



**RACCOMANDAZIONI PER L'ESECUZIONE
DELLE INDAGINI MICROBIOLOGICHE DI
CAMPIONI DELLE VIE AEREE DI PAZIENTI
AFFETTI DA FIBROSI CISTICA**

a cura di

**Gruppo Professionale Microbiologi della
Società Italiana Fibrosi Cistica**

2018



patrocinio



Autori

Campana Silvia; Ravenni Novella; Dolce Daniela - Dipartimento Specialistico Interdisciplinare SOSA Fibrosi Cistica Azienda Ospedaliero Universitaria Meyer - Firenze

Cariani Lisa; Biffi Arianna; Girelli Daniela; Sottotetti Samantha; Rizzetto Sara - UOS Microbiologia e Microbiologia Fibrosi Cistica - Fondazione IRCCS Cà Granda Ospedale Maggiore Policlinico - Milano

Catania Maria Rosaria; Iula Vita Dora - UOSD di Batteriologia e Micologia, D.A.I. di Medicina di Laboratorio, A.O.U. Federico II - Napoli

Fiscarelli Ersilia; Tuccio Guarna Assanti Vanessa; Ricciotti Gabriella; Rossitto Martina - UOS Microbiologia della Fibrosi Cistica; UOC Micro-Para-Viro; Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCS - Roma

Morelli Patrizia - UOS Microbiologia e Virologia - Sezione Fibrosi Cistica - UOC Laboratorio Analisi - Istituto Giannina Gaslini - Genova

Trancassini Maria; Pecoraro Claudia - UOC Microbiologia e Virologia Azienda Ospedaliera/Universitaria Policlinico Umberto I - Roma

E con il contributo di tutti gli altri membri del Gruppo Professionale Microbiologi della Società Italiana di Fibrosi Cistica

Premessa del Presidente della Società Italiana di Fibrosi Cistica (SIFC)

La rapidità delle conoscenze scientifiche nell'ambito della ricerca di base e della ricerca applicata in Microbiologia, arricchita dalle nuove conoscenze di biologia molecolare, impone un costante aggiornamento delle tecniche del laboratorio microbiologico, dove, accanto ai metodi tradizionali, vengono impiegate sempre più nuove tecniche di diagnostica diretta, sierologica e molecolare, accoppiate a sistemi automatizzati in grado di aumentare la sensibilità e la produttività dei test diagnostici.

Queste considerazioni hanno portato il gruppo professionale dei Microbiologi della SIFC alla necessità di aggiornare le raccomandazioni per l'esecuzione delle indagini microbiologiche di campioni respiratori dei pazienti con fibrosi cistica, precedentemente redatte, sia promuovendo la formazione attraverso l'organizzazione di corsi teorico-pratici che possono contribuire a migliorare la qualità dei singoli laboratori, sia mantenendo e incrementando le collaborazioni internazionali; tutto ciò al fine di condividere e ottimizzare i processi di diagnosi, e di sostenere le già qualificate risorse nazionali attraverso l'aggiornamento delle indagini specialistiche.

A nome mio personale e di tutto il Consiglio Direttivo desidero esprimere i più vivi ringraziamenti esteso al Coordinatore e a tutto il Gruppo dei Microbiologi della SIFC per questo importante lavoro che arricchisce la Società di un ulteriore contributo, con l'auspicio che tale materiale fornisca un valido supporto agli orientamenti diagnostici dei Centri di cura.

**Presidente SIFC
Prof.ssa Valeria Raia**

Il Gruppo Professionale di Microbiologia della Società Italiana di Fibrosi Cistica

Il gruppo dei microbiologi che si occupano di Fibrosi Cistica (FC) è nato ufficialmente nel 1996 raggruppando i professionisti che si occupavano delle indagini microbiologiche relative ai pazienti FC all'interno dei vari Centri di cura Italiani. Scopo prioritario del gruppo all'epoca era stato di verificare le tecniche utilizzate nel processare i campioni respiratori dei pazienti FC al fine di uniformare tale metodiche secondo le indicazioni della letteratura internazionale. Da questo sforzo collaborativo è stato redatto un protocollo pratico: *"Raccomandazioni per l'esecuzione delle indagini microbiologiche di campioni respiratori dei pazienti con fibrosi cistica"* al quale i laboratori di microbiologia FC si sono uniformati secondo le proprie esigenze e possibilità. Negli anni successivi da parte dei microbiologi affiliati ai Centri vi è stato un interesse crescente verso approcci di microbiologia diagnostica più sofisticati e specialistici. Questo notevole salto di qualità è stato possibile anche grazie alla collaborazione con Strutture Universitarie Italiane ed Internazionali. Il gruppo dei microbiologi si è quindi allargato arricchendosi di nuove realtà e campi di studio fra cui: indagini epidemiologiche ed identificazione dei ceppi batterici "difficili" mediante sequenziamento genico, determinazione mediante microdiluzione in brodo della Minima Concentrazione di antibiotico Inibente (MIC) dei diversi micobatteri a rapida crescita, delle diverse specie di *Burkholderia cepacia* complex e dei batteri gram negativi non fermentanti multi resistenti, ecc.

Tali tipi di indagini non sono accessibili a tutti i laboratori di microbiologia diagnostica, tuttavia esistono alcuni laboratori specialistici che eseguono questo tipo di esami specifici per tutti i centri FC Italiani che ne facciano richiesta. L'attività del gruppo attualmente si rivolge ad una ottimizzazione delle già qualificate risorse nazionali, mantenendo e incrementando le collaborazioni internazionali, promuovendo la formazione attraverso l'organizzazione di corsi teorico-pratici, e suddividendo le indagini microbiologiche più specifiche fra i laboratori Italiani più attrezzati considerati un utile riferimento per tutti gli altri Centri Italiani. Questa versione aggiornata delle raccomandazioni da utilizzare nelle analisi microbiologiche relative ai pazienti FC vuole prioritariamente sottolineare gli accorgimenti e approcci metodologici da ritenersi indispensabile per la corretta esecuzione di specifiche indagini microbiologiche. In seconda istanza si vuole fornire una revisione ed un aggiornamento delle indagini specialistiche necessarie per il corretto monitoraggio delle infezioni di cui soffrono i pazienti FC.

E' auspicio dei microbiologi che hanno redatto questo documento che esso possa rappresentare un utile strumento di consultazione anche per chi raramente od occasionalmente si trova ad affrontare la diagnostica di campioni di pazienti FC o con patologie polmonari croniche.

DIAGNOSTICA MICROBIOLOGICA

La microbiologia della FC è nota come un'attività di nicchia all'interno del vasto panorama della diagnostica microbiologica. I microrganismi coinvolti in questa patologia polmonare sono in genere un numero molto ristretto di patogeni opportunisti che, viste le condizioni estreme dell'habitat di crescita (dovute al particolare microambiente costituito dal polmone FC, ma anche dall'enorme pressione selettiva esercitata dalla terapia antibiotica) hanno spesso caratteristiche particolari a causa di una serie di meccanismi di adattamento.

Appare quindi chiaro che questa particolare branca della microbiologia diagnostica rappresenti una sfida per il microbiologo che deve contrastare i continui cambiamenti di scena imposti dall'adattamento di questi patogeni in grado di escogitare sempre nuovi espedienti per la sopravvivenza. Gli approcci tecnici con cui il microbiologo si avvicina a questo gruppo particolarmente difficile di patogeni polmonari dovranno essere specifici e costantemente aggiornati.

Introduzione

La Fibrosi Cistica è la principale malattia genetica della razza caucasica caratterizzata da trasmissione autosomica recessiva. Il difetto genetico alla base di questa importante patologia causa alterazioni delle funzioni di trasporto ionico a livello degli epiteli a cui conseguono anomalie delle secrezioni esocrine. In Italia, sulla base di dati derivati dallo screening neonatale, l'incidenza di fibrosi cistica è stimata intorno a 1:3000 nati vivi, con la nascita di circa 200 nuovi pazienti anno (Alicandro *et al.* 2011).

Il decorso naturale della FC è condizionato principalmente dal grado di interessamento del polmone, che si manifesta con un progressivo decremento della funzionalità respiratoria. Le infezioni polmonari si presentano con modalità ricorrente e cronica e persistono per tutta la durata della vita dei pazienti, generando quello stato di flogosi permanente alla base del danno polmonare. Il polmone di pazienti con FC rappresenta un ambiente favorevole alla colonizzazione da parte di batteri patogeni opportunisti. Negli individui sani i batteri inalati vengono rimossi dalla clearance mucociliare e distrutti dal pH acido dello stomaco, i patogeni che riescono a superare la clearance mucociliare vengono poi eliminati da cellule fagocitiche, ed da diversi meccanismi immunologici, inclusi specifici anticorpi opsonizzanti; nei pazienti affetti da FC tali meccanismi difensivi non funzionano correttamente. La colonizzazione batterica delle vie aeree in FC è una combinazione di vari fattori tra i quali gli effetti patofisiologici conseguenti al difetto del gene CFTR, che ostacolano la clearance mucociliare e l'abilità di un certo spettro di batteri opportunisti a superare le normali difese polmonari. La suscettibilità dei pazienti con FC alle infezioni polmonari è nota fin dal 1940; prima dell'avvento della terapia antibiotica la maggior parte dei pazienti moriva prima di raggiungere i 5 anni di età, principalmente a causa di infezioni causate da *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). L'introduzione della penicillina, unitamente ad un programma terapeutico di vasta portata e ad un *follow-up* dei pazienti, effettuato in centri specializzati, ha migliorato notevolmente la prognosi della malattia e la mortalità è passata dal 61% del 1944 al 18% del 1948. Lo spettro dei microrganismi che si isolano dai pazienti con FC è limitato e solo per alcuni di essi è stata dimostrata una inequivocabile rilevanza clinica (Tab1):

Microrganismo	Ruolo nella malattia polmonare di pazienti FC	REFERENZA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA e Small Colony Variant	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Burkholderia cenocepacia</i> <i>Burkholderia dolosa</i> <i>Burkholderia multivorans</i>	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
Altri membri di <i>B.cepacia complex</i>	Non Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Probabile	Mathy V <i>et al.</i> 2018
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	Probabile	Mathy V <i>et al.</i> 2018
<i>Burkholderia gladioli</i>	Improbabile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Ralstonia spp</i>	Probabile	Li puma <i>et al.</i> 2010
<i>Pandoreae spp</i>	Non Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Inquilinus spp</i>	Non Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Mycobacterium abscessus complex</i>	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Mycobacterium avium complex</i>	Possibile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Nocardia spp.</i>	Non Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Haemophilus influenzae</i>	Possibile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Improbabile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Streptococcus anginosus group</i>	Possibile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Aspergillus fumigatus complex</i>	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
<i>Scedosporium spp.</i>	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
altre specie di funghi (<i>Aspergillus spp.</i> , <i>Rasamsonia</i> , <i>Exophiala</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Fusarium</i>)	Non Provato	Liu <i>et al.</i> 2013
<i>Candida albicans</i>	Improbabile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
Altri Virus respiratori	Possibile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
RSV	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
Influenza virus	Provato	Gilligan <i>et al.</i> 2014
Altri Virus respiratori	Possibile	Gilligan <i>et al.</i> 2014
Anaerobi (in particolare <i>Prevotella spp.</i>)	Possibile	Gilligan <i>et al.</i> 2014

Tabella 1- Rilevanza clinica di microrganismi isolati da pazienti con FC

Infezioni batteriche

Le infezioni polmonari causate da batteri nei pazienti affetti da FC sono particolarmente rilevanti per due principali motivi: rappresentano il fattore d'innescio e di mantenimento delle lesioni polmonari e sono la principale causa di morbilità e mortalità in FC.

La microbiologia delle infezioni polmonari batteriche in FC ha molti aspetti singolari:

- una localizzazione per lo più esclusiva e cronica del germe a livello delle vie aeree, con episodi di esacerbazione che si sovrappongono al quadro di base;
- le infezioni respiratorie sono causate da un limitato numero di germi opportunisti e il microbiota del tratto respiratorio tende a modificarsi con l'avanzare dell'età del paziente;
- in seguito alle numerose terapie antibiotiche a cui i pazienti FC sono sottoposti, i batteri sviluppano progressivamente meccanismi di resistenza che rendono problematico il trattamento delle infezioni;
- presenza di ceppi batterici altamente trasmissibili responsabili di possibili infezioni crociate tra pazienti.

Durante la prima decade di vita i patogeni maggiormente presenti nelle vie respiratorie sono l'*Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), *Staphylococcus aureus* e lo *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*); con l'età, l'isolamento di *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) diviene progressivamente più frequente come quello di altri batteri non fermentanti come *Achromobacter xylosoxidans* (*A. xylosoxidans*), *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) e microrganismi appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex (*B. cepacia* complex). (Fig.1)

Dai campioni delle vie aeree di pazienti FC possono essere isolati anche altri patogeni opportunisti come *Ralstonia* spp, *Pandorea* spp e *Inquilinus* spp etc, denominati microrganismi "B.cepacia-like" per la loro possibilità di essere erroneamente identificati come appartenenti al genere *B. cepacia* complex. Sebbene la colonizzazione di questi batteri "opportunisti" non abbia ancora un ruolo clinico e un meccanismo di patogenicità ben definito, risulta importante isolarli e effettuare una corretta identificazione.

Inoltre possono rivestire un ruolo patogeno anche i microrganismi anaerobi ed enterobatteri che devono perciò essere ricercati qualora vi sia una specifica richiesta del clinico (LiPuma JJ. 2010). Dall'insieme di queste considerazioni nasce la necessità di porre una particolare attenzione alla microbiologia della FC al fine di individuare in tempo reale le possibili criticità e la necessità di ricorrere a metodologie più raffinate, e di instaurare precocemente una terapia antibiotica efficace.

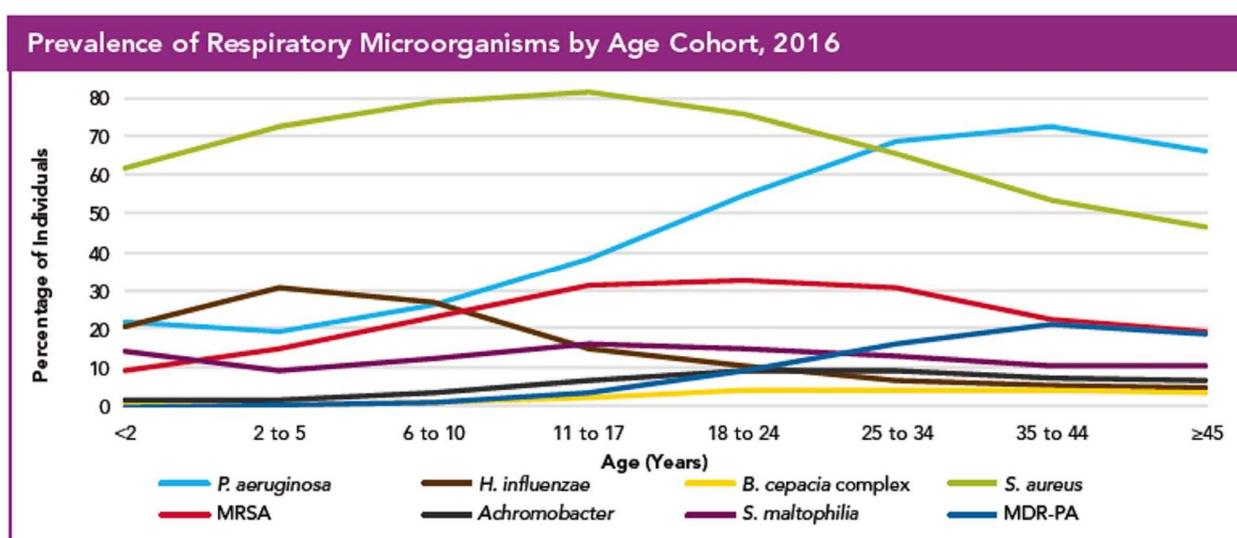


Fig 1: Report annual 2016- Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry

Infezioni virali

I virus respiratori (virus dell'influenza A e B, virus parainfluenzale 1 e 3, *Rhinovirus*, *Adenovirus* e virus respiratorio sinciziale) possono essere responsabili nei pazienti con FC di esacerbazioni del quadro infettivo polmonare, le quali possono diminuire la funzionalità respiratoria del 30%. Inoltre, in età pediatrica, a seguito dell'infezione da virus respiratorio sinciziale, si è riscontrata una maggiore suscettibilità all'infezione batterica da *P. aeruginosa*.

Le infezioni virali si comporterebbero quindi come eventi scatenanti: alcuni studi hanno dimostrato che il virus dell'influenza di tipo A può essere associato in pazienti FC a grave deterioramento polmonare e che, in pazienti in fase avanzata di malattia, possa determinarne la morte. Questi dati enfatizzano l'importanza della vaccinazione anti-influenzale.

Infezioni da miceti

I miceti colonizzano il tratto respiratorio dei pazienti affetti da FC in una percentuale che varia tra il 9% e il 57% (Brandt C. *et al.* 2018). Tale colonizzazione, comune nei pazienti con malattia polmonare avanzata, è favorita dai frequenti e prolungati cicli di terapia antibiotica a cui i pazienti sono sottoposti e dall'uso di corticosteroidi. La frequenza delle infezioni da miceti aumenta all'aumentare dell'età dei pazienti.

La variabilità della percentuale di ritrovamento di miceti nei campioni respiratori che si riscontra tra i diversi centri può dipendere dalla mancanza di standardizzazione delle procedure di laboratorio, soprattutto per ciò che riguarda l'utilizzo di terreni selettivi e il tempo di incubazione. Negli ultimi anni, il miglioramento delle tecniche di isolamento e identificazione ha permesso di osservare la reale prevalenza delle diverse specie di miceti nei campioni respiratori FC. Tra i funghi filamentosi, *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) rappresenta l'agente colonizzante più frequente, seguito da altre specie come *Scedosporium apiospermum* complex, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus*, *Exophiala dermatitidis*, *Lomentospora prolificans* e *Rasamsonia* spp.

Il reale ruolo patogeno dei miceti resta ancora da chiarire ma sembra che la colonizzazione cronica fungina possa agire in sinergia con la colonizzazione batterica, causando un peggioramento della malattia polmonare. Alcune specie, come *A. fumigatus*, sono responsabili di diverse manifestazioni cliniche nel contesto della FC: asma, bronchite, aspergilloma e aspergilloso bronco polmonare allergica (ABPA). Rivestono particolare importanza le colonizzazioni di miceti nei pazienti sottoposti a trapianto polmonare e successiva terapia immunosoppressiva. Le infezioni fungine nei trapiantati hanno un'incidenza che si aggira intorno al 5-10% e si manifestano frequentemente come infezioni dell'anastomosi bronchiale, tracheobronchiti, seguite da infezioni polmonari invasive ed infezioni invasive disseminate. Queste ultime hanno spesso esito fatale (70%) e rappresentano le complicanze infettive post trapianto più temibili.

Risulta quindi indispensabile migliorare le capacità diagnostiche dei laboratori per garantire un precoce isolamento e una corretta identificazione delle diverse e sempre più numerose specie fungine, in grado di sostenere colonizzazioni croniche polmonari e infezioni disseminate, anche alla luce del fatto che alcune di esse presentano resistenza innata o limitata sensibilità agli antifungini più comunemente utilizzati nella pratica clinica (Schwarz C. *et al.* 2018).

Infezioni da micobatteri non tubercolari (NTM)

La densità delle secrezioni, le patologie ostruttive e le abituali bronchiectasie associate, che caratterizzano il polmone del paziente FC, creano un ambiente favorevole per la colonizzazione e successivamente per la malattia invasiva da micobatteri non tubercolari (NTM-PD) (Haworth CS. *et al.* 2017)

Gli NTM sono suddivisi in specie a lenta crescita e a rapida crescita (RGM). Le specie di Micobatteri a lenta crescita che più frequentemente causano infezioni polmonari appartengono al *M. avium* complex (MAC; che comprende *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* e *Mycobacterium chimaera*), *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium malmoense* e *Mycobacterium xenopi*. Gli RGM che causano infezioni polmonari appartengono al *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC; che comprende *Mycobacterium abscessus* subsp *abscessus*, *Mycobacterium abscessus* subsp *massiliense*, *Mycobacterium abscessus* subsp *bolletii*), *Mycobacterium chelonae* e *Mycobacterium fortuitum* (Asiimwe BB. 2013)

Mycobacterium abscessus complex (MABSC) e le specie appartenenti al *Mycobacterium avium* complex (MAC) sono gli NTM isolati con frequenza crescente negli ultimi anni in pazienti con FC con una prevalenza oscillante fra 3,8% e 22,6% e costituiscono un serio problema terapeutico a causa della loro multi farmaco resistenza (Torrens J. 1998)

Inoltre, il declino della funzione polmonare è notevolmente più accentuato nei pazienti con infezione cronica da MABSC rispetto a quelli infettati da altre specie di NTM (Esther CR. *et al.* 2010)

Per questo motivo, la tipizzazione molecolare risulta oggi indispensabile sia nei pazienti critici sia per coloro in attesa di trapianto polmonare, dato che la riuscita e la prognosi del trapianto sembrano essere correlate alla presenza delle differenti sottospecie di MABSC. Inoltre la colonizzazione da *Mycobacterium abscessus* subsp *abscessus* rappresenta uno dei nuovi maggiori criteri di esclusione dei pazienti dal trapianto, secondo gli ultimi aggiornamenti delle “Clinical Guidelines for the care of children with cystic fibrosis” del 2017.

PROTOCOLLO PRATICO

TIPOLOGIA DEI CAMPIONI

Espettorato

L'espettorato è considerato il Gold-Standard per l'analisi microbiologica delle vie respiratorie in FC. Per i pazienti in grado di produrre espettorato, si raccomanda la raccolta del campione a distanza dal pasto, preferibilmente il mattino, previa esecuzione di un lavaggio orale con acqua sterile o soluzione fisiologica, con l'ausilio di uno spazzolino.

Lavaggio bronco alveolare (BAL)

Il BAL è la tipologia di prelievo che permette di isolare con maggiore precisione i microrganismi delle vie respiratorie profonde in quanto non contaminato, durante il prelievo, dalla flora batterica del cavo orale. Nonostante ciò anche questa tipologia di campione non risulta essere rappresentativo del microbiota dell'intero polmone: inoltre essendo una procedura molto invasiva, la sua esecuzione è raccomandata solo in pazienti critici.

Aspirato nasofaringeo o ipofaringeo

Vista l'invasività e la difficoltà di eseguire di routine un BAL o un bronco-aspirato, per il monitoraggio microbiologico dei pazienti non espettoranti, è accettato l'aspirato naso/ipo faringeo, effettuato impiegando un sondino sterile.

Tampone faringeo

Nei pazienti non in grado di espettorare può essere utile praticare un tampone faringeo, tenendo conto che i risultati potrebbero avere una scarsa sensibilità. Tuttavia, se eseguito correttamente in seguito alla stimolazione di un colpo di tosse, può riflettere con una certa fedeltà il microbiota delle basse vie respiratorie (Ramsey B. *et al.* 1991). Per aumentare/migliorare la sensibilità e permettere una valutazione quantitativa dei microrganismi presenti nel campione si consiglia l'utilizzo di tamponi floccati con terreno di trasporto liquido.

Lavaggio nasale

Nell'ultimo decennio, lo studio delle fasi iniziali dell'infezione da *P. aeruginosa* e la messa a punto dei diversi protocolli di eradicazione del germe ha rappresentato uno dei principali campi di ricerca. Il ruolo delle vie aeree superiori in FC è stato recentemente rivalutato; in molti casi i seni paranasali rappresentano la sede anatomica di prima infezione e il *reservoir* per una successiva diffusione dei germi a livello polmonare (Bonestroo HJ. 2010). E' inoltre ipotizzabile che le alte vie respiratorie rappresentino una nicchia nella quale si possa verificare il progressivo adattamento genetico di *P. aeruginosa*. Sulla base di tali evidenze, alcuni centri effettuano su tutti i pazienti lavaggi nasali e, quando necessario, una pulizia chirurgica dei seni paranasali. L'interesse dei ricercatori e dei clinici per la microbiologia dei seni paranasali sta aumentando in questi ultimi anni e l'analisi della loro colonizzazione può rivestire un'importanza chiave nello studio delle prime fasi dell'infezione, per il monitoraggio della terapia eradicante e nella valutazione dei meccanismi adattativi.

CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI

Tutti i campioni devono essere consegnati al laboratorio in maniera tempestiva, e qualora non fosse possibile una processazione immediata si consiglia di conservarli a 4°C per il minor tempo possibile. Un ritardo nella fase pre-analitica può portare ad un isolamento sovra o sottostimato dei microrganismi “fastidious”, come *S. pneumoniae* ed *H. influenzae*. Nel caso il campione venga processato dopo un tempo prolungato di conservazione in frigorifero o di esposizione a temperatura ambiente si consiglia di riportare nel referto tale criticità.

PERIODICITA' DI ESECUZIONE

Le indagini microbiologiche delle secrezioni respiratorie nei pazienti FC devono avere almeno cadenza trimestrale e devono essere sempre eseguite al momento di una riacutizzazione dell'infezione polmonare.

OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

L'esame microscopico dei campioni di espettorato provenienti da pazienti FC non è ritenuta indispensabile: infatti tali pazienti presentano in genere un'espettorazione abbondante e purulenta, già indice di provenienza dalle basse vie respiratorie. (Nair B. *et al.* 2002) È consigliabile tuttavia eseguire comunque la colorazione con Gram o con Blu di Metilene di un preparato per la reale valutazione dell'idoneità del campione e riportare una nota nel referto. L'esame microscopico mediante colorazione di Gram è anche utile per una prima valutazione della flora microbica presente nel campione. (Burns JL. *et al.* 2014)

ESAME COLTURALE: PROCEDURA

Espettorato

Data la particolare viscosità delle secrezioni bronchiali nei pazienti FC, è necessaria e fortemente raccomandata la fluidificazione dell'espettorato da eseguirsi meccanicamente con omogeneizzatori o con l'utilizzo di mucolitici. Diluire quindi il campione in rapporto 1:5(v/v) con ditiotreitolo, quale mucolitico di prima scelta, e successivamente incubarlo per 60 minuti a temperatura ambiente o 30 minuti in termostato a 35-37°C.

Per la valutazione della carica batterica dei microrganismi, indispensabile per permettere il monitoraggio dell'andamento dell'infezione e l'efficacia della terapia antibiotica, riportiamo le procedure di semina quantitativa e semiquantitativa.

Metodo 1: QUANTITATIVO

1. Seminare il campione dopo fluidificazione operando delle diluizioni scalari di un esponente 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} con fisiologica sterile
2. Seminare, di ogni diluizione, 100 µl su ogni piastra.

Metodo 2: SEMIQUANTITATIVO

E' consigliata in alternativa la tecnica semiquantitativa messa a punto dal Centro Danese FC diretto dal Prof. Høiby:

1. Seminare le piastre usando la tecnica delle "tre zone", depositando:
 - 20 µl del campione fluidificato sui terreni CNA, HAE, MSA, e MCK
 - 100 µl del campione fluidificato sui terreni MCK, SAB e BCSA
2. Strisciare 5 linee avanti e 5 linee indietro per ogni quadrante come di seguito indicato:

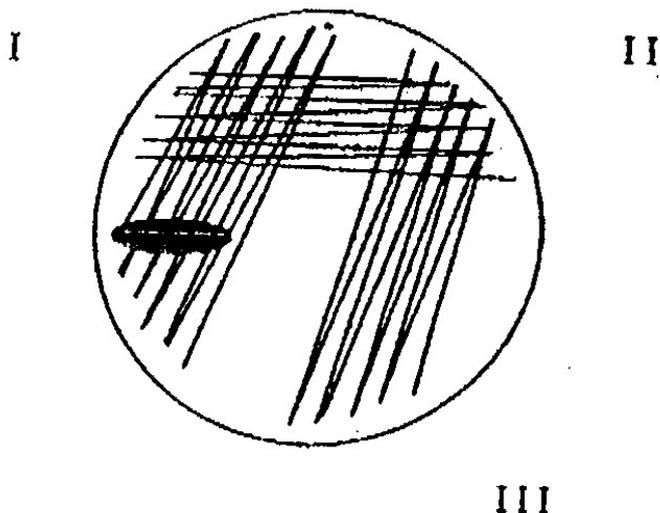


Figura 1- semina con tecnica delle "tre zone"

Valutazione della carica microbica

Quantificare la crescita batterica come segue:

carica semiquantitativa	I quadrante	II quadrante	III quadrante	carica approssimativa (CFU/ml) seminando 20 µl (dopo fluidificazione)
+	< 10			3 10
++	< 10	< 10		4 10
+++	> 10	> 10	< 10	5 10
++++	> 10	> 10	> 10	6 10

Tabella 2- quantificazione della crescita batterica

Quantificare la crescita dei funghi filamentosi come segue:

carica semiquantitativa	n. colonie seminando 100 µl (dopo fluidificazione)
+ (rare colonie)	≤ 10
++ (alcune colonie)	11-30
+++ (crescita confluyente)	>50

Tabella 3 - quantificazione della crescita di funghi filamentosi

Lavaggio broncoalveolare (BAL)

Per i campioni particolarmente viscosi si consiglia la fluidificazione con mucolitici (rapporto 1:1v/v), mentre per campioni eccessivamente diluiti si raccomanda una preventiva centrifugazione a 1800/2000 rpm per 10 minuti; eliminare l'eccesso di sovrantante e risospendere il deposito in 1 ml di liquido.

Seminare quindi 100 µl del campione su ciascun terreno di coltura utilizzando le tecniche precedentemente descritte.

Tampone faringeo in fase liquida

Seminare 100 µl della fase liquida tal quale su ciascun terreno di coltura utilizzando le tecniche precedentemente descritte.

Aspirato nasofaringeo o ipofarangeo

Si consiglia un volume iniziale di circa 5 ml di campione e pretrattarlo con mucolitico (rapporto 1:1) in caso di eccessiva viscosità.

Seminare 100 µl della fase liquida su ciascun terreno di coltura utilizzando le tecniche precedentemente descritte.

Lavaggio nasale

I lavaggi nasali che generalmente prevedono un volume di 10 ml devono essere centrifugati a 3000 rpm per 15 minuti. Eliminare il surnatante conservando 1 ml di pellet e sospendere il deposito del centrifugato nel liquido rimanente.

Seminare 100 µl del liquido rimanente su ciascun terreno di coltura, utilizzando le tecniche precedentemente descritte (Mainz JG *et al.* 2009).

TERRENI DI COLTURA

Per un efficace isolamento di tutti i microrganismi presenti nei diversi campioni riteniamo indispensabili i terreni sotto elencati :

- **agar MacConkey o analoghi** (bacilli gram-negativi)
- **agar sale mannite** (*S. aureus*)
- **agar cioccolato con bacitracina** (*H. influenzae*): l'utilizzo del terreno addizionato con bacitracina è particolarmente raccomandato, in quanto l'isolamento di *Haemophilus* spp. in agar cioccolato non selettivo è spesso reso impossibile dalla contemporanea crescita di *P. aeruginosa*.
- **agar selettivo per *Burkholderia Cepacia complex*** (BCSA, CM, PC, OFPBL): terreni selettivi e differenziali indicati in letteratura, efficaci per l'isolamento di *B. cepacia* complex. (Henry D. *et al.* . 1999; Henry DA. *et al.* 1997) Il loro uso routinario è da ritenersi indispensabile: infatti in mancanza di un terreno selettivo, la presenza di tale patogeno sfugge all'osservazione perché la sua crescita, piuttosto lenta, è mascherata da quella di *P. aeruginosa*.
- **agar BCSA o CM**, utilizzo aggiuntivo:
 - o per la ricerca di Micobatteri a rapida crescita quali *M. abscessus* complex, *M. chelonae* e *M. fortuitum* dopo un periodo di incubazione di 5/15 gg a temperatura ambiente. (Flume PA. 2016; Esther Jr CR. *et al.* 2011)
 - o per la ricerca di alcuni miceti a lenta crescita, come *Scedosporium* spp.
- **agar CNA** (cocchi gram-positivi, in particolare *S. pneumoniae*)
- **agar sangue** (terreno a crescita libera)
- **agar Sabouraud addizionato con cloramfenicolo e gentamicina** (miceti): E' importante, una volta inoculato il terreno micologico, sigillare la piastra con parafilm per evitare sia l'essiccamento del terreno che le contaminazioni. È anche utile, al fine di valutare possibili contaminazioni praticare un taglio dell'agar a $\frac{3}{4}$ della piastra.

Inoltre riteniamo opportuno consigliare l'utilizzo di ulteriori terreni che possono agevolare l'isolamento e l'identificazione di alcuni patogeni .

Terreni consigliati :

- **Scesel+ medium** per un isolamento più selettivo di *Scedosporium Spp.* (Rainer J. *et al.* 2008)
- **Terreni Cromogeni** per l'isolamento e identificazione di *S.aureus* Meticillino-Resistente (Perez LR. *et al.* 2012)

MODALITA' DI INCUBAZIONE

- incubare a 35-37°C in atmosfera arricchita in CO₂ (5%) per 24 ore: Agar cioccolato con bacitracina e Agar CNA.
- esaminare le piastre sopra menzionate dopo 24 ore e procedere ad identificazioni e/o isolamenti;
- re-incubare, in caso di negatività, le piastre di Agar CNA e di Agar cioccolato con bacitracina, e riesaminarle dopo altre 24 ore;
- incubare a 35-37°C in atmosfera aerobia per 48 ore: Mc Conkey Agar, Agar sale mannite, Agar BCSA e Agar Sabouraud addizionato di cloramfenicolo e gentamicina;
- re-incubare a 35-37°C per altre 24 ore l' Agar sale mannite per la ricerca di Small Colony Variant;
- re-incubare, in caso di negatività, le piastre di Agar Mc Conkey , Agar BCSA, Agar Sabouraud addizionato di cloramfenicolo e gentamicina, e riesaminarle dopo altre 24 ore;
- per *B. cepacia*-complex (BCSA, CM, PC, OFPBL) l'incubazione può essere prolungata fino ad una settimana (i primi 3-4 giorni a 35-37°C e poi a temperatura ambiente);
- per *Micobatteri a rapida crescita (RGM)* incubare le piastre di BCSA o CM i primi 3 gg a 37°C e poi a temperatura ambiente per un massimo di 15 gg.
- per i funghi filamentosi, incubare la piastra di Sabouraud i primi 3 gg a 37°C e poi a temperatura ambiente per 3 settimane, osservandolo per la 1^a settimana ogni 48 ore e poi ogni 7 gg, poiché alcuni miceti possono richiedere per svilupparsi un tempo prolungato.

Le modalità di incubazione sono riassunte sulla seguente tabella:

Germi da ricercare	Terreni	incubazione 24h	incubazione 48h	incubazione 72h	incubazione 7 giorni	incubazione 15 giorni	incubazione 21 giorni
<i>H. influenzae</i>	Agar cioccolato + Bacitracina	35-37°C in CO ² (5-10%)	<u>se neg a 24h</u> 35-37°C in CO ² (5-10%)				
<i>S. pneumoniae</i> <i>S. pyogenes</i>	CNA + optochina	35-37°C in CO ² (5-10%)	35-37°C in CO ² (5-10%) se negativo a 24h				
<i>P. aeruginosa</i> <i>A. xylooxidans</i> <i>S. malthophilia</i> altri gram- non fermentanti	McConkey agar	-	35-37°C aerobiosi	<u>se neg a 48h</u> 35-37°C aerobiosi			
<i>S. aureus</i>	Agar sale mannite	-	35-37°C aerobiosi	35-37°C aerobiosi (per isolamento di <i>S.aureus</i> SCV)			
<i>B. cepacia</i> complex	Agar selettivo per B.cepacia (BCSA, CM, PC, OFPBL)	-	35-37°C aerobiosi	<u>se neg a 48h</u> 35-37°C aerobiosi	<u>se neg a 72h</u> temperatura ambiente		
Micobatteri a Rapida Crescita (RGM)	Agar selettivo per B.cepacia (BCSA, CM)	-	35-37°C aerobiosi	<u>se neg a 48h</u> 35-37°C aerobiosi	<u>se neg a 72h</u> temperatura ambiente	<u>se neg dopo 7 giorni</u> temperatura ambiente	
Funghi filamentosi	Agar Sabouraud + gentamicina e CAF	-	35-37°C aerobiosi	<u>se neg a 48h</u> 35-37°C aerobiosi	<u>se neg a 72h</u> temperatura ambiente	<u>se neg dopo 7 giorni</u> temperatura ambiente	<u>se neg dopo 15 giorni</u> temperatura ambiente

Tabella 4 - Schema riassuntivo per lo screening delle piastre

INDICAZIONI PROCEDURALI SPECIFICHE

Staphylococcus aureus meticillino-sensibile (MSSA)

S. aureus è un germe che si ritrova a livello delle cavità nasali del 10% della popolazione sana; la sua facilità a colonizzare le vie aeree dei pazienti fibrocistici (con una prevalenza del 68%) è legata all'alto contenuto di NaCl delle secrezioni. Poiché è stato osservato che i primi batteri che colonizzano il polmone FC sono *S.aureus* e *H.influenzae*, seguiti successivamente da *P. aeruginosa*, è stato ipotizzato che i primi possano fungere da triggers, così da facilitare la successiva colonizzazione delle vie aeree da parte di *P. aeruginosa*.

È importante isolare, identificare e refertare con carica la presenza di MSSA nei campioni delle basse vie respiratorie

Si consiglia di valutare l'esecuzione dell'antibiogramma con il clinico, seguendo comunque le indicazioni fornite da EUCAST.

Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA)

Staphylococcus aureus meticillino-resistente (MRSA) è un patogeno nosocomiale isolato con frequenza crescente anche nei pazienti FC (prevalenza che va dal 3% in Europa, al 7,5% in Italia e al 25% in USA) (Cocchi P. *et al.* 2011). Classicamente le infezioni in ambito nosocomiale sono dovute a ceppi di MRSA denominati "di acquisizione ospedaliera" (HA-MRSA), tuttavia un'altra tipologia di MRSA nota per causare infezioni comunitarie (CA-MRSA) sta attualmente rimpiazzando i ceppi HA-MRSA. Tali ceppi CA-MRSA sono attualmente causa di gravi infezioni a causa del loro alto grado di patogenicità. I ceppi di CA-MRSA e HA-MRSA si distinguono grazie ad una diversa struttura dell'elemento genetico responsabile della meticillino-resistenza (SCC*mec*). Per caratterizzare i singoli cloni di MRSA ai fini epidemiologici viene eseguita la genotipizzazione mediante Multi-Locus-Sequence-Typing o Spa-Typing che unitamente alla caratterizzazione SCC*mec* permette di valutare l'appartenenza dei singoli ceppi a cloni epidemici noti. Per una ulteriore caratterizzazione della patogenicità di alcuni ceppi può essere testata l'eventuale produzione di tossine, quali: la Leucocidina Pantone-Valentine, le Enterotossine A, B, C, D ed E, le tossine Esfoliative A e B, la tossina-1 della Sindrome da Shock Tossico Mehrotra M. *et al.* , 2000). Lo studio del background genetico dei ceppi di MRSA che colonizzano i pazienti con necessità di un approccio molecolare specifico da demandare a laboratori specializzati.

MRSA è sensibile solo a pochissimi agenti chemioterapici: è quindi di fondamentale importanza effettuare un corretto screening della meticillino-resistenza su tutti i ceppi di *S. aureus* utilizzando specifici terreni cromogeni e/o metodi indicati da EUCAST 2018 (The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017-07-11)).

Staphylococcus aureus “Small Colony Variant” (SCVs)

La variante small colony di *S. aureus* raggiunge in FC una prevalenza dell'8% (Kahl *et al.* 2016) fenotipi SCV sono stati riscontrati con una elevata frequenza fra i ceppi MRSA (Suwantararat N. *et al.* 2018).

Le SCVs rappresentano una popolazione batterica molto eterogenea a causa delle loro insolite caratteristiche fisiologiche, metaboliche e morfologiche; è quindi estremamente importante utilizzare appropriati accorgimenti colturali per favorirne la crescita (microaerofilia). Date le loro peculiari caratteristiche biochimiche (auxotrofismo per emina, menadione e/o timidina), queste varianti fenotipiche sono caratterizzate da colonie piccole a lenta crescita, non pigmentate, con una zona di beta-emolisi ridotta o assente. Per tale motivo dovrebbero essere (sub) coltivate su agar sangue Columbia, meglio se incubate in atmosfera arricchita di CO₂, che ne favorisce la crescita. Su terreni selettivi o su agar cromogenici, molte SCV non determinano alcuna cambiamento di colore del medium e generalmente, su agar sale mannite, non sviluppano la caratteristica colorazione color oro, propria di *S. aureus*. Inoltre, dato il basso tasso di crescita, l'incubazione dovrebbe essere protratta fino alle 72 ore.

Dal punto di vista fenotipico, le SCV possono presentare vari morfotipi, incluso l'insolito aspetto "a uovo fritto", con bordi traslucidi e un centro pigmentato più piccolo e rialzato. Tutti gli isolati devono essere sempre identificati e definiti per il profilo di sensibilità.

Questi ceppi possono essere identificati a livello di specie utilizzando gli stessi approcci che si usano per *S. aureus*. Tuttavia, a causa delle loro caratteristiche metaboliche, i test biochimici di identificazione manuali o automatizzati spesso non forniscono risultati o portano ad una mis identificazione. Per quanto riguarda il test di agglutinazione al lattice, il tempo di agglutinazione può essere leggermente più lungo. E' raccomandato l'utilizzo della spettrometria di massa con tecnologia Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) che è stato dimostrato fornire risultati affidabili per questo tipo di varianti (Gröbner S. *et al.* 2012).

Le SCVs sono in genere altamente resistenti, in particolare agli aminoglicosidi e al cotrimossazolo, caratteristiche queste strettamente associate ai trattamenti antibiotici a lungo termine. Inoltre hanno un vantaggio selettivo grazie alla loro capacità di persistere nelle cellule eucariotiche che le proteggono dalle difese dell'ospite e dall'attività degli antibiotici. L'esecuzione dei test di suscettibilità risulta problematica: essendo microrganismi a lenta crescita non è possibile utilizzare metodiche automatizzate o semiautomatizzate. Per le caratteristiche auxotrofiche, anche l'esecuzione di test in microdiluzione può portare a risultati non validi. Per quanto riguarda i terreni standard raccomandati per l'esecuzione degli antibiogrammi tramite agar diffusione, la maggior parte delle SCVs non cresce su Mueller-Hinton Agar, ed è necessario utilizzare Mueller-Hinton Agar addizionato con sangue di montone al 5%. (Besier S. *et al.* 2007) Per l'interpretazione dei risultati ottenuti dai test di disco diffusione si raccomanda di riferirsi a (EUCAST 2018-Versione 8.0, del 2018-01-01).

Haemophilus influenzae

H. influenzae, insieme a *S. aureus*, è uno dei primi microrganismi a colonizzare le vie aeree dei pazienti FC; nei bambini più piccoli, in particolare, può sostenere infezioni acute, spesso in associazione con *S. aureus*. (Harrison F. *et al.* 2007). Tra i diversi sierotipi, i ceppi non capsulati sono i più frequenti (Murphy T.F. *et al.* 2009).

In letteratura è riportata una prevalenza del 34%, senza nessuna differenza significativa tra la popolazione adulta e quella pediatrica. Un mancato isolamento di questo microrganismo può essere legato al mancato utilizzo di un terreno selettivo. La corretta identificazione può basarsi su metodiche convenzionali quali la richiesta per la crescita dei fattori X (emina) e V (*nicotinammide adenina di nucleotide* - NAD), identificazione biochimica oppure utilizzando la spettrometria di massa MALDI-TOF (Hinz R. *et al.* 2015).

L'antibiogramma per *H. influenzae* dovrebbe essere eseguito solo sui ceppi beta-lattamasi produttori e/o su richiesta specifica del clinico utilizzando le tabelle con i breakpoint di riferimento (EUCAST - Versione 8.0, del 2018-01-01)

Streptococcus pneumoniae

La prevalenza di *S. pneumoniae* nei pazienti FC è compresa tra il 5-20% sia in Europa che negli USA; l'isolamento è più frequente nei bambini al di sotto dei 10 anni di età. L'infezione e/o colonizzazione è solitamente transiente, ma è spesso associata ad esacerbazioni della patologia polmonare.

La prevalenza dei sierotipi di *S. pneumoniae* è cambiata dopo l'introduzione del vaccino anti-pneumococcico coniugato 13-valente. La vaccinazione ha però fatto emergere cloni non vaccinali che esprimono antibiotico-resistenza (Torres A. *et al.* 2015). Una corretta identificazione può essere eseguita utilizzando la sensibilità all'optochina e/o mediante l'uso della spettrometria di massa MALDI-TOF (Werno AM. *et al.* 2012).

Il largo uso di antimicrobici Beta-lattamici e macrolidi in terapia nei soggetti FC ha determinato un aumento della resistenza agli antibiotici. Pertanto, mentre l'antibiogramma per *S. pneumoniae* dovrebbe essere eseguito solo su richiesta specifica del clinico, a fini epidemiologici può essere utile saggiare la resistenza ai beta-lattamici secondo le indicazioni di EUCAST (EUCAST 2018Versione 8.0, del 2018-01-01) su tutti gli isolati di *S. pneumoniae*.

BATTERI GRAM NEGATIVI NON FERMENTANTI

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) è il microrganismo più comune nei pazienti con FC e la sua prevalenza aumenta con l'età fino a raggiungere il 72% in età adulta. Al momento della prima acquisizione, la carica batterica è generalmente bassa, gli isolati sono di fenotipo wild-type e suscettibile agli antibiotici. In questa fase la percentuale di successo del trattamento eradicante secondo protocolli internazionali è alta e oscilla mediamente intorno all'85%. (Langton HSC. e Smyth AR. 2017)

Il germe può dirsi eradicato, quando almeno tre colture consecutive delle vie aeree sono negative in un periodo di almeno sei mesi. Quando il germe ricompare nell'espettorato entro un intervallo di tempo inferiore a 6 mesi dalla fine del trattamento è ipotizzabile che non si sia verificata eradicazione, ma piuttosto una ricrescita dello stesso ceppo. Una seconda infezione può essere sostenuta o da un ceppo esogeno di *P. aeruginosa* oppure da ceppi di *P. aeruginosa* presenti a livello dei seni paranasali in grado di diffondere fino alle basse vie respiratorie.

Il trattamento eradicante dei pazienti intermittenti (meno del 50 % degli esami colturali delle vie respiratorie sono positivi in un anno a *P. aeruginosa*) può essere effettuato ripetutamente con successo ritardando lo sviluppo di una infezione cronica.

La mancata eradicazione di *P. aeruginosa* dal polmone FC comporta la cronicizzazione dell'infezione, con il progressivo declino della funzionalità polmonare.

Con la persistenza dell'infezione, *P. aeruginosa* va incontro a cambiamenti genetici e fenotipici, adattandosi al polmone FC. Tale processo comporta una progressiva espressione di diversi fenotipi: forme mucoidi iperproduttrici di alginato, colonie puntiformi (1-3 mm di diametro) a lenta crescita (SCV), varianti fenotipiche prive dei caratteristici pigmenti e varianti auxotrofe. Tutte le varianti di PA presenti in un campione devono essere isolate, identificate e testate per l'antibioticosensibilità.

In particolare, *P. aeruginosa* SCV, la cui comparsa è favorita dalle frequenti terapie con aminoglicosidi, può presentare antibiotico-resistenza a diverse classi di farmaci fino alla panresistenza. (Evans TJ. 2015.)

Isolamento ed identificazione

Le colonie di *P. aeruginosa* possono essere identificate in via presuntiva in base alla positività al test dell'ossidasi, alla produzione di pigmento e al caratteristico odore. Tuttavia, alcuni ceppi di *P. aeruginosa*, in particolare quelli mucoidi, possono mostrare una reazione lenta al test dell'ossidasi. I sistemi automatizzati commerciali si sono dimostrati generalmente inadatti per l'identificazione dei ceppi di *P. aeruginosa* mucoidi e SCV. Una valida alternativa all'identificazione biochimica è rappresentata dall'utilizzo del MALDI-TOF MS, che consente l'identificazione rapida ed affidabile degli isolati. (de Mello H. *et al.* 2014).

La presenza di *P. aeruginosa* deve essere sempre segnalata al clinico, indipendentemente dalla carica batterica. (Bushra A *et al.* 2013)

Test di chemiosensibilità

I test di sensibilità agli antibiotici di *P. aeruginosa* presentano alcune criticità e dovrebbero essere effettuati in Brodo Diluizione con metodica manuale o sistemi semiautomatici (micropiastre con lettore manuale) che permettono di variare il tempo di incubazione in relazione ai tempi di crescita dei diversi ceppi, e di ottenere valori reali di MIC, fondamentali per impostare una corretta terapia antibiotica. Qualora non sia possibile eseguire tali metodiche su fenotipi critici è consigliato utilizzare la metodica di disco diffusione su Mueller-Hinton agar con incubazione a 35°C per 18 ore. Se si osserva una crescita scarsa prolungare l'incubazione, fino ad un tempo massimo di 24 ore. Per i ceppi auxotrofi che non crescono in Mueller-Hinton agar si può utilizzare Mueller-Hinton agar addizionato con sangue di montone al 5% (CLSI 2018, Tab 2B-1 *Pseudomonas aeruginosa*).

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)		Concentrazione dischetto (µg)	Diametro zona breakpoint (mm)	
	S ≤	R >		S ≥	R <
Penicilline					
Piperacillina-tazobactam	16	16	30-6	18	18
Cefalosporine					
Cefepime	8	8	30	21	21
Ceftazidime	8	8	10	17	17
Ceftazidime-avibactam	8	8	10-4	17	17
Ceftalozane-tazobactam	4	4	30-10	24	24
Carbapenemi					
Imipenem	4	8	10	20	17
Meropenem	2	8	10	24	18
Monobattamici					
Aztreonam	1	16	30	50	16
Fluorchinoloni					
Ciprofloxacina	0.5	0.5	5	26	26
Levofloxacina	1	1	5	22	22
Aminoglicosidi					
Amikacina	8	16	30	18	15
Gentamicina	4	4	10	15	15
Tobramicina	4	4	10	16	16
Agenti miscellanee					
Colistina*	2	2	-	-	-
Fosfomicina**	-	-	-	-	-

Tabella 5 - Breakpoint *P. aeruginosa*

(EUCAST 2018-Versione 8.0, del 2018-01-01)

*Si ricorda che per saggiare la sensibilità alla colistina, attualmente, l'unico metodo raccomandato è la microdiluzione in brodo (BMD) (EUCAST version 8.0) in quanto gli altri metodi non sono affidabili a causa della scarsa diffusione nell'agar dovuta all'ingombro sterico della colistina.

**Fosfomicina in FC può essere utilizzata in associazione con altri antibiotici, anche se EUCAST non prevede criteri interpretativi specifici per *P. aeruginosa*. Tuttavia è possibile testare con agar diluizione tale molecola, riferendosi al valore EUCAST di ECOFF, pari ad una MIC di 128 mg/L (corrispondente ad un alone di inibizione di 12 mm utilizzando il dischetto alla concentrazione di 200 µg).

Burkholderia cepacia complex (Bcc)

Attualmente il *B. cepacia* complex comprende 22 specie che presentano un elevato grado di somiglianza per sequenza genica: *B. cepacia* (genomovar I), *B. multivorans* (genomovar II), *B. cenocepacia* (genomovar III), *B. stabilis* (genomovar IV), *B. vietnamiensis* (genomovar V), *B. dolosa* (genomovar VI), *B. ambifaria* (genomovar VII), *B. anthina* (genomovar VIII), *B. pyrrocinia* (genomovar IX), *B. ubonensis* (genomovar X), *B. latens*, *B. diffusa*, *B. arboris*, *B. seminalis*, *B. metallica*, *B. contaminans*, *B. lata* e *B. pseudomultivorans*, *B. stagnalis*, *B. territorii*, *B. paludis* e *B. puraquae*. Alcune specie sono state associate a focolai epidemici, come *B. cenocepacia* che ha causato polmoniti fulminanti in vari centri FC. Per questo la diagnosi precoce ed accurata della prima colonizzazione da *B. cepacia* complex è di vitale importanza per attuare protocolli di segregazione atti ad evitare infezioni crociate. L'infezione con alcuni genomovar del *B. cepacia* complex può inoltre essere considerata una controindicazione al trapianto polmonare.

Come per gli altri microrganismi descritti, anche nel caso di *B. cepacia* complex ci possono essere delle variabilità fenotipiche con morfologie diverse delle colonie, incluse varianti mucoidi e SCV.

I dati riportati dalla CF Foundation Patient Registry indicano che la prevalenza di *B.cepacia complex* è significativamente diminuita dal 2006 al 2012, fino al 2.6% (Salsgiver EL *et al.* 2016). In Italia la prevalenza di BCC è di 2.9%. Uno studio inglese (Kenna DTD. *et al.* 2017) al contrario riporta una prevalenza di *B.cenocepacia* del 15%.

Isolamento e identificazione

L'identificazione dei microrganismi che appartengono al *B. cepacia* complex (Bcc) presenta notevoli difficoltà, infatti l'identificazione biochimica effettuata con sistemi manuali e automatizzati, forniscono spesso risultati errati.

La nuova tecnologia MALDI-TOF MS può essere utilizzata per l'identificazione a livello di specie di alcuni microrganismi del Bcc. Tuttavia l'approccio molecolare è ritenuto il metodo di riferimento per la corretta identificazione dei microrganismi del Bcc. Tramite il sequenziamento del gene *recA* è possibile identificare le 22 specie appartenenti al complex. (Teri A. *et al.* 2018)

L'identificazione molecolare è raccomandata:

1. Al momento della prima colonizzazione per confermare che il microrganismo appartenga al *B. cepacia* complex e per l'identificazione della specie.
2. Almeno una volta l'anno nel caso di pazienti colonizzati cronicamente in quanto si possono verificare variazioni nella specie.
3. In caso di pazienti in lista di trapianto polmonare in quanto la colonizzazione con alcuni membri del complex più aggressivi, quali *B. cenocepacia*, può essere considerata una controindicazione per il trapianto stesso (Aris RM *et al.* 2001).

Qualora non sia possibile effettuare la tipizzazione molecolare in loco si raccomanda di rivolgersi a laboratori di riferimento.

Test di chemiosensibilità

L'esecuzione dei test di suscettibilità risulta problematico: bisogna tener conto che questo microrganismo possiede diverse resistenze intrinseche (Expert Rules and intrinsic resistance version 3.1) e che l'unico test che potrebbe fornire risultati riproducibili è la microdiluizione in brodo. Tuttavia EUCAST non fornisce alcun breakpoint specie-specifico per nessun antibiotico, ma in alcuni casi e per antibiotici selezionati possiamo fare riferimento alle tabelle Eucast PK/PD e ai breakpoint CLSI (M100 ED28:20118 Tab 2B-3). In ogni caso nelle linee guida EUCAST specifiche per *B. cepacia* (Guidance Documents in susceptibility testing, *Burkholderia cepacia* group, 20 July 2013), non si raccomanda alcun test di suscettibilità per uso clinico.

Da una revisione della letteratura, vista l'importanza del trattamento antibiotico nei confronti di Bcc, si raccomanda l'utilizzo degli antibiotici elencati in tabella mediante microdiluizione in brodo. (Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine Vol. 36 No. 1/2015)

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici, che si raccomanda di testare, con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)			Regole Interpretative
	S ≤	I	R >	
Cefalosporine				
Cefepime	4	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Ceftazidime	4	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Ceftazidime-avibactam*	8	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Ceftalozane-tazobactam*	4	-	4	PK/PD (EUCAST2018)
Carbapenemi				
Imipenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Meropenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Monobattamici				
Aztreonam	1	-	16	PK/PD (EUCAST2018)
Fluorchinoloni				
Levofloxacina	0,5	-	1	PK/PD (EUCAST2018)
Tetraciclina				
Tigeciclina	0,25	-	0,5	PK/PD (EUCAST2018)
Minociclina	4	8	16	CLSI 2018
Diaminopirimidine				
Trimetoprim/Sulfametossazolo	2/38	-	4/76	CLSI 2018

Tabella 6 - Breakpoint per *B.cepacia* complex (EUCAST 2018 PK/PD Versione 8.0, valide dal 2018-01-01) (CLSI M100 ED28:20118 Tab 2B-3.)

*(Mazer DM. *et al.* 2017; Tamma PD. *et al.* 2018)

Stenotrophomonas maltophilia

Isolamento e identificazione

Stenotrophomonas maltophilia (*S. maltophilia*) è un batterio Gram negativo, aerobio, non sporigeno, mobile, patogeno opportunista e ubiquitario in natura. Considerato a lungo un germe poco virulento, è attualmente riconosciuto come patogeno nosocomiale in pazienti con FC e immunodepressi. Le prime segnalazioni del germe risalgono agli anni settanta, cui sono seguite sporadiche segnalazioni fino agli ultimi anni in cui l'isolamento del germe è diventato molto frequente. La prevalenza di *S. maltophilia* è progressivamente incrementata fino a valori del 1530% in alcuni centri europei, del 10% in centri americani, (Hector A. 2016) e del 13% in Italia, come riportato dai centri di riferimento.

L'isolamento di *S. maltophilia* dalle secrezioni delle basse vie aeree di pazienti con fibrosi cistica può essere, in alcuni casi, laborioso soprattutto per la presenza concomitante di altri patogeni a crescita più rapida e con carica elevata. Sebbene alcuni ceppi siano particolarmente esigenti e richiedano fattori di crescita come emina, metionina e acido nicotinico, in generale i media maggiormente utilizzati nella pratica routinaria sono terreni completi, come agar sangue di montone al 5%, e terreni selettivi per batteri gram negativi, come agar McConkey.

L'identificazione di *S. maltophilia*, può essere effettuata attraverso test biochimici, sebbene allo stato attuale l'identificazione biochimica è stata sostituita quasi completamente dalla spettrometria di massa.

Test di chemiosensibilità

Diversi meccanismi di resistenza, sia innati che acquisiti, rendono *S. maltophilia* resistente a diverse classi di antimicrobici: betalattami, chinoloni, carbapenemi cefalosporine; tuttavia è abbastanza frequente l'isolamento di ceppi sensibili al ceftazidime (fino al 53%). EUCAST fornisce i breakpoint solo per Trimetoprim/sulfametossazolo (TSM), per gli altri antibiotici si è deciso di utilizzare i PK/PD dopo un attento esame dei dati disponibili in letteratura (Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine Vol. 36 No. 1/2015)

Trimetoprim/sulfametossazolo (TSM), a lungo il farmaco di scelta per il trattamento delle infezioni da *S. maltophilia*, è attivo in una percentuale di ceppi variabile dal 34,4% al 90%. La resistenza a TSM per acquisizione dei geni *sul* è segnalata con frequenza sempre maggiore in tutti i Paesi. (Iain J. 2015).

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)			Concentrazione dischetto (µg)	Diametro zona breakpoint (mm)		Regole Interpretative
	S □	I	R >		S □	R <	
Cefalosporine							
Ceftazidime	4		8	-	-	-	PK/PD (EUCAST 2018)
Fluorchinoloni							
Ciprofloxacina	0,25		0,5	-	-	-	PK/PD (EUCAST 2018)
Levofloxacina	0,5		1	-	-	-	PK/PD (EUCAST 2018)
Tetracicline							
Minociclina	4	8	16	-	-	-	CLSI 2018
Tigeciclina	0,25		0,5	-	-	-	PK/PD (EUCAST 2018)
Agenti Miscellanee							
Trimetoprim/ sulfametossazolo *	4		4	1,25-23,75	16	16	CLSI 2018

*Standards di riferimento per *Stenotrophomonas maltophilia*

Tabella 7 - Breakpoint per *S.maltophilia* e Breakpoint PK/PD
EUCAST 2018 (Versione 8.0, valide dal 2018-01-01)
(CLSI M100 ED28:20118 Tab 2B-4.)

Achromobacter xylosoxidans

E' un genere appartenente alla famiglia delle Alcaligenaceae i cui componenti sono bacilli gram negativi, aerobi, non fermentanti il lattosio su agar McConkey. La prevalenza di *Achromobacter xylosoxidans* nell'ultima decade è progressivamente aumentata fino a valori del 4-7% in alcuni centri europei, 23% in centri americani e 10-13% in alcuni centri italiani (Talbot NP. 2016; Parkins MD. 2015) E' un patogeno opportunista spesso erroneamente identificato come appartenente al *Burkholderia cepacia* complex. L'errata attribuzione di questo patogeno al genere *Burkholderia* o *Pseudomonas* e viceversa può avere importanti ripercussioni sia sul piano clinico sia epidemiologico. Sebbene il ruolo patogeno di *A. xylosoxidans* non sia perfettamente definito, in letteratura sono riportate evidenze dell'associazione tra colonizzazione cronica e decorso clinico dei pazienti peggiore (Mathy V. 2018)

Isolamento e identificazione

I metodi di identificazione biochimica effettuata con sistemi manuali e automatizzati non sono affidabili; l'utilizzo della spettrometria di massa garantisce una identificazione corretta solo a livello di genere e per alcune specie. Per una più approfondita analisi e identificazione a livello di specie è necessario ricorrere all'utilizzo di tecniche molecolari come l'rRNA 16S. Con l'applicazione di tecniche molecolari è possibile suddividere il genere *Achromobacter* in 15 specie tra le quali *A.ruhlandii* e *A.dolens* che sono quelle più frequentemente responsabili di infezione dopo *A.xylosoxidans*. (Gade SS. 2017)

Test di chemiosensibilità

A. xylosoxidans è un microrganismo comunemente resistente a diversi antibiotici sia per resistenza intrinseca sia acquisita. (Expert Rules and intrinsic resistance version 3.1) E' intrinsecamente resistente alla maggior parte delle cefalosporine, ma anche la Fosfomicina, i Fluorochinoloni e l'Aztreonam risultano poco efficaci.

Gli antibiotici che "in vitro" risultano più attivi sono Imipenem, Meropenem, PiperacillinaTazobactam, Minociclina e Cotrimossazolo. Tuttavia EUCAST non fornisce alcun breakpoint specie-specifico per nessun antibiotico, ma in alcuni casi e per antibiotici selezionati si può fare riferimento ai breakpoint PK/PD o ai breakpoint CLSI (M100 ED28:20118 Tab 2B-5). Da una revisione della letteratura, vista l'importanza del trattamento antibiotico nei confronti di *A. xylosoxidans*, si raccomanda l'utilizzo degli antibiotici elencati in tabella mediante microdiluzione in brodo considerato l'unico test che potrebbe fornire risultati riproducibili.

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)			Regole Interpretative
	S ≤	I	R >	
Cefalosporine				
Cefepime	4	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Ceftazidime	4	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Carbapenemi				
Imipenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Meropenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST2018)
Penicilline				
Piperacillina/tazobactam	4	-	16	PK/PD (EUCAST2018)
Fluorchinoloni				
Levofloxacin	0,5	-	1	PK/PD (EUCAST2018)
Ciprofloxacina	0,25	-	0,5	PK/PD (EUCAST2018)
Tetracicline				
Tigeciclina	0,25	-	0,5	PK/PD (EUCAST2018)
Minociclina	4	8	16	CLSI 2018
Agenti Miscellanee				
Trimetroprim/Sulfametossazolo	2/38	-	4/76	CLSI 2018
Colistina	IE		IE	

Tabella 8 - Breakpoint per *A. xylosoxidans*
 EUCAST PK/PD 2018 (Versione 8.0, valide dal 2018-01-01)
 (CLSI M100 ED28:2018 Tab 2B-5.)

BATTERI GRAM NEGATIVI NON FERMENTANTI “ BURKHOLDERIA CEPACIA-LIKE”

Questo gruppo di batteri non comuni possono essere confusi con i membri del Bcc: *Pandoraea* spp *Ralstonia* spp., *Cupriavidus* spp., *Inquilinus* spp. e *B. gladioli*. Nonostante la patogenicità di tali microrganismi rimanga sconosciuta dati recentemente pubblicati suggeriscono che la colonizzazione possa essere responsabile di un peggioramento della sintomatologia clinica. (LiPuma JJ. 2010) In quest’ottica è comprensibile la crescente attenzione rivolta a queste specie. Crescono lentamente su Mc-Conkey e sui terreni selettivi per Bcc a 35-37°C (tranne *Cupriavidus* che non cresce su BCSA) formando delle colonie piccole e circolari.

Sono di difficile identificazione in quanto i metodi biochimici non sono affidabili, ma l’utilizzo di MALDI-TOF MS garantisce una identificazione accurata a livello di genere. Per una più approfondita analisi e identificazione a livello di specie è necessario ricorrere a tecniche molecolari. L’importanza di una corretta identificazione è legata non solo allo studio epidemiologico dei nuovi patogeni emergenti isolati in pazienti FC ma soprattutto alla sorveglianza e al monitoraggio di eventuali out-break e allo studio di possibili fenomeni di trasmissione e del ruolo in caso di esacerbazione.

I microrganismi “*Burkholderia cepacia-like*” presentano diversi pattern di resistenza agli antibiotici. Eucast non fornisce alcun breakpoint specie-specifico per nessun antibiotico, ma in alcuni casi e per antibiotici selezionati si può fare riferimento ai breakpoint PK/PD e ai breakpoint CLSI (M100 ED28:20118 Tab 2B-5).

Il test di sensibilità agli antibiotici verrà effettuato soltanto su richiesta del clinico per pazienti critici utilizzando metodiche di microdiluzione in brodo.

Pandorea spp.

Il genere *Pandorea* è formato da bacilli gram negativi non fermentanti, non sporigeni e mobili, precedentemente appartenenti al *Burkholderia cepacia* complex e descritti per la prima volta nel 2000 da Coenye. Spesso identificati erroneamente come PA o Bcc, appartengono al genere *Pandorea* 9 specie di cui solo 5 riconosciute e classificate: *P. apista*, *P. pulmonicola*, *P. pnomenusa*, *P. sputorum* e *P. norimbergensis*. (Degand N. et al. 2015) Possono causare infezioni gravi, colonizzazioni croniche e risultano spesso multi resistenti, ma fattori di virulenza e meccanismi di patogenicità sono ancora poco noti. (Martínez-Lamas L. et al. 2011)

Test di chemiosensibilità

Il genere *Pandorea* è da considerarsi come MDR, sensibile solamente alle tetracicline, imipenem, meropenem, ciprofloxacina, cotrimoxazolo, e piperacillina-tazobactam. (Degand N. et al. 2015) Dati di letteratura indicano piperacillina-tazobactam, in associazione con imipenem come l’unica terapia efficace. (Martínez-Lamas L. et al. 2011)

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)			Regole interpretative
	S ≤	I	R >	
Carbapenemi				
Imipenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST 2018)
Meropenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST 2018)
Penicilline				
Piperacillina/tazobactam	4	-	16	PK/PD (EUCAST 2018)
Fluorchinoloni				
Ciprofloxacina	0,25	-	0,50	PK/PD (EUCAST 2018)
Tetraciclina				
Tigeciclina	0,25	-	0,5	PK/PD (EUCAST 2018)
Minociclina	4	8	16	CLSI 2018
Diaminopirimidine				
Trimetoprim/Sulfametossazolo	2/38	-	4/76	CLSI 2018

Tabella 9 - Breakpoint per *Pandorea spp.*

EUCAST 2018 (Versione 8.0, valide dal 2018-01-01)

(CLSI M100 ED28:20118 Tab 2B-5.)

Ralstonia spp.

Il genere *Ralstonia* comprende al momento 16 specie, e 3 sottospecie. La Fibrosi Cistica è considerato uno dei maggiori fattori di rischio per l'infezione da *Ralstonia* spp, in particolare da *Ralstonia pickettii*, *R. insidiosa* e *R. mannitolytica* (Lipuma JJ. 2010) Alcuni studi hanno dimostrato un potenziale ruolo patogeno di *Ralstonia* spp in quanto responsabile del deterioramento polmonare in pazienti FC (Hutchison et al. 2000).

Test di chemiosensibilità

Il genere *Ralstonia* risulta generalmente resistente ad alcune classi di antibiotici tra i quali betalattamici (benzilpenicillina, cefalosporine, ceftazidime, aztreonam, carbapenemi) e aminoglicosidi. Dati di letteratura indicano utili per il trattamento il cotrimoxazolo, la ciprofloxacina, la piperacillina-tazobactam in associazione con tobramicina, per la sua azione battericida. (Prior Ar. 2017; Ryan MP 2013)

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)			Regole interpretative
	S ≤	I	R >	
Penicilline				
Piperacillina/tazobactam	4	-	16	PK/PD (EUCAST 2018)
Aminoglicosidi				
Tobramicina	4	8	16	CLSI 2018
Fluorchinoloni				
Ciprofloxacina	0,25	-	0,50	PK/PD (EUCAS T2018)
Diaminopirimidine				
Trimetoprim/Sulfametossazolo	2/38	-	4/76	CLSI 2018

Tabella 10 - Breakpoint per *Ralstonia* spp.

EUCAST 2018 (Versione 8.0, valide dal 2018-01-01)

CLSI M100 (Tab2B-5) ED28: 20018

Inquilinus spp.

Inquilinus limosus è un bacillo gram-negativo a lenta crescita, ossidasi positivo e non fermentante il lattosio, spesso identificato erroneamente come *Pseudomonas aeruginosa*. Poco si conosce circa l'habitat e il ruolo patogenetico di *Inquilinus limosus*, altro microrganismo ambientale isolato da pazienti affetti da FC. (Coenye T *et al.* 2002)

La sua patogenicità e il suo significato clinico sono poco conosciuti, e non sembra esserci una chiara evidenza per quanto riguarda la trasmissione interumana. McHugh KE 2016 Alcuni “case report” dimostrano un potenziale ruolo patogeno di *Inquilinus limosus* in quanto responsabile di infezioni gravi e colonizzazioni croniche.

(McHugh KE 2016 ; Poore TS, 2018)

Test di chemiosensibilità

Inquilinus limosus è da considerarsi come MDR, resistente a cefepime, ceftazidime, piperacillina/tazobactam, trimetoprim/sulfametossazolo, colistina. (Chiron *et al.* 2005; Hayes *et al.* 2009; Kiratisin *et al.* 2006; Pitulle *et al.* 1999; Salvador-Garcia *et al.* 2013; Wellinghausen *et al.* 2005).

(Cicatiello AG. *et al.* 2014) Dati di letteratura indicano una sensibilità variabile a ciprofloxacina, amikacina, imipenem, meropenem e tobramicina. (McHugh KE 2016)

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)			Regole interpretative
	S ≤	I	R >	
Fluorochinoloni				
Ciprofloxacina	0,25	-	0,50	PK/PD (EUCAST 2018)
Carbapenemi				
Imipenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST 2018)
Meropenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST 2018)
Aminoglicosidi				
Amikacina	16	32	64	CLSI 2018
Tobramicina	4	8	16	CLSI 2018

Tabella 11 - Breakpoint per *Inquilinus spp*

EUCAST 2018 (Versione 8.0, valide dal 2018-01-01)

CLSI M100 (Tab2B-5) ED28: 20018

Burkholderia gladioli

Burkholderia gladioli è un patogeno delle piante in grado di infettare soggetti immunocompromessi, neonati prematuri o individui affetti da FC. È un batterio isolato molto di rado in FC ma può portare allo sviluppo di ascessi, infezioni acute e serie complicanze posttrapianto. In molti centri del Nord-America rappresenta un'assoluta controindicazione al trapianto polmonare. Non è descritta per *Burkholderia gladioli* nessuna capacità di cross-infezione. (Kennedy M *et al.* 2017; LiPuma JJ. 2003)

Test di chemiosensibilità

Burkholderia gladioli è da considerarsi come MDR, sensibili solamente a gentamicina, amikacina, imipenem, meropenem, trimetoprim/sulfametossazolo, ciprofloxacina e ceftriaxone, mentre sembra essere sempre resistente ad aztreonam, ceftazidime e colistina e amino glicosidi. (Dursun A *et al.* 2012)

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)			Regole interpretative
	S ≤	I	R >	
Cefalosporine				
Ceftriaxone	1	-	2	PK/PD (EUCAST 2018)
Carbapenemi				
Imipenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST 2018)
Meropenem	2	-	8	PK/PD (EUCAST 2018)
Fluorchinoloni				
Ciprofloxacina	0,25	-	0,5	PK/PD (EUCAST2018)
Aminoglicosidi				
Amikacina	16	32	64	CLSI 2018
Gentamicina	4	8	16	CLSI 2018
Diaminopirimidine				
Trimetoprim/Sulfametossazolo	2/38	-	4/76	CLSI 2018

Tabella 12 - Breakpoint per *Burkholderia gladioli*

EUCAST 2018 (Versione 8.0, valide dal 2018-01-01)

CLSI M100 (Tab2B-5) ED28: 20018

Enterobacteriaceae

Per quanto riguarda gli Enterobatteri, essi solitamente non colonizzano in modo cronico le basse vie aeree dei pazienti FC, e in generale mostrano un bassa prevalenza (1-4%) e sono comuni nei pazienti pediatrici sotto ai 5 anni colonizzati con *P.aeruginosa*

Le specie più rappresentate sono *Escherichia coli*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Serratia marcescens*; quest'ultima specie è la più frequentemente isolata (Burns JL. *et al.* 1998). Generalmente tali specie instaurano un'infezione transiente che raramente porta a un severo declino della malattia polmonare; Tuttavia uno studio di Barillova e colleghi (Barillova P. *et al.* 2014) descrive *E.coli* come microrganismo capace di persistere e adattarsi all'interno delle basse vie aeree dei pazienti FC e di creare quindi un'infezione cronica.

Isolamento e identificazione

Gli Enterobatteri crescono bene su terreni quali MakConkey e non necessitano di terreni dedicati, anche se la presenza di *P.aeruginosa* in carica elevata può celarne la presenza.

L'identificazione di questo gruppo di microrganismi può essere ottenuta utilizzando i sistemi automatizzati commerciali normalmente utilizzati nei laboratori di microbiologia clinica. Anche la Spettrometria di massa MALDI-TOF può condurre ad un'eccellente identificazione degli Enterobatteri riducendo i tempi di refertazione.

Test di chemiosensibilità

La presenza degli enterobacteriaceae in FC va però legata al problema a livello mondiale di diffusione di determinanti di resistenza quali beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e carbapenemasi. Le ESBL sono enzimi che idrolizzano molte penicilline e cefalosporine (incluse quelle di terza e quarta generazione) e aztreonam, ma non sono in grado di idrolizzare i carbapenemi. L'espansione di queste resistenze che ad oggi hanno una diffusione non solo nosocomiale ma anche comunitaria, è dovuta da geni collocati su elementi mobili di DNA o plasmidi, tra cui i più rilevanti a livello clinico sono i geni che codificano per l'enzima CTX-M seguito da SHV e TEM. Nei paesi Europei le specie produttrici di ESBL più diffuse sono *E. coli* e *K.pneumoniae*. Le carbapenemasi sono invece beta-lattamasi capaci di idrolizzare oltre a diverse penicilline e cefalosporine anche i carbapenemi e i monobattamici. Questa resistenza, anch'essa locata su elementi genetici mobili ha diffusione intra e interspecie. Gli enzimi più diffusi ad oggi sono codificati dai geni blaVIM, blaIMP, blaNDM, blaKPC e blaOXA48. Dal 2000 la diffusione di queste resistenze ha visto protagonisti molti paesi Europei fra cui l'Italia dove si ha una percentuale di ceppi produttrici di carbapenemasi pari al 33.5% nel 2015 e dove la specie più rappresentata è *K.pneumoniae* produttore di KPC-3. In FC restano ancora rare le segnalazioni di ceppi produttrici di carbapenemasi, anche se alcuni studi riportano l'isolamento di *K.pneumoniae* produttrici di KPC-2 e KPC-3 (Leao RS. *et al.* 2011 ; Delfino E. *et al.* 2015).

I test di sensibilità agli antibiotici possono essere condotti mediante l'utilizzo di sistemi automatici commerciali. I breakpoint clinici a cui fare riferimento sono riassunti in una tabella EUCAST. Si raccomanda di eseguire i test per la screening di resistenze (ESBL e Carbapenemasi) come descritto da EUCAST nella sezione "Monitoraggi di meccanismi di resistenza".

In letteratura non sono presenti evidenze cliniche del ruolo patogeno di questi microrganismi, tuttavia possono rappresentare un reservoir di importanti geni di resistenza e quindi si consiglia per questioni epidemiologiche di monitorare il profilo di sensibilità soprattutto nei seguenti casi:

1. Presenza in coltura pura in carica elevata ($>10^5$ CFU)
2. Pazienti colonizzati in modo cronico
3. Pazienti in età pediatrica
4. Pazienti in situazioni di pre e post-trapianto.

Micobatteri

Sarebbe opportuno eseguire nei pazienti FC, la ricerca di *M. tuberculosis* e NTM almeno una volta all'anno e in pazienti che siano in una condizione di stabilità clinica. (Raccomandazione 2, Floto RA, *et al.* 2016).

Non Tuberculous Mycobacteria (NTM) a lenta crescita

Così come per la ricerca di *Mycobacterium tuberculosis*, anche per i micobatteri non tubercolari a crescita lenta è consigliabile eseguire una ricerca in tre campioni di espettorato eseguito in giorni differenti (Whittier S *et al.* 1993). I più frequentemente isolati in pazienti con FC sono appartenenti al *Mycobacterium avium* complex (MAC). In genere si raccomanda l'esame batterioscopico e, in caso di coltura positiva, l'esecuzione di antibiogramma. Non è richiesta una ulteriore identificazione a livello di specie di MAC, ma è consigliabile affidarsi a un Centro di Riferimento Regionale per la diagnostica dei Micobatteri a lenta crescita.

Micobatteri a rapida crescita (RGM)

Le specie più comuni di micobatteri non tubercolari a rapida crescita (RGM) isolati nei campioni respiratori dei pazienti FC sono *Mycobacterium abscessus* complex (MABSC), *M. chelonae* e *M. fortuitum* group. L'aumento della loro prevalenza nella popolazione FC, il loro profilo di multiresistenza e la loro possibile implicazione nella progressione della malattia cronica polmonare, inducono ad attivare programmi di sorveglianza e di monitoraggio dei pazienti colonizzati nel tempo al fine di valutarne il reale ruolo patogeno.

Nel caso di positività per RGM è opportuno eseguire l'identificazione di specie e/o di sottospecie, in quanto ogni sottospecie può essere diversa per espressione di patogenicità e spettro di resistenza agli antibiotici e quindi essere associata a differenti outcomes clinici. Qualora non sia possibile effettuare tutto ciò in loco si raccomanda di rivolgersi a laboratori di riferimento.

Isolamento su terreno selettivo per *B. cepacia* complex

Secondo le Linee Guida Americane, l'utilizzo di terreni selettivi per *B. cepacia* complex, come BCSA BioMerieux) e Cepacia Medium (Becton Dickinson) incrementa l'isolamento di RGM da 0.7% a 2.8% rispetto ai terreni tradizionali. (**Raccomandazione 11**, Floto RA *et al.* 2016). La loro crescita risulta visibile dopo 5-15 giorni, con fenotipo rugoso o mucoso, accompagnato dal caratteristico odore di cantina-muffa.

Identificazione batterica e molecolare di RGM

Non esiste ad oggi un metodo Gold Standard per l'identificazione. (**Raccomandazione 16**, Floto RA, *et al.* 2016)

L'utilizzo di MALDI-TOF MS consente una rapida identificazione a livello di specie degli isolati di RGM, ma non permette di discriminare le diverse sottospecie di MABSC (*M. abscessus* subsp *abscessus*, *M. abscessus* subsp *bolletii* e *M. abscessus* subsp *massiliense*).

Risulta quindi indispensabile la tipizzazione molecolare degli isolati di MABSC mediante sequenziamento dei geni *rpoB* o *hsp65* (Adékambi T. *et al.* 2006) o identificazione mediante metodica di ibridazione inversa (Tortoli E. *et al.* 2003) che consente non solo l'identificazione di specie ma anche la valutazione della presenza di resistenze antibiotiche.

E' raccomandato quindi l'utilizzo routinario del MALDI-TOF MS per l'identificazione di specie di tutti gli RGM e una successiva indagine molecolare del gene *rpoB* per i campioni di MABSC nei seguenti casi:

1. al momento della prima colonizzazione;
2. almeno una volta all'anno in pazienti cronici, per monitorare la colonizzazione e verificare un eventuale cambiamento di sottospecie;
3. nei pazienti in attesa di trapianto di polmone.

Test di chemiosensibilità

MABSC è resistente alla maggior parte dei farmaci antitubercolari, mentre può essere sensibile ad alcuni farmaci non comunemente usati in terapia; inoltre le sue diverse sottospecie presentano differenti profili di sensibilità antibiotica.

Non abbiamo ad oggi metodi standardizzati e universalmente riconosciuti per la valutazione in vitro della sensibilità agli antibiotici di RGM. Sebbene ad oggi non ci siano dati di farmacocinetica e farmacodinamica specifici per MABSC, le indicazioni del CLSI 2011 (M24-A2 Vol.31 No. 5 2011) raccomandano l'utilizzo di test di sensibilità antibiotica mediante microdiluizione in brodo, includendo: claritromicina, cefoxitina, amikacina, tetraciclina, doxiciclina, imipenem, moxifloxacina, linezolid, cotrimossazolo, ciprofloxacina, tigeciclina (Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically 2011; Susceptibility Testing of mycobacteria, nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes 2011)

Anche le linee guida BTS British Thorax Society (Floto R.A. *et al.* 2016). raccomandano l'esecuzione dei test di chemiosensibilità mediante microdiluizione in brodo, e la conferma della resistenza inducibile alla claritromicina sequenziando il gene *erm* (Nash K.A *et al.* 2009).

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antibiotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIBIOTICI	MIC breakpoint (mg/L)		
	S ≤	I	R >
Tetracicline			
Doxiciclina	≤ 1	2-4	≥ 8
Tigeciclina	-	-	-
Cefalosporine			
Cefoxitina	≤ 16	32-64	≥ 128
Carbapenemi			
Imipenem	≤ 4	8-16	≥ 32
Aminoglicosidi			
Amikacina	≤ 16	32	≥ 64
Tobramicina	≤ 2	4	≥ 8
Chinoloni			
Ciprofloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Moxifloxacina	≤ 1	2	≥ 4
Macrolidi			
Claritromicina	≤ 2	4	≥ 8
Diaminopirimidine			
Trimetoprim/Sulfametossazolo	≤ 2/38	-	≥ 4/76
Ossazolidinoni			
Linezolid	≤ 8	16	≥ 32

Tabella 13 - Breakpoint per RGM
CLSI 2011 (M24-A2 Vol.31 No. 5 2011)

Miceti

Un adeguato protocollo diagnostico delle infezioni fungine e una accurata identificazione fino a livello di genere e di specie dei ceppi isolati dalle colture delle secrezioni bronchiali è necessaria nei pazienti FC, soprattutto per quelli in lista di trapianto polmonare. In quest'ultimo caso, l'immunosoppressione attuata durante la terapia post-trapianto è un importante fattore di rischio per complicanze infettive gravi, compresa l'infezione disseminata, nei pazienti già colonizzati prima dell'intervento (Ammerman E. *et al.* 2017; Kennedy CC. *et al.* 2017).

Lieviti

Candida spp.

Tra i lieviti, *Candida albicans* (*C. albicans*), specie dimorfica con tendenza a formare biofilms, è isolato dalle colture dei campioni respiratori di circa il 75% di pazienti FC. Il dimorfismo ha grande influenza sulla sua virulenza (Fourie *et al.* 2016). In FC, la presenza di *C. albicans* nelle secrezioni bronchiali è espressione di una colonizzazione a livello della mucosa oro-faringea, meno frequentemente di una effettiva colonizzazione cronica bronchiale: solo in rarissimi casi, può sostenere infezioni del parenchima o micosi invasive. Altre specie di candida (*Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*) sono isolate con frequenza decisamente minore e hanno gli stessi fattori di rischio della *C. albicans*. (Noni, *et al.*). L'impatto clinico della colonizzazione cronica da *C. albicans* e altre specie di lieviti, in particolare sul declino della funzionalità respiratoria, resta da definire.

Exophiala dermatitidis

Exophiala dermatitidis (*E. dermatitidis*) è un lievito nero dimorfico a distribuzione mondiale. È noto che possa provocare infezioni localizzate della pelle, e che possa diffondersi e causare infezioni disseminate e fungemia. *E. dermatitidis* è inoltre in grado di colonizzare le vie aeree dei pazienti con FC con una prevalenza che varia dal 5% in Germania al 10% in Austria e 15% in Belgio (Suzuki *et al.* 2012; Ziesing *et al.* 2016). Le differenze nella prevalenza possono riflettere eterogeneità genetica, differenze negli stili di vita e dell'età dei pazienti. (Kondori, *et al.* 2011; Masoud-Landgraf, *et al.* 2013). La colonizzazione del tratto respiratorio è facilitata dalla elevata presenza di *E. dermatitidis* in ambiente domestico: lieviti neri sono stati ritrovati nella lavastoviglie, nei servizi igienici e nelle cucine (Zalar *et al.* 2011). L'isolamento di *E. dermatitidis* dalle secrezioni respiratorie, facilitato dall'uso di terreni selettivi contenenti eritritolo-cloramfenicolo (sebbene medium specifici non siano indispensabili), richiede una osservazione protratta per 3 settimane, alla temperatura di 37°C i primi 3 giorni e successivamente a 30 °C. La sua identificazione può essere effettuata mediante prove di crescita a temperature diverse (34-37-40°C). Il recente impiego di MALDI-TOF MS ne permette un rapido e corretto riconoscimento. Sebbene la patogenicità di questo fungo in pazienti con FC resta da definire, la sierconversione (aumento di IgG) osservata in alcuni soggetti con colonizzazione cronica da *E. dermatitidis* supporta il suo ruolo di patogeno opportunisto e la sua capacità ad attivare una risposta immunologica ed infiammatoria nel polmone.

Funghi filamentosi

Identificazione micologica

L'identificazione dei miceti filamentosi, imperativa fino a livello di sottospecie nei pazienti candidati al trapianto polmonare, si basa sulle caratteristiche della colonia fungina (esame macroscopico) e sulla morfologia delle strutture microscopicamente apprezzabili (esame microscopico). La velocità di crescita, ed il colore, la tessitura, la presenza di essudato e/o di pigmento possono essere caratteri suggestivi e orientare la diagnosi di genere, mentre la colorazione con cotton blue-lattofenolo e osservazione microscopica (a ingrandimento 40X e 100X) permette di apprezzare le peculiarità delle strutture fungine indispensabili per l'identificazione del fungo a livello di specie. L'impiego della spettrometria di massa per identificare miceti filamentosi presenta alcune problematiche. L'età della coltura (il corredo proteico della parete delle ife vegetative è spesso diverso da quello dei conidi) e le modalità di crescita del micete (forma anamorfa o teleomorfa) possono generare spettri differenti e una identificazione non univoca. Inoltre, la colonia fungina deve essere sottoposta a vari passaggi per l'estrazione delle proteine (Del Chierico F.*et al.* 2012). Spesso anche la carenza di spettri di riferimento inclusi nei database dei diversi strumenti disponibili, rappresenta un punto critico. In caso non sia possibile pervenire ad una identificazione certa con i metodi convenzionali, una risorsa importante è costituita dai metodi molecolari (PCR e sequenziamento), che si consiglia di eseguire presso laboratori che dispongano dell'esperienza e delle piattaforme tecnologiche necessarie.

Test di chemio sensibilità

Una identificazione accurata di genere e specie è già sufficiente per orientare verso una terapia antifungina adeguata. Tuttavia, in alcune circostanze che interessano per lo più pazienti cronicamente colonizzati da funghi filamentosi e in condizioni cliniche critiche, pazienti con precedenti fallimenti terapeutici, pazienti in attesa di trapianto o colonizzati da specie rare o emergenti, è utile e consigliabile eseguire test di sensibilità agli antifungini.

Questo tipo di test dovrebbe essere effettuato in Brodo Diluizione con metodica manuale in accordo alle direttive Eucast (genn 2017 E. DEF 9.3.1), applicando i relativi criteri di interpretazione (Eucast 2018- Anfigungal Clinical Breakpoint Table v9.0, del 2018-02-12).

Esistono tuttavia metodi alternativi di più facile applicabilità nella routine del laboratorio clinico, come la disco diffusione e E-test. Anche questi metodi presentano comunque punti di criticità ed è quindi consigliabile che vengano effettuati in laboratori di esperienza. Un documento AMCLI (Comitato di Studio per la Micologia "Antimicogramma per *Aspergillus*" gennaio 2015) con una attenta disamina della letteratura indica il metodo E-Test come appropriato per saggiare le sensibilità agli antifungini più utilizzati in terapia (Alastruey-Izquierdo A. *et al.* 2015; Hope WW. *et al.* 2013).

Aspergillus spp.

Tra le specie filamentose maggiormente riscontrate nel microbiota polmonare FC, *Aspergillus fumigatus* è di gran lunga il più diffuso con una prevalenza che varia tra il 10 e il 57% (Craig, *et al.* 2016; Schwarz C 2018). Altre specie del genere Aspergillo comunemente isolate dalle vie aeree FC, come *A. niger* e *A. nidulans*, sono transienti se comparati ad *A. fumigatus*, *A. terreus* e *A. flavus*, che si propongono come colonizzanti cronici.

I principali quadri clinici associati ad *A. fumigatus* sono la colonizzazione cronica, la bronchite aspergillare e l'aspergillosi broncopolmonare allergica (ABPA), che fa seguito alla risposta TH2mediata agli allergeni fungini. La prevalenza delle diverse manifestazioni è estremamente variabile in rapporto alle aeree geografiche, all'età dei pazienti, al grado di funzionalità respiratoria e, anche, ai criteri classificativi utilizzati. Altre forme cliniche, come l'aspergilloma e l'aspergillosi polmonare invasiva, sono di rara osservazione, sebbene soggetti FC colonizzati sottoposti a trapianto polmonare abbiano un rischio quattro volte superiore di sviluppare aspergillosi invasiva rispetto ai soggetti non colonizzati.

Dati epidemiologici sembrano suggerire che i pazienti FC con infezione cronica da Aspergillo presentano un'accelerata diminuzione della funzionalità polmonare rispetto ai pazienti non colonizzati (Sabino *et al.* 2015).

Test di chemio sensibilità

All'interno del genere *Aspergillus*, le numerose specie presentano resistenze sia intrinseche (*A. terreus* per amfotericina B) che acquisite (*A. niger* per gli azoli) e diverse tra di loro. Inoltre, sono state isolate da campioni biologici umani specie appartenenti ad *A. fumigatus* complex, morfologicamente indistinguibili da *A. fumigatus*, come *A. lentulus*, che presentano naturalmente spiccate caratteristiche di resistenza agli antifungini.

I derivati azolici (itraconazolo, voriconazolo, posaconazolo) sono i farmaci di elezione per la bronchite aspergillare e, con i corticosteroidi, per l'ABPA, mentre l'uso della amfotericina B è riservato a casi selezionati. L'uso di fungicidi azolici in agricoltura e l'esposizione prolungata a questi farmaci sono responsabili del significativo aumento della prevalenza di ceppi di *Aspergillus* azoli-resistenti in ambito umano.

Aspergillus fumigatus

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antimicotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIMICOTICI	MIC breakpoint (mg/L)		Tempo di lettura
	S ≤	R >	
Amfotericina B	1	2	24 h
Isavuconazolo	1	1	24-48 h
Itraconazolo	1	2	24 h
Posaconazolo	0.125	0.25	24-48 h
Voriconazolo	1	2	24-48 h

Tabella 14 - Breakpoint per *Aspergillus fumigatus*

EUCAST 2018 (Anfungal Clinical Breakpoint Table v9.0, del 2018-02-12)

Aspergillus flavus

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antimicotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIMICOTICI	MIC breakpoint (mg/L)		Tempo di lettura
	S ≤	R >	
Itraconazolo	1	2	24 h

Tabella 15 - Breakpoint per *Aspergillus flavus*

EUCAST 2018 (Anfigungal Clinical Breakpoint Table v9.0, del 2018-02-12)

Aspergillus niger

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antimicotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIMICOTICI	MIC breakpoint (mg/L)		Tempo di lettura
	S ≤	R >	
Amfotericina B	1	2	24 h

Tabella 16 - Breakpoint per *Aspergillus niger*

EUCAST 2018 (Anfigungal Clinical Breakpoint Table v9.0, del 2018-02-12)

Aspergillus terreus

Nella tabella sotto riportata sono elencati gli antimicotici che si raccomanda di testare con i relativi breakpoint clinici.

ANTIMICOTICI	MIC breakpoint (mg/L)		Tempo di lettura
	S ≤	R >	
Isavuconazolo	1	1	24-48 h
Itraconazolo	1	2	24 h
Posaconazolo	0.125	0.25	24-48 h

Tabella 17 - Breakpoint per *Aspergillus terreus*

EUCAST 2018 (Anfigungal Clinical Breakpoint Table v9.0, del 2018-02-12)

Scedosporium/Lomentospora (Sac/Lp)

I funghi filamentosi appartenenti al genere *Scedosporium* sono in continua revisione tassonomica. Alla luce di recentissimi studi di filogenesi, sono 10 le specie attribuite a questo genere: *S. aurantiacum*, *S. minutisporum*, *S. desertorum*, *S. cereisporum* e *S. dehoogii*, da aggiungere alle specie che compongono il *S. apiospermum* complex (*S. angustum*, *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. ellipsoideum*, and *S. fusarium*).

S. prolificans, filogeneticamente distinto dagli altri membri del complex, è stato recentemente riclassificato in un nuovo genere e denominato *Lomentospora prolificans*.

(Ramirez-Garcia A *et al.* 2018)

Descritti come emergenti e colonizzanti cronici, i funghi compresi nel gruppo Sac/Lp sono i secondi tra i filamentosi più frequentemente isolati in FC, con una prevalenza che varia da 0.7 al 9%. La variabilità del dato è da attribuirsi sia a fattori ambientali, in relazione alle diverse aree geografiche e al diverso impatto delle attività umane sul territorio, sia alle differenti metodologie colturali. L'uso nella pratica routinaria di un terreno selettivo (YPDA addizionato di cicloeximide o SceSel+ (Rainer J. *et al.* 2008) favorisce l'isolamento di queste specie dai materiali clinici.

Poichè recenti segnalazioni in letteratura sostengono un potenziale patogenetico di *S. apiospermum* quale agente etiologico di micetoma polmonare (e successiva disseminazione polmonare e/o cerebrale), endoftalmiti e malattia broncopolmonare allergica simile alla ABPA, è importante distinguere questa specie dagli altri membri del complex.

Punto altrettanto critico è una corretta identificazione di *L. prolificans* alla luce del particolare quadro di resistenza verso quasi tutti gli antifungini che la caratterizzano.

Rasamsonia argillacea complex

Fino a poco tempo fa compresa nel genere *Penicillium*, riclassificata nel genere *Geosmithia* e nel 2013 riassegnata al nuovo genere, *Rasamsonia* è oggi considerata un patogeno emergente (Mouhajir *et al.* 2016). Negli ultimi anni si è registrato un crescente numero di casi, con una percentuale di isolamento che varia dal 2.4% al 4.4% (Masoud-Landgraf *et al.* 2014). I membri del genere *Rasamsonia*, in particolare *R. argillacea*, sono difficili da identificare nella routine diagnostica, a causa di una marcata somiglianza morfologica macroscopica e microscopica con i generi *Penicillium* e *Paecilomyces*, con i quali è stata spesso confusa, in passato. È quindi probabile che il numero di infezioni causate da questo fungo sia stato sottostimato a lungo. L'importanza di una corretta identificazione di questi funghi è sottolineata dalla loro patogenicità, documentata in varie situazioni cliniche e patologie, inclusa la FC, e dalla loro naturale resistenza agli antifungini azolici. Tuttavia, non è ancora stata stabilita una chiara relazione tra la colonizzazione delle vie aeree FC da parte del genere *Rasamsonia* e un deterioramento clinico e funzionale.

BIBLIOGRAFIA

Adékambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006. 56(pt1): p.133-43.)

Alastruey-Izquierdo A, Melhem MS, Bonfietti LX, Rodriguez-Tudela JL. Susceptibility test for fungi: clinical and laboratorial correlations in medical mycology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2015 Sep;57 Suppl 19:57-64. Review.

Alicandro, Gianfranco, Luisa Frova, Gennaro Di Fraia, Carla Colombo. 2015. "Cystic Fibrosis Mortality Trend in Italy from 1970 to 2011." *Journal of Cystic Fibrosis* 14(2): 267–74

Ammerman E, Sweet SC, Fenchel M, Storch GA, Conrad C, Hayes D Jr, Faro A, Goldfarb S, Melicoff E, Schechter M, Visner G, Williams NM, Danziger-Isakov L. Risk and outcomes of pulmonary fungal infection after pediatric lung transplantation. *Clin Transplant.* 2017 Nov;31(11).

Aris RM, Routh JC, LiPuma JJ, Heath DG, Gilligan PH. Lung transplantation for cystic fibrosis patients with *Burkholderia cepacia complex*. Survival linked to genomovar type. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Dec 1;164(11):2102-6.

Asiimwe BB, Bagyenzi GB, Ssenogooba W, *et al.* Species and genotypic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from children investigated for pulmonary tuberculosis in rural Uganda. *BMC Infectious Diseases.* 2013;13:88.

Barillova P, Tchesnokova V, Dübbers A, Küster P, Peters G, Dobrindt U, Sokurenko EV, Kahl BC. Prevalence and persistence of *Escherichia coli* in the airways of cystic fibrosis patients - an unrecognized CF pathogen? *Int J Med Microbiol.* 2014 May;304(3-4):415-21.

Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, *et al.* Prevalence and Clinical Significance of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007;45(1):168-172.

Bonestroo HJ, de Winter-deGroot KM, van der Ent CK, Aretes HG. Upper and lower airway cultures in children with cystic fibrosis: do not neglect the upper airways. *J Cyst Fibros.* 2010 Mar;9(2):130-4.

Brandt C, Roehmel J, Rickerts V, Melichar V, Niemann N, Schwarz C. *Aspergillus* Bronchitis in Patients with Cystic Fibrosis *Mycopathologia.* 2018 Feb;183(1):61-69.

Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L, Ramsey BW, Clausen CR. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis.* 1998 Jul; 27(1):158-63.

Burns JL, Rolain JM. Culture-based diagnostic microbiology in cystic fibrosis: can we simplify the complexity? *J Cyst Fibros.* 2014 Jan;13(1):1-9.

Bushra Ahmed, Andrew Bush, Jane C Davies Ahmed B, *et al.* How to use: bacterial cultures in diagnosing lower respiratory tract infections in cystic fibrosis Arch Dis Child Educ Pract Ed 2013;0:1–8

Chiron R, Marchandin H, Counil F, Jumas-Bilak E, Freydière AM, Bellon G, Husson MO, Turck D, Brémont F, Chabanon G, Segonds C. Clinical and microbiological features of *Inquilinus* sp. isolates from five patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):3938-43.

Cicatiello AG, Iula DV, Pagliuca C, Pastore G, Pagliarulo C, Catania MR, Catania MR, Colicchio R, Picardi M, Raia V, Salvatore P. Identification of *Inquilinus limosus* in cystic fibrosis: a first report in Italy. New Microbiol. 2014 Oct;37(4):567-71

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 2011, Approved Standard - Ninth Edition. , M07-A9, 32, Wayne, Pennsylvania.

Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines 2018

Cocchi P. *et al.* 2011. J Cyst Fibros. 10: 4017-11).//Champion EA, Miller MB, Popowitch EB, Hobbs MM, Saiman L, Muhlebach MS;Pediatr Pulmonol. 2014 Mar;49(3):230-7. Epub 2013 Jun 14. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of MRSA in cystic fibrosis.

Coenye T, Goris J, Spilker T, Vandamme P. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. J Clin Microbiol. 2002

Colonisation and infection of the paranasal sinuses in cystic fibrosis patients is accompanied by a reduced PMN response. J Cyst Fibros. 2012 Dec;11(6):525-31.

Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry, Annual Data Report 2016

de Mello Homem, de Souza HA, Dalla-Costa LM, Vicenzi FJ, Camargo de Souza D, Riedi CA, Filho NA, Pilonetto M. MALDI-TOF: a useful tool for laboratory identification of uncommon glucose non-fermenting Gram-negative bacteria associated with cystic fibrosis. J Med Microbiol. 2014 Sep;63(Pt 9):1148-53.

Degand N, Lotte R, Decondé Le Butor C, *et al.* Epidemic spread of *Pandora* pulmonicola in a cystic fibrosis center. BMC Infectious Diseases. 2015;15:583.

Del Chierico F, Masotti A, Onori M, Fiscarelli E, Mancinelli L, Ricciotti G, Alghisi F, Dimiziani L, Manetti C, Urbani A, Muraca M, Putignani L. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. J Proteomics. 2012 Jun 18;75(11):3314-30.

Delfino E, Giacobbe DR, Del Bono V, Coppo E, Marchese A, Manno G, Morelli P, Minicucci L, Viscoli C. First report of chronic pulmonary infection by KPC-3-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 (ST258) in an adult patient with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2015

Dursun A, Zenciroglu A, Karagol BS, Hakan N, Okumus N, Gol N, Tanir G. - *Burkholderia gladioli* sepsis in newborns. Eur J Pediatr. 2012; 171:1503-1509

Esther CR, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. Chronic Mycobacterium abscessus infection and lung function decline in cystic fibrosis. Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society. 2010;9(2).

Esther Jr CR, Hoberman S, Fine J, Allen S, Culbreath K, Rodino K, *et al.* Detection of rapidly growing mycobacteria in routine cultures of samples from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2011;49:1421–5.

Evans TJ. Small colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in chronic bacterial infection of the lung in cystic fibrosis. Future Microbiol. 2015;10(2):231-9.

Floto, R.A., *et al.* US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. Thorax, 2016. 71 Suppl 1: p. i1-22.

Floto RA, Olivier KN, Saiman L, *et al.* Raccomandazione 2, US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. Thorax. 2016; 71(Suppl 1):i1-i22.)

Floto RA, Olivier KN, Saiman L, *et al.* Raccomandazione 11, US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. Thorax. 2016;71(Suppl 1):i1-i22.)

Floto RA, Olivier KN, Saiman L, *et al.* Raccomandazione 16, US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of nontuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. Thorax. 2016;71(Suppl 1):i1-i22.).

Flume PA. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2016;15(2):139–40.

Fourie R, Ells R, Swart CW, Sebolai OM, Albertyn J, Pohl CH. Candida albicans and *Pseudomonas aeruginosa* Interaction, with Focus on the Role of Eicosanoids. Front Physiol. 2016 Feb 26;7:64.

Gade SS, Nørskov-Lauritsen N, Ridderberg W. Prevalence and species distribution of *Achromobacter* sp. cultured from cystic fibrosis patients attending the Aarhus centre in Denmark. J Med Microbiol. 2017 May;66(5):686-689.

Gilligan PH Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update.”. Clin Lab Med. 2014 Jun;34(2):197-217. Epub 2014 Apr 12. Review.

Gröbner S, Beck J, Schaller M, Autenrieth IB, Schulte B. Characterization of an *Enterococcus faecium* small-colony variant isolated from blood culture. Int J Med Microbiol.2012 Jan;302(1):404

Harrison F. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung Microbiology, 153 (2007), pp. 917-923

Haworth CS, Banks J, Capstick T, Fisher AJ, Gorsuch T, Laurenson IF, Leitch A, Loebinger MR, Milburn HJ, Nightingale M, Ormerod P, Shingadia D, Smith D, Whitehead N, Wilson R, Floto RA. British Thoracic Society guidelines for the management of non-tuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PD). *Thorax*. 2017 Nov;72(Suppl 2)

Hayes D Jr, Murphy BS, Kuhn RJ, Anstead MI, Feola DJ. Mucoid *Inquilinus limosus* in a young adult with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2009 un;44(6):619-21.

Hector A, Kirn T, Ralhan A, Graepler-Mainka U, Berenbrinker S, Riethmueller J, Hogardt M, Wagner M, Pflieger A, Autenrieth I, Kappler M, Griese M, Eber E, Martus P, Hartl D. Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2016 May;15(3):340-9.

Henry D, Campbell M, McGimpsey C, Clarke A, Louden L, Burns JL, Roe MH, Vandamme, P, Speert D. Comparison of isolation media for recovery of *Burkholderia cepacia complex* from respiratory secretion of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1999; 37: 1004-1007.

Henry DA, Campbell ME, LiPuma JJ, Speert DP. Identification of *Burkholderia cepacia* isolates from patients with cystic fibrosis and use of a simple new selective medium. *J Clin Microbiol*. 1997 Mar;35(3):614-9. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1999 Apr;37(4):1237.

Hinz, R., Zautner, A. E., Hagen, R. M., & Frickmann, H. (2015). Difficult identification of *Haemophilus influenzae*, a typical cause of upper respiratory tract infections, in the microbiological diagnostic routine. *European Journal of Microbiology & Immunology*, 5(1), 62–67.

Hope WW, Cuenca-Estrella M, Lass-Flörl C, Arendrup MC; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (EUCAST-AFST). EUCAST technical note on voriconazole and *Aspergillus* spp. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Jun;19(6):E278-80.

Hutchison ML, Bonell EC, Poxton IR, Govan JR. Endotoxic activity of lipopolysaccharides isolated from emergent potential cystic fibrosis pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Jan;27(1):73-7.

Iain J, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 36 N° 1/2015.

Johansen HK, Aanaes K, Pressler T, Nielsen KG, Fisker J, Skov M, Høiby N, von Buchwald C, Kahl BC, Becker K, Löffler B. Clinical Significance and Pathogenesis of *Staphylococcal Small Colony Variants* in Persistent Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2016 Apr;29(2):401-27. Review.

Kenna DTD, Lilley D, Coward A, Martin K, Perry C, Pike R, Hill R, Turton JF. Prevalence of *Burkholderia* species, including members of *Burkholderia cepacia complex*, among UK cystic and non-cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*. 2017 Apr;66(4):490-501.

Kennedy CC, Razonable RR. Fungal Infections After Lung Transplantation. *Clin Chest Med*. 2017 Sep;38(3):511-520. Review.

Kennedy M *et al*. *Burkholderia gladioli*: five year experience in a cystic fibrosis and lung transplantation center - *J Cyst Fibros*. 2017; 6: 267-73

Kiratisin P, Koomanachai P, Kowwigkai P, Pattanachaiwit S, Aswapokee N, Leelaporn A. Earlyonset prosthetic valve endocarditis caused by *Inquilinus sp.* Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Nov;56(3):317-20.

Kondori N, Gilljam M, Lindblad A, Jönsson B, Moore ER, Wennerås C. High rate of *Exophiala dermatitidis* recovery in the airways of patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic insufficiency. J Clin Microbiol. 2011 Mar;49(3):1004-9.

Langton HSC and Smyth AR. Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. Cochrane Database Syst Rev. 2017

Leão RS, Pereira RH, Folescu TW, Albano RM, Santos EA, Junior LG, Marques EA. KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis. J Cyst Fibros. 2011 Mar;10(2):140-2.

LiPuma JJ. Burkholderia and emerging pathogens in cystic fibrosis. Semin Respir Crit Care Med. 2003; 24: 681-692.

Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2010 Apr;23(2):299-323. Review

Mainz JG *et al.* Concordant genotype of upper and lower airways *P. aeruginosa* and *S. aureus* isolates in cystic fibrosis. Thorax. 2009;64(6):535-40

Martínez-Lamas L, Rabade Castedo C, Martín Romero Domínguez M, Barbeito Castiñeiras G, Palacios Bartolomé A, Pérez Del Molino Bernal ML. *Pandoraea sputorum* colonization in a patient with cystic fibrosis. Arch Bronconeumol. 2011 Nov;47(11):571-4.

Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. Med Mycol. 2014 Feb;52(2):179-86.

Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. Med Mycol. 2014 Feb;52(2):179-86.

Mathy V, Grohs P, Compain F. In vitro activity of β -lactams in combination with avibactam against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter xylosoxidans* isolates from patients with cystic fibrosis. J Med Microbiol. 2018 Sep;67(9):12171220.

Mazer DM, Young C, Kalikin LM, Spilker T, LiPuma JJ.. In Vitro Activity of Ceftolozane/Tazobactam and Other Antimicrobial Agents Against *Burkholderia cepacia* Complex and *Burkholderia gladioli*. Antimicrob Agents Chemother 2017 Aug 24;61(9)

McHugh KE *Inquilinus limosus* in pulmonary disease: case report and review of the literature. 2016 Diagn Microbiol Infect Dis. Dec;86(4):446-449).

- Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar;38(3):1032-5.
- Mouhajibir A, Matray O, Giraud S, Mély L, Marguet C, Sermet-Gaudelus I, Le Gal S, Labbé F, Person C, Troussier F, Ballet JJ, Gargala G, Zouhair R, Bougnoux ME, Bouchara JP, Favennec L. Long-Term *Rasamsonia argillacea* Complex Species Colonization Revealed by PCR Amplification of Repetitive DNA Sequences in Cystic Fibrosis Patients. *J Clin Microbiol.* 2016 Nov;54(11):2804-2812.
- Murphy T.F., L.O. Bakaletz, P.R. Smeesters Microbial interactions in the respiratory tract *Pediatr. Infect. Dis. J.* 28 (Suppl. 10)(2009), pp. S121-S126.
- Nair B, Stapp J, Stapp L, Bugni L, Van Dalfsen J, Burns JL. Utility of gram staining for evaluation of the quality of cystic fibrosis sputum samples. *J Clin Microbiol.* 2002 Aug;40(8):2791-4.
- Nash, K.A., B.A. Brown-Elliott, and R.J. Wallace, A novel gene, *erm(41)*, confers inducible macrolide resistance to clinical isolates of *Mycobacterium abscessus* but is absent from *Mycobacterium chelonae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. 53(4): p. 1367-76.).
- Noni M, Katelari A, Kaditis A, Theochari I, Lympari I, Alexandrou-Athanassoulis H, Doudounakis SE, Dimopoulos G. *Candida albicans* chronic colonisation in cystic fibrosis may be associated with inhaled antibiotics. *Mycoses.* 2015 Jul;58(7):416-21.
- Parkins MD, Floto RA. Emerging bacterial pathogens and changing concepts of bacterial pathogenesis in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2015 May;14(3):293-304.
- Poore TS, Virella-Lowell I, Guimbellot JS. Potential pathogenicity of *Inquilinus limosus* in a pediatric patient with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2018 Jul;53(7):E21-E23.
- Prior AR, Gunaratnam C, Humphreys H. *Ralstonia* species - do these bacteria matter in cystic fibrosis? *Paediatr Respir Rev.* 2017 Jun;23:78-83.
- Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2008 Mar;93(3):315-22.
- Ramirez-Garcia A *et al.* *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Medical Mycology*, 2018, Vol. 56, S102-S125
- Ramsey B. W, Wentz K. R., Smith A. L., Richardson M., Williams-Warren J., Hedges D. L., Gibson R., Redding G. J., Lent K. and Harris K. Predictive value of oropharyngeal cultures for identifying lower airway bacteria in cystic fibrosis patients. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1991).
- Ryan MP, Adley CC. The antibiotic susceptibility of water-based bacteria *Ralstonia pickettii* and *Ralstonia insidiosa*. *J Med Microbiol.* 2013 Jul;62(Pt7):1025-31.

Sabino R, Ferreira JA, Moss RB, Valente J, Veríssimo C, Carolino E, Clemons KV, Everson C, Banaei N, Penner J, Stevens DA. Molecular epidemiology of *Aspergillus* collected from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2015 Jul;14(4):474-81.

Salvador-García C, Yagüe-Guirao G, Pastor-Vivero MD, Sáez-Nieto JA. Chronic colonization of *Inquilinus limosus* in a patient with cystic fibrosis: first report in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013 Jun-Jul;31(6):414-5.

Salsgiver EL, Fink AK, Knapp EA, LiPuma JJ, Olivier KN, Marshall BC, Saiman L. Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients With Cystic Fibrosis. *Chest*. 2016 Feb;149(2):390-400.

Schwarz C *et al.* ; ECMM/ISHAM working group Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF). Developing collaborative works for faster progress on fungal respiratory infections in cystic fibrosis. *Med Mycol*. 2018 Apr 1;56(suppl_1):42-59.

Schwarz C, Hartl D, Eickmeier O, Hector A, Benden C, Durieu I, Sole A, Gartner S, Milla CE, Barry PJ. Progress in Definition, Prevention and Treatment of Fungal Infections in Cystic Fibrosis. *Mycopathologia*. 2018 Feb;183(1):21-32.

Speirs JJ, van der Ent CK, Beekman JM. Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*. 2012 Nov;18(6):632-8.

STAR-CF Study Team. Antimicrobial susceptibility and molecular typing of MRSA in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*. 2014 Mar;49(3):230-7.

Stenotrophomonas, *Achromobacter*, and Nonmelioid *Burkholderia* Species: Antimicrobial Resistance and Therapeutic Strategies. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* Vol. 36 No. 1/2015

Susceptibility Testing of mycobacteria, nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes; Approved Standard - Second Edition. M24-A2 Vol.31 No. 5 2011

Suwantarat N, Rubin M, Bryan L, Tekle T, Boyle MP, Carroll KC, Jennings MT. Frequency of small-colony variants and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2018 Apr;90(4):296-299.

Suzuki K, Nakamura A, Fujieda A, Nakase K, Katayama N. Pulmonary infection caused by *Exophiala dermatitidis* in a patient with multiple myeloma: A case report and a review of the literature. *Med Mycol Case Rep*. 2012 Oct 17;1(1):95-8.

Talbot NP, Flight WG. Severe *Achromobacter xylosoxidans* infection and loss of sputum bacterial diversity in an adult patient with cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*. 2016 Aug;20 Suppl:27-9.

Tamma PD, Fan Y, Bergman Y, Sick-Samuels AC, Hsu AJ, Timp W, Simner PJ, Prokesch BC, Greenberg DE. Successful Treatment of Persistent *Burkholderia cepacia* Complex Bacteremia with Ceftazidime Avibactam. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Mar 27;62(4).

Teri A, Sottotetti S, Biffi A, Girelli D, D'Accico M, Arghittu M, Colombo C, Corti F, Pizzamiglio G, Cariani L. Molecular typing of *Burkholderia cepacia complex* isolated from patients attending an Italian Cystic Fibrosis Centre. *New Microbiol.* 2018 Apr;41(2):141-144.

The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017-07-11)
(www.eucast.org/resistance_mechanisms/)

Torrens J, Dawkins P, Conway S, Moya E. Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis. *Thorax.* 1998;53(3):182-185.)

Torres A, Bonanni P, Hryniewicz W, Moutschen M, Reinert RR, Welte T. 2015. Pneumococcal vaccination: what have we learnt so far and what can we expect in the future? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 34:19–31.

Tortoli E, Mariottini A, Mazzarelli G. Evaluation of INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2: Improved Reverse Hybridization Multiple DNA Probe Assay for Mycobacterial Identification. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003;41(9):4418-4420.

Wellinghausen N, Essig A, Sommerburg O. *Inquilinus limosus* in patients with cystic fibrosis, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2005 Mar;11(3):457-9.

Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from Nonpneumococcal *Streptococci* of the *Streptococcus mitis* Group by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012;50(9)

Whittier S, Hopper RL, Knowles MR, Gilligan PH. Improved recovery of mycobacteria from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1993 Apr;31(4):861-4.).

Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol.* 2011 Oct;115(10):997-1007.

Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. *Med Mycol.* 2016 Nov 1;54(8):781-6.