell'intero genoma di *Haemophilus influenzae* ha dato l'avvio ad una rivoluzione nei campi della biologia molecolare e della genetica: oggi è possibile, infatti, osservare ed esaminare l'insieme dei geni e della componente non codificante del materiale genetico di una cellula. Grazie alla genomica, si possono quindi stabilire le interazioni tra le porzioni codificanti e le porzioni non codificanti del genoma, anch'esse importanti nella regolazione dell'espressione genica. L'insieme dei trascritti e delle proteine possono essere studiati ed esaminati nella loro completezza grazie alle scienze omiche che comprendono la trascrittomica, la proteomica e la metabolomica; queste scienze forniscono un punto di vista alternativo alla genetica classica che rende ancora più affascinante lo studio della biologia dei microrganismi.

Trascrittomica

Per comprendere in modo più completo il funzionamento di una cellula batterica è necessario raccogliere più informazioni possibili sui geni presenti studiandone l'espressione genica e la funzione del prodotto genico finale. In biologia, l'insieme completo degli RNA prodotti prende il nome di trascrittoma. La trascrittomica, quindi, è una scienza basata sullo studio della trascrizione che viene effettuato monitorando l'RNA totale generato in determinate condizioni di crescita. I principali approcci utilizzati sono il microarray che si basa sull'ibridazione RNA-DNA e l'RNA-Seq che dipende dal sequenziamento di seconda generazione.

I **microarray** sono piccoli supporti solidi ai quali geni o segmenti di geni sono fissati e distribuiti in maniera parziale secondo uno schema noto; spesso vengono anche chiamati chip genici. La tecnologia dei microarray richiede l'ibridazione RNA-DNA. Quando il DNA viene denaturato, i filamenti singoli possono formare molecole ibride a doppio filamento con altre molecole di RNA o DNA a singolo filamento. L'ibridazione degli acidi nucleici è un processo che viene ampiamente utilizzato nella rilevazione, caratterizzazione e identificazione dei segmenti di DNA. I segmenti degli acidi nucleici che vengono utilizzati per l'ibridazione sono delle sonde radioattive o marcate con coloranti fluorescenti per permetterne la rilevazione. I mi-

croarray possono essere utilizzati per identificare in maniera specifica i microrganismi. L'array, infatti, contiene un gruppo di sequenze di DNA specifiche per ciascun microrganismo. Questo tipo di approccio può essere utilizzato, ad esempio, per distinguere specie batteriche differenti oppure ceppi della stessa specie strettamente correlati. Questo permette una rapida identificazione dei batteri patogeni presenti in campioni clinici.

L'analisi **RNA-Seq** è un metodo che permette di sequenziare tutte le molecole di RNA di una cellula e rileverà non solo quali geni sono stati trascritti, ma anche come si sono generate molte copie di ciascun RNA. La RNA-Seq è utilizzata sia per misurare l'espressione dell'mRNA sia per identificare e caratterizzare i piccoli RNA non codificanti. Questa metodica sta cominciando a superare i microarray nel campo degli studi globali sull'espressione genica.

Proteomica

Lo studio a livello genomico di struttura, regolazione, funzione e attività delle proteine in un organismo è chiamato proteomica. Il proteoma fa riferimento a tutte le proteine codificate dal genoma di un organismo, ma può indicare anche le proteine presenti nella cellula in un dato momento. Il principale approccio alla proteomica ha avuto inizio con lo sviluppo dell'elettroforesi in gel di poliacrilamide bi-dimensionale; questa tecnica permette di separare, identificare e misurare tutte le proteine presenti in un campione cellulare.

Dato che la proteomica richiede spesso una fase sperimentale intensa, sono accorse in aiuto degli operatori le tecniche computazionali. Dopo aver ottenuto la sequenza del genoma di un organismo, possiamo confrontarla con quella di un altro organismo con lo scopo di trovare geni il più simili possibile a quelli già noti. A questo proposito, la sequenza più importante da utilizzare è quella amminoacidica della proteina codificata.

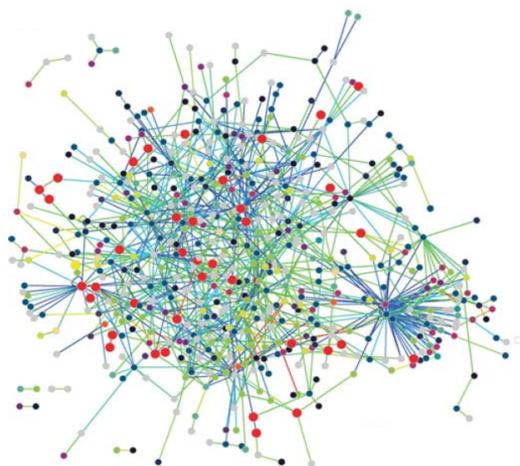


Figura 7. Interattoma

Per analogia con i termini "genoma" e "proteoma", l'interattoma è definito come l'insieme completo delle interazioni tra le macromolecole all'interno di

una cellula. I dati di interattoma sono rappresentati in diagrammi a rete dove il nodo rappresenta una proteina e le linee rappresentano le interazioni (figura 7). Gli interattomi possono apparire molto complessi nella loro lettura, per questo motivo sono di maggiore utilità gli interattomi limitati che studiano una determinata tipologia proteica.

Metabolomica

La metabolomica è l'insieme completo degli intermedi metabolici e delle altre piccole molecole prodotte in un organismo. I primi tentativi di identificazione sono stati realizzati con le analisi di risonanza magnetica nucleare, ma questo metodo si è rivelato essere poco sensibile. L'approccio più promettente alla metabolomica si basa sull'utilizzo di varianti recenti della spettrometria di massa, come il MALDI-TOF.

La spettrometria di massa, usando risoluzioni di massa molto elevate, permette di determinare la corretta formula molecolare di ogni molecola. Questo approccio può essere utilizzato anche per identificare i frammenti peptidici derivati dalla digestione di una proteina durante l'analisi proteomica. In questo modo, l'identificazione di molti oligopeptidi permette di dedurre l'identità della proteina correlata nel caso in cui fossimo a conoscenza della sua sequenza amminoacidica. Nella versione MALDI della spettrometria di massa, il campione è vaporizzato e ionizzato da un laser; si generano così degli ioni che vengono accelerati lungo la colonna verso il rivelatore mediante un campo elettrico. Il tempo di volo (indicato come TOF) di ciascuno ione dipende dal suo rapporto massa/carica. Il rivelatore misura il TOF di ciascuno ione e il computer calcola la massa e così la formula molecolare. La combinazione di queste due metodiche è nota come MALDI-TOF.

Il termine "biologia dei sistemi" è stato utilizzato negli ultimi anni per indicare l'integrazione di diversi campi di ricerca allo scopo di fornire una visione globale di un organismo o di una cellula. La biologia dei sistemi integra la genomica, la trascrittomica, la proteomica e la metabolomica e ha lo scopo di compilare una serie di dati per costruire un modello di calcolo del sistema di interesse. Questi modelli possono consentire di prevedere il comportamento o le proprietà di un particolare organismo non rilevabili dalle osservazioni iniziali.

SEQUENZIAMENTO DEI VIRUS (CON PARTICOLARI RIFERIMENTO AL COVID-19)

La genetica virale studia il genoma virale e le sue modalità di evoluzione. Essa è utile in molti settori di studio e applicativi quali patogenesi, sviluppo di vaccini, farmacoresistenza, nuovi virus emergenti.

I virus sono entità biologiche piuttosto semplici, si comportano come i parassiti, ovvero hanno bisogno di un altro organismo per moltiplicarsi e prosperare. Le modalità di sviluppo e di trasmissione

dei virus variano molto a seconda delle specie, ma, in linea di massima, essi si intrufolano nelle cellule dell'ospite ingannando le difese delle loro membrane, e successivamente iniettano il loro codice genetico per modificare il comportamento della cellula e sfruttarla per replicarsi.

La presenza del virus innesca una risposta immunitaria da parte dell'organismo infettato, che di solito consente di eliminarlo. Il sistema immunitario serba poi memoria dell'incontro, in modo da impedire al virus di fare nuovamente danni; i vaccini consentono di acquisire questa memoria senza che ci si debba ammalare. Alcuni virus sono però più pericolosi di altri e riescono a causare infezioni croniche, come avviene per esempio con l'HIV.

I virus sono entità soggette a grande variabilità, la variante più frequente in natura è il virus "selvaggio" (wild type) mentre le varianti che differiscono dal wild type sono mutanti.

Per la maggior parte delle specie virali si possono individuare diverse linee evolutive che determinano diversi genotipi/sottotipi, i quali possono avere differenti proprietà, ad esempio per quanto riguarda la patogenicità HIV-1 è più patogeno di HIV-2 o per quanto riguarda la sensibilità HCV-1 è meno sensibile di HCV-2.

Un virus omogeneo può essere perfettamente adatto a replicare nella condizione standard (wild type). Se la condizione cambia (es. aggiunta di un farmaco), quel virus può soccombere rapidamente. La condizione di quasi specie garantisce che all'interno della popolazione virale ci sia o possa facilmente evolvere una variante adatta ad ogni nuova condizione.

I cambiamenti genetici nei virus dovuti a Mutazioni o Ricombinazioni determinano la comparsa di nuove varianti come nel caso di HBV, HIV, HCV.

Tra le Mutanti possiamo trovare:

- mutanti più virulenti, che hanno acquisito maggiore virulenza per l'uomo, possono produrre malattia di maggiore entità o infettare distretti di solito non interessati (es. ceppi influenzali neurotropi)
- Mutanti attenuati con minore patogenicità ma buona antigenicità (usati per vaccini)
- Mutanti farmacoresistenti che sono meno sensibili ai farmaci antivirali, creano problemi di trattamento anche se possono essere meno virulenti del virus originario (es. HIV, HBV).
- A causa dei cambiamenti genetici nei virus ecco allora insorgere le cosiddette varianti. Occasionalmente un virus può evolvere in una variante che diviene capace di infettare una nuova specie; se il nuovo ospite è l'uomo si definisce zoonosi e si va incontro a due possibili scenari:
- Contagio da uomo a uomo non efficiente (casi sporadici ma nessuna epidemia)
- Contagio da uomo a uomo efficiente (Possibile focolaio epidemico; ne sono esempi il virus HIV e Sars-CoV-2).

Il sequenziamento di virus come Sars-CoV-2, HIV, HBV, e HCV, ci hanno permesso di identificare e diagnosticare le malattie causate da questi microrganismi e sviluppare nuovi trattamenti sempre più mirati e personalizzati.

L'ormai celeberrimo [tampone](#), il test con cui si raccoglie il campione di muco nasale in cui eventualmente individuare il virus Sars-Cov-2, è seguito da un esame di sequenziamento. L'esame, infatti, si basa sull'identificazione di specifiche sequenze del genoma a RNA del virus che viene sequenziato partendo da DNA a esso complementare.

SARS-CoV-2 appartiene al genere *Betacoronavirus*, di cui fanno parte anche i virus SARS-CoV e MERS-CoV. Con un genoma di oltre 29.000 basi è uno dei virus a RNA con il genoma più lungo e complesso, in grado di evolvere sia attraverso la comparsa di mutazioni che mediante eventi di ricombinazione genetica.

La conoscenza del coronavirus inizia da quella del suo genoma. Questo è composto da 30 mila basi azotate, adenina (A), guanina (G), citosina (C) e timina (T), che racchiudono informazioni importanti sull'origine del virus, sulla codifica di proteine, come la spike, la chiave di entrata nell'organismo umano, o altri componenti del virus, o ancora sul meccanismo di azione di Sars-Cov2.

Una volta eseguito il sequenziamento i ricercatori trascrivono questa lunga sequenza, per poterla analizzare e confrontare. In tal modo si sono accorti che non tutte le sequenze del Sars-Cov2 in giro per il mondo sono uguali, ma presentano differenze di lettere lungo la sequenza, mutazioni che possono influenzare il comportamento del nuovo coronavirus e che è importante conoscere.

Le piccole differenze osservabili nei diversi ceppi del SARS-CoV 2 sono tipiche dei virus a RNA, che cambiano molto facilmente nel passaggio da un soggetto all'altro, e sono utili per tracciare dinamiche geografiche e comprendere eventuali connessioni epidemiologiche.

Il sequenziamento del virus permette inoltre di poter dare delle risposte alle numerose domande, per esempio perché alcune persone hanno mostrato pochi o nessun sintomo al contrario di altre, o perché ci sono state così tante differenze a livello clinico. Il sequenziamento genico è utile sia per il tracciamento del virus, per capire come si sia diffuso e da dove provengono i ceppi virali, ma anche per capire come stia evolvendo, se c'è un rapporto tra i pazienti che hanno avuto una carica virale altissima e gli asintomatici nei quali invece è bassissima e se tra questi casi esiste una differenza di ceppi. Non sappiamo, ad esempio, quanto muta un dato ceppo con il passare del tempo e se nelle persone rimaste infette per oltre un mese il ceppo è lo stesso o è cambiato.

Una risposta potrebbe appunto arrivare dall'analisi integrata di sequenze virali e umane di pazienti

asintomatici e sintomatici, per capire perché alcuni pazienti si ammalano di più e altri di meno. In questo modo potremmo assegnare alla variabilità della risposta al Sars-Cov2 una base genetica. In fin dei conti la pandemia è partita proprio da una mutazione delle proteine spike che ha dato al virus la capacità di entrare nell'organismo umano. Mutazioni in altre parti del genoma possono conferire al virus la capacità di aggredire il sistema vascolare o un altro organo. Per questo studiare il Sars-Cov2 senza conoscerne la sequenza genomica è come voler riparare la macchina senza conoscere come funziona il motore.

Il test che è attualmente sembra essere il "gold standard" per identificare la presenza di una variante in un tampone positivo è il sequenziamento genetico basato sul metodo Sanger in riferimento alla tecnica classica basata sulla moltiplicazione delle copie del virus per mezzo della tecnica della Reazione a catena della polimerasi (PCR) e che permette di identificare le mutazioni già descritte nella variante, o anche nuove mutazioni.

Il test è raccomandato dal ministero della Salute nel caso dei tamponi positivi nei quali si sospetti la presenza di una variante, quindi per esempio nel caso in cui avvenga un'infezione anche dopo la vaccinazione.

Tuttavia, è possibile rilevare le mutazioni amplificando regioni parziali del gene con metodo PCR associato ad analisi melting. Questo metodo permetterà di fare test con un costo 5-10 volte inferiore in sole due ore circa utilizzando nella maggior parte dei casi la stessa strumentazione che i laboratori utilizzano attualmente per i tamponi molecolari mediante PCR, di fatto si tratta di una semplice PCR associata all'analisi della curva di melting, ossia alla fine del processo di amplificazione una curva permette di vedere le mutazioni che cadono nel frammento genetico della proteina Spike, quella che il virus utilizza per agganciarsi alle cellule umane. I tamponi molecolari classici che analizzavano la proteina Spike sono nel frattempo stati aboliti perché avrebbero potuto non vedere le varianti.

IonAmpliSeq SARS-COV-2 è un kit che sfrutta metodi di ultima generazione resi possibili dai sequenziatori ad alta processività per analizzare il virus a partire direttamente dai campioni clinici, ci permette di esplorare così la variabilità intrinseca del genoma virale. La capacità di eseguire rapidamente il sequenziamento di più campioni clinici e di decifrare accuratamente i cambiamenti chiave nel codice genetico del virus è cruciale per conoscere meglio il SARS-CoV-2 e sviluppare strategie per combatterlo. Grazie all'elevato potere di risoluzione realizzato con questo tipo di sequenziamento NGS, siamo in grado di analizzare la presenza di varianti anche minoritarie che si generano nel cor-

so della replicazione virale. Questo in genere non è possibile con altri approcci di sequenziamento massivo (es. shotgun), poiché la copertura lungo il genoma non è uniforme ed è richiesta una carica virale molto alta per ottenere un sequenziamento completo ed informativo. Oltre a ricostruire per ciascun campione la sequenza completa del genoma virale, usando questo approccio è stato possibile visualizzare in ciascun campione clinico la presenza di genomi che presentavano posizioni variare rispetto al genoma dominante. Questa osservazione ha fornito la prova che il virus si comporta come altri virus a RNA, sviluppando una quasi specie all'interno di ciascun individuo infetto.

I dati suggeriscono che, pur presentando la capacità di variare grazie al suo enzima replicativo che non è perfettamente fedele, in generale il genoma del virus è stabile, il che aumenta la probabilità che i futuri vaccini possano avere un tasso di efficacia più elevato. Le sequenze ottenute rapidamente e la loro condivisione con la comunità scientifica sono fondamentali per comprendere meglio l'epidemiologia e la diffusione di COVID-19. Questi risultati pongono le basi per lo studio delle quasispecie virali e della plasticità del genoma e forniranno indizi sulla dinamica virale e l'emergenza di varianti che possono avere un impatto patogenetico.

La disponibilità tempestiva delle sequenze è cruciale durante gli eventi epidemici: più numerose sono le sequenze complete del virus, meglio si riesce a tracciarne la traiettoria evolutiva del virus, individuare possibili varianti più patogene, monitorare costantemente l'affidabilità dei metodi diagnostici, identificare i target per un potenziale vaccino, e tracciare le catene di trasmissione. Inoltre, una volta stabiliti i farmaci ad azione antivirale diretta, il sequenziamento sarà fondamentale per monitorare la comparsa e la diffusione delle mutazioni di resistenza alle terapie antivirali. Sotto questo aspetto, la possibilità di effettuare sequenziamento genomico completo su larga scala renderà ancora più attivo il contributo italiano al database internazionale GISAID e ad altre piattaforme di condivisione delle sequenze genomiche del virus. I prossimi passi saranno continuare a sequenziare più campioni, determinare il significato biologico delle varianti geniche e studiare il percorso evolutivo del coronavirus. Questi dati preliminari necessitano ovviamente di conferme e ulteriore analisi, ma pongono le basi per una migliore comprensione di questo nuovo virus che costituisce una seria minaccia per l'umanità. Una sempre migliore conoscenza di questo virus è alla base di ogni decisione sia dal punto di vista clinico che epidemiologico; è decisivo quindi che ricercatori abbiano a disposizione strumenti sempre più accurati per capire meglio il comportamento di questo patogeno e cercare di anticiparne la traiettoria evolutiva.

IL CONTROLLO MICROBIOLOGICO AMBIENTALE

La sanificazione ambientale e la verifica della corretta applicazione della stessa ha un ruolo di rilievo nella prevenzione e controllo delle infezioni correlate alle pratiche assistenziali. Infatti, l'obiettivo del processo di sanificazione è quello di ottenere un ambiente, che non rappresenti probabile fonte di rischio di contrarre patologie per i fruitori dell'assistenza sanitaria. Il monitoraggio microbiologico ambientale, soprattutto delle aree a elevato rischio, rappresenta un utile strumento per verificare la corretta applicazione delle procedure di sanificazione degli ambienti. In questo report viene approfondita la questione legata al monitoraggio di tre matrici ambientali: acqua, aria e superfici di contatto, con una particolare attenzione ad una strumentazione medica di uso routinario: l'endoscopia.

Controllo microbiologico dell'acqua e dei fluidi dialitici

La dialisi è una terapia alquanto recente, divenuta di uso comune solo negli anni '60 del Novecento. Questa procedura interviene nei casi di insufficienza renale più gravi, quando ormai i nostri reni non riescono ad adempiere ai loro compiti in misura sufficiente, più precisamente quando la funzionalità è compromessa per circa l'85-90%. La dialisi è una terapia che sostituisce l'intervento dei reni ormai danneggiati, per compiere l'azione di filtraggio e rimozione dei liquidi in eccesso e delle tossine presenti nel sangue.

Esistono due tipologie di dialisi, l'**emodialisi** e la **dialisi peritoneale**. L'emodialisi è, come suggerisce il nome, una modalità di esecuzione della dialisi che coinvolge il sangue in modo diretto. Nello specifico, tramite l'impiego di uno strumento chiamato dializzatore, il sangue in circolo nel nostro organismo viene prelevato, fatto confluire all'interno di questo macchinario, passato attraverso un filtro contenente un liquido chiamato dialisato, per poi farlo ritornare, ormai depurato, nel corpo del paziente malato.

La diagnosi peritoneale, invece, si avvale dell'azione di filtraggio del peritoneo, che avvolge gli organi interni della cavità addominale. La membrana peritoneale è molto ricca di vasi sanguigni e capillari e presenta anche dei pori molto fini, perfetti per l'azione di filtraggio altrimenti svolta dai reni. Quindi, si pratica un'incisione nell'addome, si inserisce un piccolo catetere, e tramite esso si fa confluire nella membrana peritoneale il liquido dialisato, composto di sale e glucosio. Questo liquido, a contatto con la membrana, cattura le scorie, dopodiché lo si fa fuoriuscire e viene raccolto in un'altra sacca.

L'acqua potabile utilizzata per il consumo umano non può essere utilizzata per la preparazione del liquido di dialisi, ma deve essere sottoposta ad un processo di purificazione. Questo trattamento dipenderà da diversi fattori, tra cui la qualità dell'acqua fornita dalla rete di approvvigionamento pubblica e il grado di purezza dell'acqua e del liquido di dialisi (LD) che si vuole ottenere.

I controlli microbiologici dell'acqua e del liquido di dialisi devono essere effettuati settimanalmente durante i primi 2 mesi di avviamento dell'unità di emodialisi (fase di validazione), dopo un'importante riparazione del sistema di trattamento delle acque o dopo la rilevazione di livelli elevati di contaminazione. Durante il normale funzionamento dell'unità di emodialisi o durante la fase di manutenzione, saranno effettuati almeno mensilmente.

Il campione di acqua e di liquido di dialisi deve essere raccolto in un contenitore sterile seguendo il consueto sistema di campionamento microbiologico: asepsi, etichettatura, ecc. Inoltre, per il rilevamento delle endotossine è essenziale che il contenitore sterile sia privo di pirogeni e senza capacità di adsorbimento per le endotossine. Una volta raccolto, il campione deve essere inviato immediatamente alla microbiologia per l'elaborazione, garantendo così che si ottengano risultati accurati e affidabili. Se ciò non è possibile, il campione deve essere refrigerato a 4°C (tra 3-6 °C) per un massimo di 24 ore fino a quando non viene eseguita la coltura. Per il rilevamento delle endotossine, i campioni devono essere processati il prima possibile o conservati congelati a -20 °C.

Elaborazione del campione

Coltura

La maggior parte dei microrganismi rilevati nell'acqua di dialisi sono bastoncelli gram-negativi non fermentanti il glucosio, in particolare i generi *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Ralstonia*, *Agrobacter* e *Moraxella*. Meno frequentemente vengono rilevati bacilli gram-positivi, come *Corynebacterium* ed enterococchi. I funghi non sono rari nell'acqua di dialisi, sebbene il loro numero sia inferiore a quello dei batteri. I funghi più frequentemente isolati sono la *Candida parapsilosis* e i funghi filamentosi dematiacei.

La **conta batterica** vitale è una delle tecniche più utilizzate per verificare la qualità dell'acqua e del liquido di dialisi. Il numero di batteri vitali in grado di riprodursi è determinato piastrando una quantità nota di acqua e di liquido di dialisi in un mezzo di coltura solido e contando il numero di colonie visibili. Il numero di colonie è espresso come unità formanti colonie (CFU) e dipende dal volume del liquido inoculato, dalla composizione del terreno di coltura utilizzato, dalla temperatura e dal tempo di incubazione. I due terreni di coltura consigliati sono **TSA (Tryptic Soy Agar)** e **R2A (Reasoner's 2-Agar)**. Il terreno TSA è il terreno di riferimento raccomandato dai più antichi standard per gli studi di quantificazione batterica in acqua e in LD. Il terre-

no R2A è un agar povero di nutrienti di gran lunga superiore nella sua capacità di rilevare i microrganismi. Questo terreno, incubato a temperatura ambiente per 14 giorni rileva un numero maggiore di CFU rispetto al terreno più ricco incubato a qualsiasi temperatura. L'agar sangue non è raccomandato, sebbene ci siano studi che suggeriscono una performance simile a quella di TSA. Attualmente è raccomandato l'uso del terreno TSA con un'incubazione di 48 ore a 37°C e del mezzo R2A con un'incubazione di 5-10 giorni a 20-25 ° C in aerobiosi.

Il conteggio del numero di colonie può essere effettuato con il metodo della **filtrazione su membrana**:

- Filtrazione del campione attraverso membrane di cellulosa dotate di micropori (0,2-0,4 µm)
- I microrganismi presenti nel campione rimangono sulla superficie della membrana
- Deposizione della membrana sulla superficie di una piastra Petri con terreno sterile
- Incubazione in termostato
- Le sostanze nutritive del terreno salgono per capillarità attraverso la membrana, sulla cui superficie si sviluppano le colonie
- L'obiettivo è rilevare se sono presenti microrganismi a concentrazioni superiori a 0,1 CFU / ml, per cui è necessario filtrare una quantità da 100 a 1000 ml.

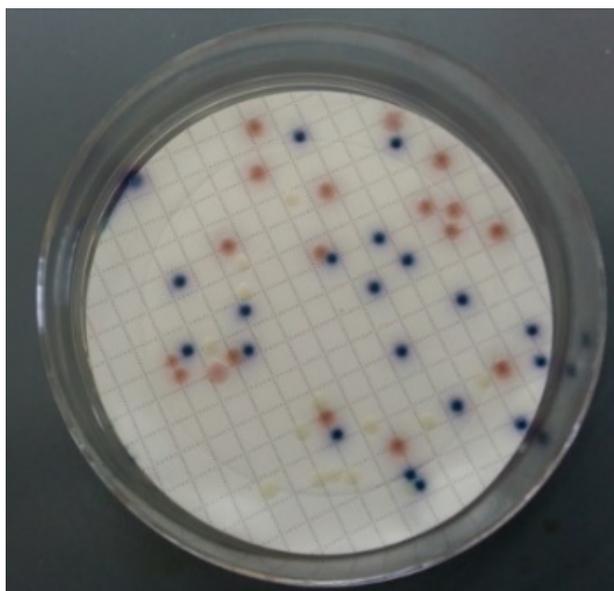
Non sono stabiliti i limiti di contaminazione specifici per i funghi, ma può essere utilizzato un terreno di coltura specifico per i funghi (**Sabouraud**, 20-25 ° C) e, arbitrariamente, il conteggio massimo tollerabile è stato fissato a una quantità 10 volte inferiore a quello dei batteri.

Rilevazione di endotossine

Le **endotossine** sono molecole complesse che si trovano sulla membrana esterna dei batteri gram-negativi e sono costituite principalmente da **lipopolisaccaridi** (LPS). Il LPS contiene una parte lipidica (lipide A) responsabile dei meccanismi di tossicità. Le endotossine vengono rilasciate durante la divisione batterica, la lisi o la morte delle cellule, e sono stabili al calore, quindi possono accumularsi e rimanere nell'ambiente per lunghi periodi. La rilevazione delle endotossine deve essere effettuata nel controllo microbiologico della qualità dell'acqua e del liquido di dialisi per la loro capacità di sviluppare una reazione febbrile nel paziente accompagnata da mal di testa, malessere, mialgia, nausea, vomito e ipotensione. I batteri non attraversano la membrana di dialisi, quindi non entreranno nel sangue del paziente dal liquido di dialisi, tuttavia, le endotossine hanno la capacità di attraversare questa membrana e possono anche provocare una situazione infiammatoria cronica, con una varietà di manifestazioni cliniche.

La rilevazione e quantificazione delle endotossine nell'acqua depurata e nel liquido di dialisi sarà effettuata mediante analisi del **lisato di amebociti di Limulus (LAL)**. Si tratta di un estratto acquoso proveniente dagli amebociti del *Limulus polyphemus* avente la caratteristica di reagire con le endotossine presenti nelle membrane dei batteri Gram-negativi, coagulandosi. Questa sua proprietà viene sfruttata per svolgere il LAL test. L'analisi LAL può essere eseguita utilizzando diversi metodi:

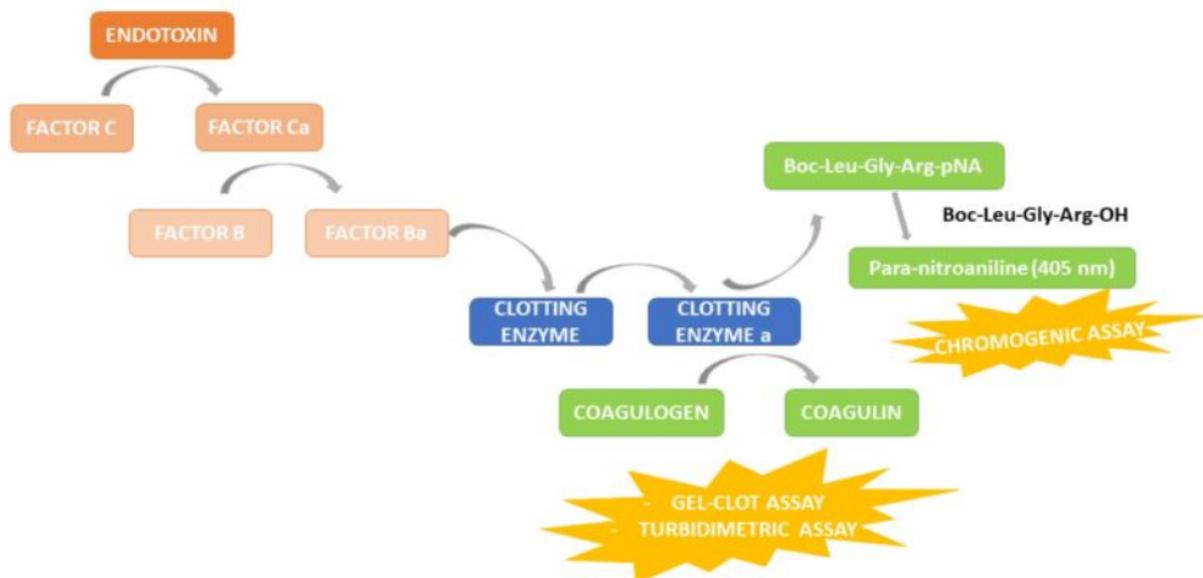
- Gel-coagulo o gel-clot;
- Test turbidimetrico;
- Test cromogenico.



Conteggio delle CFU mediante filtrazione su membrana

Tutti e tre i metodi si basano sulla stessa cascata di reazione mediata da LPS nel limulus che vede la presenza di diversi attori: proenzimi serina proteasi (fattore C, fattore B), un proenzima proclottante e una proteina gelificante, il coagulogeno. L'LPS attiva dapprima il proenzima fattore C alla forma attiva del fattore C. Il fattore C attivato, attiva a sua volta il fattore B, il quale converte l'enzima proclottante in enzima coagulante. L'enzima di coagulazione attivato scinde due legami peptidici nel coagulogeno, una molecola simile al fibrinogeno, per produrre un gel di coagulina insolubile.

Per quanto riguarda il **test Cromogenico**, l'enzima di coagulazione attivato dall'endotossina scinde un substrato cromogenico sintetico, utilizzato specificamente per il dosaggio delle endotossine batteriche, rilasciando la p-nitroanilina di colore giallo. Il colore generato viene misurato fotometricamente a 405 nm. La quantità di endotossina nel campione è determinata dal tempo richiesto l'apparizione del colore giallo.



Rappresentazione schematica del principio alla base dei tre diversi metodi

Nel **test Gel-clot**, invece, la presenza di endotossina attiva l'enzima di coagulazione generando la formazione un coagulo di gel nel campione.

Infine, il **test turbidimetrico** misura la presenza di particelle solide in una soluzione, ovvero la torbidità. In presenza di endotossina, il lisato svilupperà torbidità dovuta al taglio del substrato endogeno da parte dell'enzima procoagulante attivato. La torbidità viene letta come valore di densità ottica (OD) pari circa a 340 nm. La velocità di sviluppo della torbidità è direttamente proporzionale alla concentrazione di endotossina presente nel campione.

In tutti i metodi per la determinazione delle endotossine, viene utilizzata un'endotossina di riferi-

mento internazionale (E. coli O113: H10K), che funge da campione standard per le diverse determinazioni. I risultati del test LAL sono espressi in unità di endotossina (UE) o in unità internazionali (UI), entrambe equivalenti (1 UE = 1 UI). Questo test è valido solo per rilevare endotossine e non altri tipi di pirogeni.

Interpretazione dei risultati

Nella maggior parte delle linee guida e delle raccomandazioni su acqua e LD vengono menzionati due livelli di qualità. Il primo, chiamato standard, indica le concentrazioni massime di contaminanti nell'acqua e LD accettabili per le modalità di emodialisi convenzionali. Il secondo livello è quello dell'acqua e LD chiamato altamente purificato o ultrapuro, molto più esigente e attualmente consigliato per tutti i tipi di emodialisi.

Esame	Dialisato standard		Dialisato ultrapuro	
	Valore di rif.	Frequenza	Valore di rif.	Frequenza
Batteri UFC/ml a 22°C	< 100	Ogni 4 mesi	< 0.1	Ogni 2 mesi
Muffe e lieviti/ml	< 10		0	
Endotossine UI/ml	< 0.25		< 0.03	

Secondo le raccomandazioni della Farmacopea Europea (FE), la contaminazione batterica massima ammissibile nell'acqua di dialisi deve essere <100 CFU / ml e la concentrazione di endotossina <0,25 EU / ml. L'acqua altamente purificata o ul-

trapura deve contenere <10 CFU / 100 ml (<0,1 CFU / ml) determinato livello di endotossine deve essere <0,03 EU / ml.

Controllo microbiologico dell'aria in sala operatoria

Il controllo microbiologico dell'aria nelle sale operatorie è fondamentale per garantire la qualità dei processi svolti al loro interno e per proteggere il paziente da possibili infezioni da parte di microrganismi ambientali. È anche uno strumento utile per monitorare le pratiche di pulizia e disinfezione di routine. In questa sezione vengono prima esaminate le condizioni costruttive e di ventilazione in cui è indicato il monitoraggio microbiologico dell'aria, i microrganismi più frequenti e, infine, il ruolo svolto da un servizio di microbiologia nel controllo e mantenimento delle condizioni operative ottimali.

Classificazione dei locali o camere bianche

A seconda dei requisiti richiesti per quanto riguarda la presenza di microrganismi nell'aria, i locali di un ospedale sono divisi in due classi:

- **Locali di classe I:** con esigenze molto elevate. All'interno della classe I i locali sono:
 - Sale operatorie e sale comunicanti.
 - Camere per pazienti immunodepressi.
- **Locali di classe II:** con esigenze meno elevate. Ad esempio, camere con letti per i servizi di malattie infettive, medicina intensiva, fisioterapia, ecc.

Trattenere le impurità contenute nell'aria sotto forma di particelle solide e liquide richiede l'installazione di un impianto di condizionamento con diversi livelli di filtrazione a seconda del tipo di locale da proteggere, nello specifico: il primo livello di filtrazione deve essere collegato alla presa d'aria esterna, il secondo dopo l'unità di trattamento d'aria e all'inizio del condotto di scarico, il terzo più vicino al locale da trattare.

A seconda del tipo di intervento che viene eseguito all'interno delle sale operatorie, queste sono classificate in tre classi:

- Sale operatorie di classe A: trapianti di cuore, polmone e fegato; cardiocirurgia extracorporea e aortica; chirurgia ortopedica con protesi.
- Sale operatorie di classe B: chirurgia convenzionale e d'urgenza.
- Sale operatorie di classe C: interventi ambulatoriali; consegne.

Le sale operatorie di tipo A e le unità di oncoematologia sono classificate all'interno di aree ospedaliere ad altissimo rischio; sale operatorie di tipo B come aree ad alto rischio e di tipo C come aree a rischio intermedio. Il livello di pulizia dell'ambiente raccomandato per ciascuna di queste aree è classificato come: ambiente molto pulito (*ultraclean*), ambiente pulito e ambiente accettabile. Il controllo microbiologico dell'aria sarebbe indicato soprat-

tutto per le zone ad altissimo rischio e quelle ad alto rischio.

L'installazione di aria condizionata nelle camere bianche (ambienti puliti, con aria pura), con i tre livelli di filtrazione consigliati per i locali di classe I,

consente di ridurre la concentrazione di sostanze inquinanti all'interno di questi ambienti (es. gas narcotici, sostanze odorifere) e, soprattutto, di ridurre i microrganismi contenuti nell'ambiente esterno.

Microrganismi coinvolti

I microrganismi più frequentemente coinvolti nella contaminazione delle camere bianche sono i **funghi**. I funghi sono ampiamente distribuiti nell'ambiente e la loro concentrazione in determinati luoghi cambia sulla base alle condizioni ambientali e alle caratteristiche del microrganismo. I funghi colonizzano un dato materiale quando le loro spore germinano e le loro ife crescono all'interno o sulla superficie del materiale stesso. Questa crescita di solito termina con una massiccia produzione di spore. La formazione di spore è importante per la sopravvivenza, la replicazione e la dispersione dei funghi e rappresentano anche le particelle fungine più frequenti sospese nell'aria. A causa delle loro dimensioni, le spore possono rimanere a lungo nell'atmosfera e percorrere enormi distanze utilizzando le correnti d'aria. La dimensione delle spore varia tra 2 e 56 Qm a seconda del tipo di specie.

La principale via di ingresso dei funghi nel corpo umano è attraverso il sistema respiratorio. L'inhalazione di spore, frammenti ifali e allergeni prodotti dai funghi è dovuta in particolare alle loro piccole dimensioni. Altre vie di infezione meno frequenti sono l'ingestione e il contatto diretto. Sono stati descritti focolai nosocomiali di malattie fungine legate a lavori di costruzione o ristrutturazione, nonché a sistemi di ventilazione danneggiati o contaminati. Tuttavia, la maggior parte dei casi di malattia fungina nosocomiale è sporadica e il problema più grande è determinare se queste infezioni vengono acquisite all'interno o all'esterno dell'ambiente ospedaliero.

L'aspergillosi è la malattia opportunistica più significativa nei pazienti immunocompromessi. Questa infezione fungina è causata principalmente da *Aspergillus fumigatus* e, in misura minore, da *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. niger* e *A. terreus*. Altri funghi che causano infezioni respiratorie sono *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* e *Fusarium*.

Tra i microrganismi che devono essere determinati nei controlli microbiologici delle camere bianche, oltre ai suddetti funghi, vi sono anche **microrganismi mesofili aerobici**.

Campionamento

Per il campionamento delle particelle biologiche vitali aerodisperse possono essere utilizzati il **campionamento attivo** e il **campionamento passivo**.

Il primo si basa sull'aspirazione di un volume noto di aria che viene proiettata contro una superficie di raccolta, che può essere solida o liquida, permettendo, quindi, la valutazione della concentrazione dei microrganismi nell'aria; i risultati vengono generalmente espressi in UFC/m³. Il campionamento dell'aria avviene utilizzando un campionatore SAS (Surface Air Sistem), sviluppato appositamente per campionare i biocontaminanti aerodispersi come spore, batteri, muffe, lieviti.

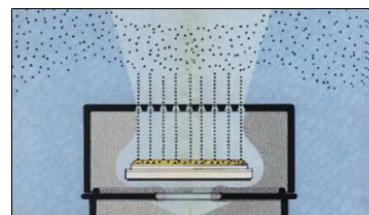
Il campionamento passivo si basa sull'utilizzo delle piastre di sedimentazione contenenti un terreno nutriente, lasciate esposte all'aria per un determinato periodo di tempo; i risultati vengono espressi in UFC/ piastra/tempo. Poiché non è noto il volume da cui originano le particelle, il campionamento passivo non è un campionamento volumetrico, cioè non fornisce una valutazione quantitativa dei microrganismi presenti in un determinato volume d'aria; dà indicazioni, invece, sul fall-out microbico, cioè su quella parte di microrganismi che si deposita su una superficie. Le piastre di sedimentazione possono, pertanto, essere utilizzate per la valutazione qualitativa e quantitativa della contaminazione di una superficie da parte di particelle vitali aerodisperse. Laddove il campionamento venga effettuato per stimare il rischio di contaminazione microbica di una superficie critica, le piastre di sedimentazione collocate nelle immediate vicinanze della superficie possono rappresentare un facile, economico e utile metodo di controllo. Relativamente alla sala operatoria, il risultato ottenuto con il campionamento passivo viene ritenuto un indicatore clinicamente rilevante della contaminazione della ferita chirurgica. L'utilizzo delle piastre di sedimentazione è stato standardizzato mediante la definizione dell'**Indice Microbico Aria** (IMA), che rappresenta il numero di microrganismi che si depositano su una piastra Petri di 9 cm di diametro, contenente agar nutriente, esposta all'aria per 1 ora, ad 1 m di altezza, a circa 1 m da ogni ostacolo fisico rilevante.

Frequenza di campionamento microbiologico

Va notato che non esistono standard concordati a livello internazionale per il prelievo di campioni

d'aria per il controllo microbiologico. La frequenza raccomandata dei controlli microbiologici dell'aria nelle camere bianche è la seguente:

- Controllo quindicinale in aree di isolamento oncoematologico
- Convalida mensile in sale operatorie di tipo A ad altissimo rischio
- Convalida trimestrale in sale operatorie ad alto rischio di tipo B
- Convalida prima dell'avvio
- Convalida dopo le manutenzioni
- Convalida dopo la modifica dei filtri assoluti
- Controllo straordinario in caso di lavori vicini, o epidemia di origine in zona controllata.



Schema di campionamento mediante campionatore SAS

Criteri per l'interpretazione dei risultati

Per la coltivazione di funghi filamentosi i valori ammissibili sono 0 UFC/m³. Per il conteggio aerobico, i valori di biosicurezza ammissibili dipendono dal tipo di sala operatoria:

- Ambiente molto pulito: < 10 UFC/m³.
- Ambiente pulito: < 10-100 UFC/m³.
- Ambiente accettabile: 100-200 UFC/m³.

Poiché non ci sono valori-limite per le piastre IMA nelle linee guida ufficiali italiane, vengono presi come riferimenti i valori-limite proposti dall'Associazione degli Ospedali Svizzeri:

CLASSE IMA	INDICE IMA	IGIENE ARIA	TIPOLOGIA DI AMBIENTE
1	0-5 UFC/piastra	Ottima	Ad altissimo rischio: <i>Ultraclean room, isolamento protettivo, sale operatorie per protesi auricolari</i>
2	6-25 UFC/piastra	Buona	Ad alto rischio: <i>Sale operatorie per chirurgia generale, rianimazione, dialisi, laboratori di microbiologia</i>
3	26-50 UFC/piastra	Mediocre	A rischio medio: <i>Ambulatori, laboratori</i>
4	51-75 UFC/piastra	Cattiva	A basso rischio: <i>Corsie d'ospedali, servizi, uffici</i>

Controllo microbiologico delle superfici di lavoro

Le superfici ambientali hanno scarsa rilevanza nella diffusione di microrganismi causa di infezioni del sito chirurgico, per cui si ritiene sufficiente un'accurata pulizia, riservando la disinfezione in caso di sporco visibile o contaminazione con sangue e altri liquidi corporei. Le linee guida dei CDC (centri per la prevenzione e il controllo delle malattie) per la prevenzione delle infezioni del sito chirurgico ritengono giustificato un loro controllo microbiologico solo in corso di indagini epidemiologiche. Di diverso parere sono alcuni Autori che, riportando l'esperienza di otto anni di campionamento delle superfici per la ricerca di *Aspergillus* spp. in sale operatorie e in unità di ematologia, sottolineano il miglioramento dei risultati ottenuti e l'utilità di una sorveglianza ambientale. Il controllo microbiologico delle superfici ha come obiettivo la valutazione dell'efficacia degli interventi di sanificazione, ma in alcuni casi viene utilizzato come indicatore indiretto della contaminazione microbica dell'aria, considerando che tutte le particelle presenti nell'aria sedimentano e che il controllo microbiologico delle superfici può permettere l'individuazione di microrganismi presenti in scarsa quantità nell'aria. Alcuni Autori hanno proposto il grado di contaminazione microbica del pavimento della sala operatoria come indicatore della qualità igienica della sala stessa.

Campionamento microbiologico e valori di riferimento

La carica microbica presente su una superficie può essere valutata tramite dispositivi di contatto, come piastre RODAC o membrane di nitrocellulosa, oppure mediante tampone. Riposti nel terreno di trasporto (soluzione fisiologica), i tamponi possono essere seminati per inclusione o spatolati su terreni specifici e successivamente incubati per temperatura e tempi necessari per il conteggio delle colonie. Tale metodica esprime il numero di



Monitoraggio ambientale mediante tampone

UFC presenti, ovvero i microrganismi per centimetro quadrato. Le piastre da contatto contenenti il terreno di coltura specifico per il microrganismo ricercato, vengono appoggiate sulle superfici per circa 10 secondi. Quest'ultimi sono da preferirsi su superfici piane e per un campionamento standardizzato, allo scopo di confrontare dati quantitativi; i tamponi sono utili in caso di superfici irregolari e per valutazioni qualitative.

Frequenza dei campionamenti in funzione della tipologia dei locali

Per la verifica degli obiettivi sopra riportati si consiglia di effettuare il campionamento con periodicità almeno

semestrale. Tale frequenza dovrà essere confermata o modificata a seconda delle necessità nei seguenti casi:

- quando i limiti di riferimento sono superati in modo consecutivo;
- dopo un'interruzione prolungata delle attività;
- dopo lavori di manutenzione significativi sul sistema di ventilazione;
- dopo modifiche alle procedure di pulizia, sanificazione e disinfezione;
- dopo incidenti che potrebbero contribuire alla biocontaminazione.

I prelievi dovranno essere effettuati su superfici asciutte, dopo il termine delle operazioni di sanificazione della sala e dopo che questa sia rimasta chiusa e vuota per almeno 30-60 minuti (tempo ritenuto sufficiente per l'azione dei disinfettanti).



Monitoraggio ambientale mediante piastre a contatto

LOCALI	OBIETTIVI	TECNICHE	RISULTATI ATTESI (UFC/piastra)	PROVVEDIMENTI SE RISULTATI NON CONFORMI
Sale Operatorie Altri ambienti "critici" (sale per esami invasivi in cavità sterili ecc..)	Conformità della disinfezione e del trattamento dell'aria	Contatto	≤ 5 UFC/piastra	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se $5 < X \leq 15$: accettabile. ▪ Se > 15 in: <ul style="list-style-type: none"> ➢ 1 solo punto: segnalazione. ➢ 2-4 punti: rivedere il protocollo di pulizia e la sua attuazione. ➢ 5 o più punti: inaccettabile; ripetere il controllo. ▪ Se presenti <i>S. aureus</i>, enterobatteri, <i>Aspergillus spp</i>, <i>Pseudomonas sp</i>: rivedere interamente il protocollo di pulizia e programmare nuovi controlli.
Degenza pre-post intervento Rianimazioni Neonatologia	Controllo del protocollo di disinfezione e conformità della pulizia	Contatto	≤ 50 UFC /piastra Senza agenti patogeni: <i>S. aureus</i> , enterobatteri, <i>Aspergillus spp</i> , <i>Pseudomonas sp</i>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Se > 50: rivedere il protocollo.

3.3 Valori soglia dei prelievi sulle superfici

Monitoraggio microbiologico degli endoscopi

Le procedure endoscopiche sono diventate uno strumento essenziale nella diagnosi e nel trattamento delle malattie gastrointestinali, e ogni paziente ha il diritto di essere esaminato e trattato senza rischio di trasmissione di agenti infettivi o complicazioni che possono derivare da un reprocessing inadeguato degli endoscopi e degli strumenti ad esso correlato. La pulizia manuale, compresa la spazzolatura, è il primo e più importante passo nel reprocessing degli endoscopi, indipen-

dentemente dell'eventuale utilizzo di un sistema automatizzato. I canali dell'endoscopio non puliti o non sufficientemente puliti favoriscono la formazione di un biofilm batterico e il materiale organico che non viene rimosso mediante spazzolatura manuale può inoltre essere fissato mediante aldeidi e favorire la crescita di microrganismi. La pulizia manuale deve includere tutti i canali dell'endoscopio accessibili, tutte le porte delle valvole, la superficie esterna e le parti di difficile accesso. Oltre agli stessi endoscopi, anche le bottiglie d'acqua utilizzate per il lavaggio dello strumento possono essere una fonte di contaminazione, in particolare in

Inadeguato riprocessamento degli endoscopi e degli accessori Pulizia inadeguata (es. pulizia manuale e spazzolamento dei canali inadeguati) Accessori per la pulizia contaminati (es. spazzolini per la pulizia) Utilizzo di detergenti o disinfettanti non appropriati o incompatibili Utilizzo di agenti chimici a concentrazione, tempo di contatto e temperatura inadeguati Soluzioni contaminate o scadute Acqua di risciacquo contaminata Presenza di materiale organico fissato agli endoscopi o alle apparecchiature automatiche Utilizzo di accessori non sterili per procedure diagnostiche e terapeutiche invasive (es. pinze biottiche, anse per polipectomia) Inadeguato reprocessing della bottiglia dell'acqua (es. mancata sterilizzazione) Utilizzo di normale acqua di rete nella bottiglia dell'acqua
Inadeguato trasporto e stoccaggio degli endoscopi Asciugatura insufficiente prima dello stoccaggio Condizioni di stoccaggio non adeguate
Lava-disinfettatrice contaminata o difettosa Contaminazione di circuiti, vasche, ecc. (biofilm) Contaminazione dell'acqua di risciacquo finale Difetti elettronici/meccanici della lava-disinfettatrice (es. connessioni sbagliate) Carico sbagliato o inadeguato (es. taniche) Mancanza di manutenzione regolare secondo le raccomandazioni del produttore Mancata esecuzione del ciclo di auto-disinfezione
Limiti di costruzione o danni dell'endoscopio Canali molto sottili, canali con ramificazioni, non raggiungibili dagli spazzolini per la pulizia Danno delle superfici (interne ed esterne) dell'endoscopio che favoriscono la contaminazione
Contaminazione dell'acqua che fornisce il servizio di endoscopia Contaminazione delle condutture di alimentazione Sistema di approvvigionamento dell'acqua contaminato o non adeguato (es. sistema di filtrazione)
Contaminazione del bagno ad ultrasuoni
Asciugatura e stoccaggio insufficienti
Limitazioni legate ad un insufficiente numero di endoscopi e/o di risorse per il reprocessing in base al carico di lavoro

caso di un'inadeguata pulizia delle bottiglie, della mancanza di sterilizzazione o dell'uso di acqua del rubinetto invece che di acqua sterile. La tabella presenta un riepilogo delle aree di debolezza e carenza per quanto riguarda il ritrattamento degli endoscopi.

Frequenza

Il campionamento microbiologico degli endoscopi flessibili è previsto sottoponendo a rotazione gli endoscopi e le lava-disinfetta-endoscopi in dotazione al servizio almeno semestralmente (2 volte l'anno). Ogni servizio predisporrà annualmente il proprio calendario.

Campionamento per test di routine

Deve essere stabilito un piano di campionamento per ogni tipo di endoscopio, che tenga conto delle parti critiche di ogni strumento. Per evitare contaminazioni dall'ambiente, la raccolta di campioni devono essere eseguita in condizioni asettiche.

I campioni su cui eseguire il monitoraggio microbiologico sono:

- a) Campioni liquidi dai canali dell'endoscopio
- b) Tamponi dalle superfici esterne
- c) Campioni liquidi da bottiglie d'acqua.

Area / materiale da monitorare	Metodo	Standard
Canale endoscopico*	Lavaggio o risciacquo di: - Canale per l'aspirazione e per la pinza biptica - Canale per l'immissione di acqua/aria - Canali di risciacquo aggiuntivi	- Riempire una siringa sterile con 20 ml di soluzione salina allo 0.9% - Collegare la siringa alla porta di ingresso di ciascuna canale e verificare che la connessione garantisca un corretto risciacquo dell'intero canale - Raccogliere il fluido in uscita all'interno di un contenitore sterile
Altre superfici	Tamponi	- Utilizzare tamponi sterili, inumiditi con soluzione salina con o senza neutralizzatore (per eliminare eventuali tracce chimiche) - Campionare diverse parti della superficie esterna - Strisciare il tampone su un terreno adatto (es. Tryptic Soy Broth) all'interno di una piastra Petri
Bottiglia d'acqua	Campione liquido	- La bottiglia d'acqua pronta per l'uso deve essere testata - Volume campione: 2 x 100 ml - Utilizzare una siringa sterile per raccogliere i campioni liquidi dalla bottiglia d'acqua
Acqua di risciacquo finale	Campione d'acqua	- Utilizzare una siringa sterile e raccogliere l'acqua in un contenitore altrettanto sterile - Volume campione: 2 x 100 ml

*Note:

- A causa della complessa costruzione dei canali dell'endoscopio, ogni canale dovrebbe essere testato separatamente.
- Devono essere utilizzati connettori adeguati a garantire il completo e lavaggio separato di ogni canale.
- Il produttore dell'endoscopio dovrebbe fornire istruzioni chiare su come collegare e testare ogni canale.
- A causa del suo piccolo lume, il canale endoscopico degli ambiti duodenici deve essere testato risciacquando con 5 ml di soluzione salina sterile con o senza un neutralizzatore appropriato.

I campioni dovrebbero essere processati subito dopo la raccolta. Se ciò non dovesse essere possibile, i campioni dovrebbero essere refrigerati (ad esempio per il trasporto).

Campioni liquidi dai canali dell'endoscopio

Conta microbiologica totale.

- Prelevare 1 ml di campione e adagiarlo su un numero appropriato di piastre con un terreno completo (ad es. Tryptic Soy Agar [TSA]). Incubare per 48 ore a 30° C.

Rilevazione di microrganismi speciali.

Enterobatteri, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stafilococchi* dovrebbero essere ricercati come microrganismi indicatori, non solo nell'acqua di risciacquo finale, ma anche nei canali endoscopici. Aggiungere al campione lo stesso volume di Tryptic Soy Broth (TSB) a doppia concentrazione e incubarlo a 37 ° C per 48 h. Si può utilizzare il brodo MADC a doppia concentrazione seguito da una incubazione a 37° C per 21 giorni se si ritiene appropriato un test per la ricerca di micobatteri. Si può eseguire una subcoltura del campione su piastre di agar selettivo e incubare per un tempo e una temperatura appropriati secondo le indicazioni del produttore. I terreni principalmente usati sono:

- Agar Violet Red Bile Dextrose (VRBD) come terreno selettivo per il rilevamento di *Enterobacteriaceae*

- Agar cetrimide per il rilevamento di *Pseudomonas aeruginosa*
- Baird - Parker agar per il rilevamento degli stafilococchi
- Agar Middlebrook per il rilevamento dei micobatteri

Tamponi

Estrarre il tampone in 10 ml di TSB. Per la rilevazione di microrganismi speciali incubare il volume a 37 ° C per 48 h, dopo di che strisciare il campione su piastre con agar selettivo e incubare per un tempo e una temperatura appropriati, secondo le istruzioni del produttore.

Campioni d'acqua (da bottiglia d'acqua + risciacquo finale gabinetto)

L'acqua di risciacquo finale deve essere priva di *Pseudomonas aeruginosa*, *micobatteri atipici* e *Legionellae spp.* La conta microbica totale aerobica viene determinata mediante filtrazione (dimensione dei pori 0,45 Qm) di campioni di acqua da 10 ml e 100 ml. Il campione viene incubato a 30 ° C su un mezzo R2A o un altro mezzo a basso contenuto di nutrienti per 5 giorni. Le colonie vengono contate, e il tipo di microbo è determinato dalla subcoltura su appropriati terreni selettivi e / o tecniche di identificazione standard (es. sistemi di test biochimici disponibili in commercio). Per la rilevazione dei micobatteri, deve essere utilizzato come terreno di coltura il Middlebrook 7H10 agar seguito da un'incubazione a 37° C per un massimo di 21 giorni.

Interpretazione dei risultati e misure correttive in caso di contaminazione

Una varietà di batteri e virus è stata associata alla trasmissione di agenti infettivi correlata all'endoscopia. Il rilevamento dei virus è complesso, richiede tempo e denaro, soprattutto quello dei virus intatti e infettivi. Pertanto, la routine di sorveglianza microbiologica non include i virus. In caso di regolare sorveglianza microbiologica, non è necessario testare tutti i possibili batteri. Numerosi organismi possono essere utilizzati come indicatori di debolezze o errori nella procedura di riprocessamento. Una panoramica è fornita in tabella.

Risultato	Singolo endoscopio	Più di un endoscopio	Nella lava-endoscopi
<i>Batteri ambientali (Staphylococcus epidemidis e altri stafilococchi coagulasi negativi <100 colonie)</i>	Eseguire il campionamento alla data pianificata ponendo maggiore attenzione alla tecnica di campionamento. Probabile contaminazione da parte degli operatori che hanno eseguito il campionamento.	Eseguire il campionamento alla data pianificata ponendo maggiore attenzione alla tecnica di campionamento. Probabile contaminazione da parte degli operatori che hanno eseguito il campionamento.	Ripetere il campionamento.
<i>Pseudomonas spp in qualunque carica</i>	Ripetere immediatamente il campionamento su quello strumento. Non utilizzare lo strumento fino all'arrivo del risultato colturale. Questa è una situazione ad alto rischio		Ripetere il campionamento. Non utilizzare la lavaendoscopi fino all'arrivo del risultato colturale.
<i>Organismi enterici quali Escherichia coli, Enterococcus faecalis o lieviti in qualunque carica oppure stafilococchi coagulasi negativi ≥100 colonie</i>	Ripetere immediatamente il campionamento su quello strumento. Non utilizzare lo strumento fino all'arrivo del risultato colturale. Probabile presenza di un difetto meccanico nello strumento stesso.	Ripetere immediatamente il campionamento degli strumenti. È un forte indizio di inadeguatezze del processo di lavaggio/disinfezione. Nel caso di nuova positività, attenta revisione delle tecniche di lavaggio e disinfezione di tutti i componenti dello staff, se necessario ad opera di un revisore esterno.	Ripetere il campionamento. Non utilizzare la lavaendoscopi fino all'arrivo del risultato colturale.
<i>Isolamento di Salmonella o Shigella</i>	Evento sentinella Contattare il Servizio delle infezioni ospedaliere.		

Conta microbiologica totale:

a) Campioni liquidi dai canali dell'endoscopio.

Il conteggio massimo totale dovrebbe essere <20 CFU/ canale. Dovrebbe essere calcolato tenendo conto della quantità di soluzione salina utilizzata per risciacquare il canale. Gli organismi indicatori non dovrebbero essere trovati in nessun momento.

b) Tamponi.

Le colture prelevate dai tamponi dovrebbero essere concentrate sulla crescita di microrganismi indicatori. La quantificazione dei microrganismi non è raccomandata.

c) Campioni d'acqua.

Il conteggio massimo totale dovrebbe essere <10/100 CFU/ml. Gli organismi indicatori non dovrebbero essere trovati in alcun momento.

ELENCO DEGLI STUDENTI

Barba Rossella, Bellone Chiara, Bertolina Carlotta, Bonomo Chiara, Francesca Busa, Caviglia Federica, Chiarlone Naomi, Cipollino Ilaria, Ciulla Francesca Maria, Ferreri Silvia, Fiorilla Irene, Fiorilla Simone, Gastaldo Elisa, Gonella Edoardo, Iwuajoku Aniett Nkemdirim, Lamparelli Erik, Langone Angela, Lo Giudice Giorgia, Maddalone Maria Grazia, Manfredi Stefania, Megazzini Alice, Megna Jacopo, Minetto Francis, Nano Ennio, Narcisi Selene, Neri Roberta, Oliveri Giulia, Orengo Maddalene, Pignola Serena, Piombo Filippo, Pisanelli Valentina, Rotondo Davide, Sciortino Erika, Tommasi Nicoletta, Zerbinati Federica, Petrino Giorgia.