

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



Impatto della Terapia Empirica Adeguata di Combinazione sulla
Mortalità in Pazienti con Shock Settico secondario a Batteriemia da
Pseudomonas aeruginosa: studio di coorte multicentrico e
retrospettivo

Relatore:

Chiar.mo Prof. Matteo Bassetti

Correlatore

Dott. Antonio Vena

Candidato:

Michela Schenone

Anno accademico 2023-2024

Sommario

1	Introduzione	1
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
2.1	Caratteristiche microbiologiche	2
2.2	Distribuzione ed epidemiologia.....	3
2.3	Resistenza antimicrobica	4
2.3.1	Resistenza intrinseca e acquisita	4
2.3.2	Resistenza adattativa	8
2.3.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MDR, XDR e PDR	9
3	Antibiotici utilizzati nelle infezioni da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
4	Infezioni causate da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
4.1	Batteriemia da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
5	Scopo dello studio.....	18
6	Materiali e Metodi	19
6.1	Disegno dello studio	19
6.2	Criteri di inclusione ed esclusione.....	20
6.3	Raccolta dei dati	20
6.4	Variabile d'esposizione primaria	21
6.5	Endpoint primario.....	21
6.6	Altre definizioni	22
6.7	Studi Microbiologici.....	23
6.8	Etica.....	23
7	Analisi Statistica	24
8	Risultati.....	25
8.1	Mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione in rapporto alla terapia antibiotica empirica ricevuta	28

8.2	Predittori di mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione	29
8.3	Mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione-in rapporto alla terapia antibiotica definitiva ricevuta	33
9	Discussione della tesi.....	34
9.1	Limiti dello studio	36
9.2	Conclusioni.....	37
10	Bibliografia	38

1 Introduzione

Pseudomonas aeruginosa rappresenta uno dei patogeni più frequentemente coinvolti nelle infezioni ospedaliere, soprattutto in pazienti immunocompromessi e neutropenici [1]. Si tratta di un microrganismo in grado di determinare diverse tipologie di infezioni, di queste, la batteriemia si associa ad una prognosi particolarmente infausta, non di rado evolvendo in quadri di shock settico [2].

Lo shock settico rappresenta una temibile complicanza riscontrabile nei pazienti affetti da batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, le cui conseguenze potenzialmente devastanti sono ben documentate [3,4,5]. In relazione a questo quadro clinico, diversi studi indicano una prognosi sfavorevole, riportando un tasso di mortalità compreso tra 46% e 56% [6,7,8]. Sono stati individuati diversi fattori di rischio correlati ad una aumentata mortalità, di cui i più rilevanti sono la presenza di patologie preesistenti, la fonte dell'infezione, il ritardo nella somministrazione di una terapia antibiotica adeguata, nonché le caratteristiche del patogeno, tra cui lo spettro di resistenza agli antibiotici [9].

Nonostante si tratti di un quadro clinico particolarmente grave, la letteratura scientifica è povera di studi focalizzati sullo shock settico secondario alla batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*; considerando il crescente fenomeno delle resistenze antibiotiche, si rendono necessari ulteriori studi per poter approcciare al meglio questa condizione, e migliorarne la prognosi.

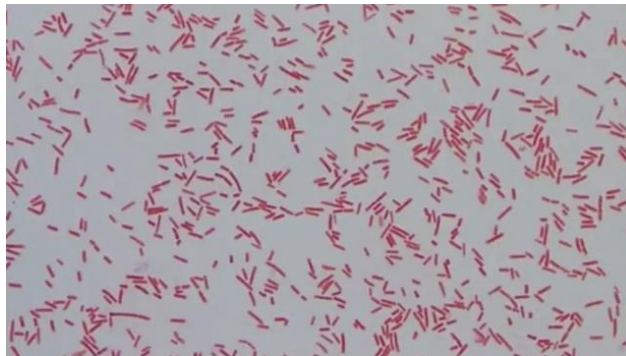
2 *Pseudomonas aeruginosa*

2.1 Caratteristiche microbiologiche

Pseudomonas aeruginosa è un bacillo gram-negativo, asporigeno, anaerobio facoltativo, delle dimensioni di 0.5-1 µm per 1.5-5 µm.

Questo microrganismo presenta scarse esigenze nutritive ed è in grado di crescere a temperature comprese tra 4 °C e 40 °C. Per questo motivo cresce facilmente in comuni terreni di coltura, come Agar sangue e Agar MacConkey, dando origine a colonie piatte dall'odore dolciastro caratteristico, simile al mosto.

Figura 2.1: *Pseudomonas aeruginosa* in colorazione di Gram.



Fonte: *MicrobiologiaItalia*

Talvolta può rendersi necessario compiere più test biochimici per una esatta identificazione, in cui risulta essere:

- ossidasi positivo;
- citrato positivo;
- arginina diidrolasi positivo;
- lisina decarbossilasi negativo;
- ornitina decarbossilasi negativo.

In particolare, l'espressione di citocromo ossidasi permette di distinguerlo dai batteri appartenenti alla famiglia degli *Enterobacterales*.

Una peculiarità di questo batterio risiede nella capacità di produrre alcuni pigmenti apprezzabili sui terreni di coltura, di cui i più noti sono la piocianina (blu-verde), la pioverdina (giallo-verde, fluorescente) e la piorubina (rosso-marrone, prodotto da una piccola percentuale di ceppi) [10].

Figura 2.2: *Pseudomonas aeruginosa* e stafilococchi coagulasi negativi coltivati su Agar sangue.



Fonte: MicrobiologiaItalia

2.2 Distribuzione ed epidemiologia

Pseudomonas aeruginosa è un batterio ubiquitario in natura grazie alla sua capacità di adattamento e al suo metabolismo versatile. Si isola facilmente nel suolo, nell'acqua (come nelle piscine), nella materia organica in decomposizione o nella vegetazione. Esso può essere inoltre riscontrato in ambiente ospedaliero; in questo caso i principali reservoirs sono rappresentati da cibo, bagni (lavabo e tubo di scarico), ventilatori e dispositivi per l'emodialisi [11].

La diffusione tra i pazienti dello *Pseudomonas aeruginosa* nel setting nosocomiale avviene in particolar modo quando l'igiene delle mani non viene attuata correttamente, favorendo il passaggio del batterio da paziente a paziente o da reservoir a paziente [12,13].

2.3 Resistenza antimicrobica

Pseudomonas aeruginosa è, in virtù della sua resistenza intrinseca e della capacità di acquisire diverse modalità di resistenza, uno dei microrganismi più complessi da trattare. [14].

La resistenza antibiotica rappresenta una sfida di notevole rilevanza nelle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*, tanto che questo microrganismo è stato inserito nel gruppo dei patogeni “ESKAPE” (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter species*); questo acronimo mira a evidenziare la capacità di questi batteri di eludere l'efficacia di diverse categorie di antibiotici [15].

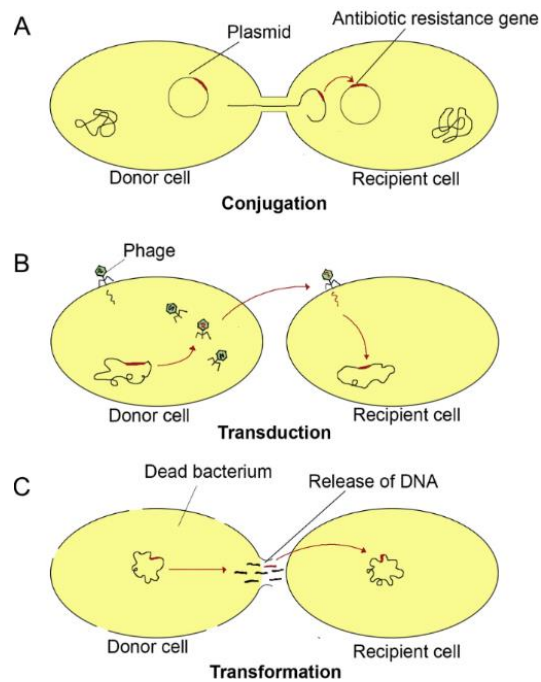
Pseudomonas aeruginosa fa inoltre parte della lista di batteri definiti “critici” dall’Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), per i quali si rende urgente la ricerca e lo sviluppo di nuovi antibiotici efficaci [15].

2.3.1 Resistenza intrinseca e acquisita

La resistenza intrinseca rappresenta la capacità di un microrganismo di resistere agli agenti antibiotici grazie a caratteristiche strutturali e funzionali proprie del batterio stesso.

La resistenza antimicrobica acquisita è il risultato di mutazioni genetiche del batterio o dell’acquisizione di geni esterni tramite trasferimento orizzontale [16] attraverso plasmidi, trasposoni, integroni e profagi, da parte di microrganismi della stessa specie o di specie differente. Questo fenomeno gioca un ruolo cruciale nella disseminazione dell’antibiotico resistenza anche tra batteri di specie diverse [17].

Figura 2.3: Meccanismi batterici di acquisizione di geni codificanti resistenze antibiotiche: coniugazione, trasduzione e trasformazione.



Fonte: *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies* Pang, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, Zhenyu Cheng. *Biotechnology Advances*

Tra i meccanismi di resistenza espressi da *Pseudomonas aeruginosa* i più rilevanti sono:

- La ridotta permeabilità della membrana batterica, dovuta principalmente alla diminuita espressione delle porine, in particolare OprD, che rappresenta uno dei meccanismi di resistenza ai carbapenemi. Infatti, antibiotici come i β -lattamici entrano nella cellula attraverso le porine [18, 19].
- L'espressione di pompe di efflusso, che consentono al microorganismo di espellere sostanze dannose, tra cui gli antibiotici. Questo contribuisce a determinare la resistenza, sia intrinseca che acquisita, nei confronti di cloramfenicolo, macrolidi, lincosamide ed amminoglicosidi [20, 21].

Le pompe di efflusso vengono distinte in cinque famiglie, di cui la più rilevante nell'ambito della resistenza intrinseca è la RND

(resistance nodulation-division). Sono dodici le pompe di efflusso appartenenti a questa famiglia, quattro delle quali sono coinvolte nell'antibiotico resistenza: MexAB-OprM (responsabile dell'efflusso di β -lattamici e chinoloni), MexCD-OprJ (che garantisce l'efflusso dei β lattamici), MexEF-OprN (che elimina i chinoloni) e MexXY-OprM (la quale media l'efflusso degli amminoglicosidi) [22-23].

Considerata la loro rilevanza nel contesto dell'antibiotico-resistenza, gli inibitori delle pompe di efflusso rappresentano una potenziale nuova strategia terapeutica per fronteggiare questo patogeno [24].

- La sintesi di enzimi in grado di inattivare alcuni antibiotici, come le β -lattamasi. Le β -lattamasi sono enzimi idrolitici in grado di rompere il legame ammidico dell'anello β -lattamico, inattivando il farmaco. Le β -lattamasi, secondo la classificazione di Ambler, sono distinte in quattro classi (A, B, C e D) sulla base della loro sequenza amminoacidica. Le classi A, C e D idrolizzano i β -lattamici attraverso un sito attivo serinico, mentre quelle di classe B sono metalloenzimi che per farlo richiedono ioni di zinco divalenti [25].

La classe A comprende la maggior parte delle ESBL (extended-spectrum β -lactamases), le quali sono in grado di idrolizzare le penicilline a spettro esteso (es. piperacillina), le cefalosporine ma non le cefamicine e i monobattami; alcuni ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* sono in grado di produrre questo tipo di enzimi [26,27].

La classe B comprende tutte le metallo- β -lattamasi, tra cui VIM (Verona integron-encoded metallo β -lattamasi), Imp (imipenemasi) e NDM (New Delhi metallo β -lattamasi), le quali inattivano tutti i β -lattamici, compresi i carbapenemi, tranne il monobattamico aztreonam.

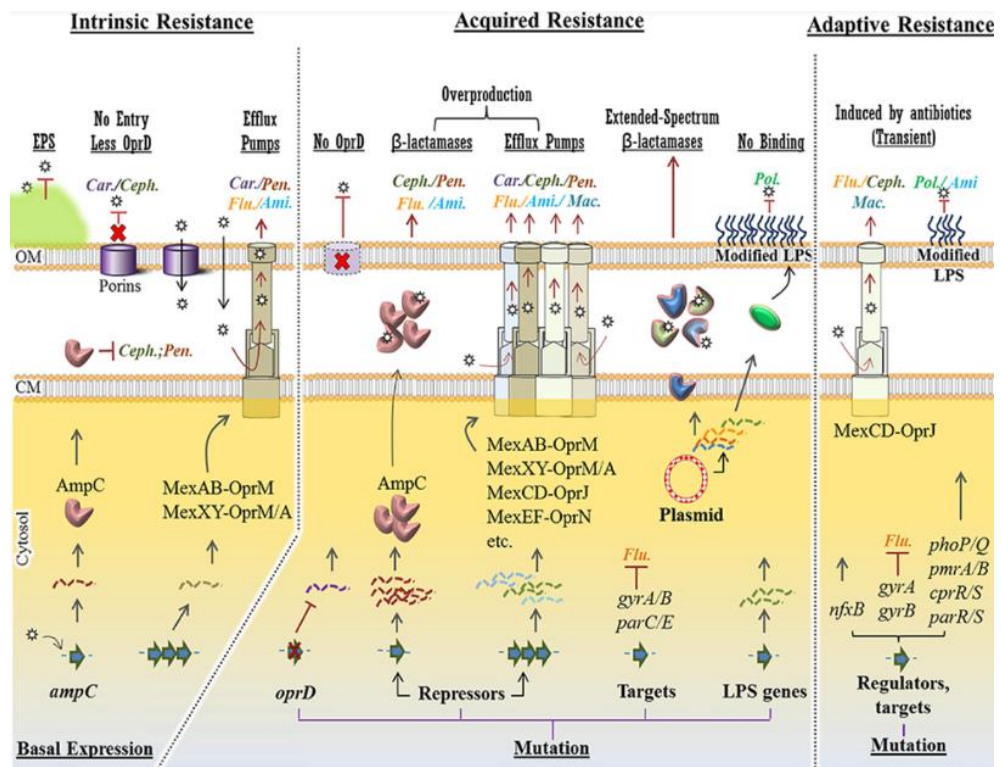
Infine, le β -lattamasi di classe C, in particolare AmpC, idrolizzano la maggior parte delle cefalosporine (eccetto il cefepime), cefamicine, e penicilline, mentre quelle di classe D includono le OXA, e idrolizzano principalmente le penicilline a spettro ristretto, anche se

alcune varianti, come l'OXA-48, possono inattivare i carbapenemi [26, 28].

Nella pratica clinica, per fronteggiare l'azione di questi enzimi, vengono prescritti gli inibitori delle β -lattamasi, come acido clavulanico, sulbactam e tazobactam.

Tra gli enzimi implicati nella resistenza antimicrobica intrinseca non sono comprese solo le β -lattamasi, ma anche enzimi responsabili dell'inattivazione degli amminoglicosidi, come amminoglicoside-fosfotransferasi (APH), amminoglicosideacetiltransferasi (AAC) e amminoglicoside-nucleotidiltransferasi (ANT) [29].

Figura 2.4: Meccanismi di resistenza intrinseca, estrinseca e adattativa.



Fonte: *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence; M. Fata Moradali, Shirin Ghods, Bernd Rehm

2.3.2 Resistenza adattativa

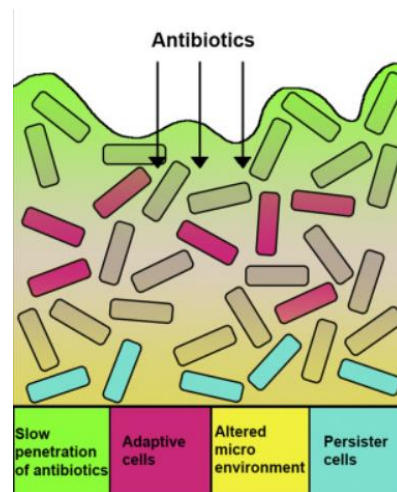
A differenza della resistenza intrinseca e di quella acquisita, che sono caratterizzate da un fenotipo irreversibile, e sono indipendenti dalla presenza o meno dell'antibiotico nell'ambiente [30], la resistenza adattativa è un tipo di resistenza inducibile, che interviene in risposta alla presenza di antibiotici o di altri stimoli ambientali, come la variazione del pH, della temperatura o della concentrazione di ossigeno.

In *Pseudomonas aeruginosa* i principali meccanismi di resistenza adattativa sono rappresentati dalla generazione di cellule persistenti e dalla formazione del biofilm.

I microrganismi contenuti nel biofilm sono meno sensibili all'azione degli antibiotici e del sistema immunitario. Tuttavia, quando un batterio perde la protezione del biofilm, la sua sensibilità agli antibiotici viene ripristinata, ciò suggerisce che la resistenza mediata dal biofilm sia indipendente da mutazioni genetiche [31,32].

Le cellule persistenti sono invece cellule in grado di sopravvivere ad alte concentrazioni di antibiotici, nonostante esse non abbiano acquisito geni di resistenza [33]. Esse rappresentano circa l'1% di tutte le cellule contenute nel biofilm, e sono caratterizzate da una lenta crescita e da un lento metabolismo, che le rende simili a cellule quiescenti [34]. Le cellule persistenti possono quindi ripopolare il biofilm quando le concentrazioni dell'antibiotico, dopo il trattamento, diminuiscono, e sono dunque responsabili della cronicizzazione e della recidiva di alcune infezioni [35].

Figura 2.5: Funzionamento dei meccanismi di resistenza adattativa: cellule persistenti e cellule adattative.



Fonte: *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies* Pang, Renee Raudonis, Bernard R. Glick, Tong-Jun Lin, Zhenyu Cheng. *Biotechnology Advances*

2.3.3 *Pseudomonas aeruginosa* MDR, XDR e PDR

L'emergenza di batteri multi-antibiotico resistenti ha reso necessaria l'introduzione di definizioni standardizzate, atte a descrivere e a classificare i batteri resistenti a più agenti antimicrobici. Ciò permette una più affidabile raccolta dei dati di sorveglianza epidemiologica, facilitando al contempo il confronto scientifico tra diverse strutture sanitarie e paesi.

Secondo le più recenti definizioni, con MDR (multidrug-resistant) si intende un batterio non suscettibile ad almeno un agente antimicrobico appartenente a tre o più classi antibiotiche, con XDR (extensively drug-resistant) si intende un batterio non suscettibile ad almeno un agente in tutte le categorie antimicrobiche tranne 2 o meno, mentre con PDR (pandrug-resistant) si intende un batterio resistente a qualsiasi agente antibiotico.

Le classi antibiotiche utilizzate per la definizione di *Pseudomonas aeruginosa* MDR, XDR e PDR sono illustrate nella Tabella 2.1 [36].

Ad oggi la prevalenza di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* MDR è stimata tra 15% e 30% [37], di cui il 65% soddisfa anche i criteri di inclusione per XDR [37,38]. Inoltre, a livello globale, l'isolamento di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* esclusivamente sensibili alla colistina (COS) non è

infrequente, e sono stati anche documentati isolamenti di *Pseudomonas aeruginosa* PDR [39,40]. Tuttavia, in molti degli studi considerati, non si tiene conto dei nuovi agenti anti-*Pseudomonas*, come ceftolozano-tazobactam, ceftazidime-avibactam, imipenem-relebactam e cefiderocol, i quali sono sicuramente una valida opzione terapeutica nei confronti di ceppi resistenti.

La correlazione tra spettro di resistenza e outcome clinico non è ancora del tutto chiara; tuttavia, diverse ricerche evidenziano che i pazienti affetti da infezioni causate da *Pseudomonas aeruginosa* MDR/XDR/PDR abbiano maggiore probabilità di ricevere una terapia antibiotica iniziale inadeguata [41,42], e di conseguenza di andare incontro ad una prognosi peggiore, in particolare in caso di batteriemia [43,44].

Tabella 2.1: Rappresentazione delle classi antibiotiche considerate per classificare *Pseudomonas Aeruginosa* in MDR, XDR e PDR.

Categoria antibiotica	Agente antibiotico	Risultato dei test di sensibilità (S or NS)
Amminoglicosidi	Gentamicina	
	Tobramicina	
	Amikacina	
Carbapenemi anti- <i>Pseudomonas</i>	Imipenem	
	Meropenem	
	Doripenem	
Cefalosporine anti- <i>Pseudomonas</i>	Ceftazidime	
	Cefepime	
Fluorochinoloni anti- <i>Pseudomonas</i>	Ciprofloxacina	
	Levofloxacina	
Penicilline anti- <i>Pseudomonas</i> + inibitore b-lattamasi	Ticarcillin-clavulanato	
	Piperacillin-tazobactam	
Monobattami	Aztreonam	
Acidi fosfonici	Fosfomicina	
Polimixine	Polimixina B	
	Colistina	

MDR: non sensibile a ≥ 1 agente in ≥ 3 categorie antimicrobiche.

XDR: non sensibile a ≥ 1 agente in tutte tranne ≤ 2 categorie.

PDR: non sensibile a tutti gli agenti in lista.

Fonte: Multidrug-resistant, extensively drug-resistant, and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance, Magiorakos et al., Clin. Microbiol. Infect.

3 Antibiotici utilizzati nelle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*

Vi sono diversi antibiotici che possono essere utilizzati nel trattamento delle infezioni da *Pseudomonas aeruginosa*; la scelta tra questi è influenzata da diversi fattori, come la sede dell'infezione, lo spettro di sensibilità all'antibiogramma, la possibilità di eseguire controllo del focolaio infettivo, e le condizioni cliniche del paziente.

Le classi antibiotiche più utilizzate in questo contesto sono:

- β -lattamici: presentano un'attività battericida tempo-dipendente e inibiscono la sintesi di parete del batterio, impedendo l'azione della transpeptidasi, enzima che catalizza la formazione dei legami peptidici crociati che rafforzano la struttura del peptidoglicano, costituente fondamentale della parete cellulare dei batteri. Tra le penicilline ad attività anti-*Pseudomonas* la più usata è piperacillina-tazobactam, mentre tra le cefalosporine soprattutto cefepime, ceftobiprole, ceftazidime e ceftolozane, queste ultime due eventualmente associate rispettivamente ad avibactam e tazobactam, farmaci inibitori delle β -lattamasi [45-47].

Tra le cefalosporine di nuova generazione spicca cefiderocol, un antibiotico sideroforo, ovvero un antibiotico che viene trasportato attivamente all'interno del batterio legando il ferro; esso viene somministrato in caso di infezioni gravi mediate da ceppi multiresistenti, e rappresenta una delle più valide armi a disposizione contro *Pseudomonas aeruginosa* MDR, XDR o PDR [48].

Una classe antibiotica ampiamente adoperata in prima linea è quella dei carbapenemi, in particolare meropenem e imipenem [46,47].

Pseudomonas aeruginosa può sviluppare resistenza nei confronti di questa classe antibiotica in diversi modi, soprattutto con la produzione di β -lattamasi, la ridotta espressione delle porine e l'utilizzo delle pompe di efflusso [16, 19, 21, 28].

- Fluorochinoloni: presentano un'attività battericida concentrazione-dipendente e inibiscono l'attività della DNA-girasi e della topoisomerasi,

enzimi essenziali per la replicazione del DNA batterico [49]. Tra questi, i più efficaci contro *Pseudomonas aeruginosa* sono levofloxacin e ciprofloxacina, sia in monoterapia che in combinazione. La resistenza a questa classe è mediata principalmente dall'azione di pompe di efflusso che ne permettono l'eliminazione da parte del batterio [21].

- Amminoglicosidi: presentano un'attività battericida concentrazione-dipendente e inibiscono la sintesi proteica batterica inibendo la subunità 30S del ribosoma [50]. Tra i più efficaci contro *Pseudomonas aeruginosa* spiccano la amikacina, e la gentamicina, utilizzate per lo più in terapie di combinazione con altri agenti, soprattutto β -lattamici [46,47]. La resistenza a questi antibiotici è dovuta generalmente a modifica del target, e quindi della subunità 30S del ribosoma [25].
- Polimixine: presentano un'attività battericida legandosi al lipopolisaccaride della membrana cellulare esterna dei batteri Gram-negativi, e, attraverso la coda apolare, danneggiando le membrane interne ed esterne del batterio con una modalità d'azione simile a quella di un detergente. La più utilizzata contro *Pseudomonas aeruginosa* è la polimixina E, anche chiamata colistina, soprattutto nelle infezioni severe in cui sono coinvolti ceppi multiresistenti [46,47,51]. Molto raramente *Pseudomonas aeruginosa* può sviluppare resistenza anche in questo caso, modificando la struttura del lipopolisaccaride [52].
- Fosfomicina: si tratta di un farmaco battericida che interrompe la sintesi della parete cellulare, inibendo la fosfoenolpiruvato sintetasi, e quindi interferendo con la produzione del peptidoglicano [53]. Essa viene adoperata prevalentemente in monoterapia per le infezioni delle vie urinarie, oppure in combinazione con altri antibiotici in caso di infezioni severe [46,47].

Tabella 3.1: β -lattamasi prodotte da *Pseudomonas aeruginosa* e rispettive resistenze conferite ai principali antibiotici anti-pseudomonas

Antibiotic	AmpC \uparrow	MexAB \uparrow	OprD-	AmpC Ω -loop*	OXA ESBL	ESBL	CarbA	CarbA Mut**	CarbB	Iron transp.
Ceftolozane/tazobactam	S	S	S	R	R	r/R	R	R	R	S
Ceftazidime/avibactam	S/r	r	S	r/R	r/R	S/r	S	R	R	S
Meropenem/vaborbactam	S	r	r	S	S	S	r/R	S	R	S
Imipenem/relebactam	S	r	r	S	S	S	r/R	S	R	S
Cefiderocol	S	S	S	S/r	S/r	S/r	S/r	S/r	S/r	r
Aztreonam/avibactam	S	R	S	r/R	r/R	S/r	S/r	r/R	S	S
Cefepime/zidebactam	S	r/R	S	S/r	S/r	S/r	S/r	S/r	r/R	S
Cefepime/taniborbactam	S	r/R	S	S/r	S/r	S/r	S/r	S/r	r/R	S

Fonte: Oliver A. Clin Microb infect 2023

4 Infezioni causate da *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa è un patogeno opportunisto in grado di determinare infezioni, sia acute che croniche, a carico di diversi organi bersaglio.

I pazienti maggiormente a rischio di infezione sono i soggetti immunocompromessi e neutropenici, ma anche coloro che sono affetti da una patologia polmonare cronica, come fibrosi cistica e broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), o sottoposti a ventilazione invasiva [54].

Si stima che questo patogeno sia coinvolto in circa il 7% delle infezioni ospedaliere, con percentuali anche maggiori nell'ambito delle terapie intensive [55].

Il principale sito di infezione di *Pseudomonas aeruginosa* è il polmone, dove determina polmoniti ospedaliere (HAP) e polmoniti associate a ventilatore (VAP), con mortalità stimata da 30% a 42% [56,57].

Questo batterio è inoltre causa di infezioni delle vie urinarie (soprattutto catetere associate), infezioni di cute e tessuti molli (tra cui quelle delle ferite chirurgiche), otiti, infezioni oculari, endocarditi e batteriemie; queste ultime sono oggetto di questo studio [54].

4.1 Batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*

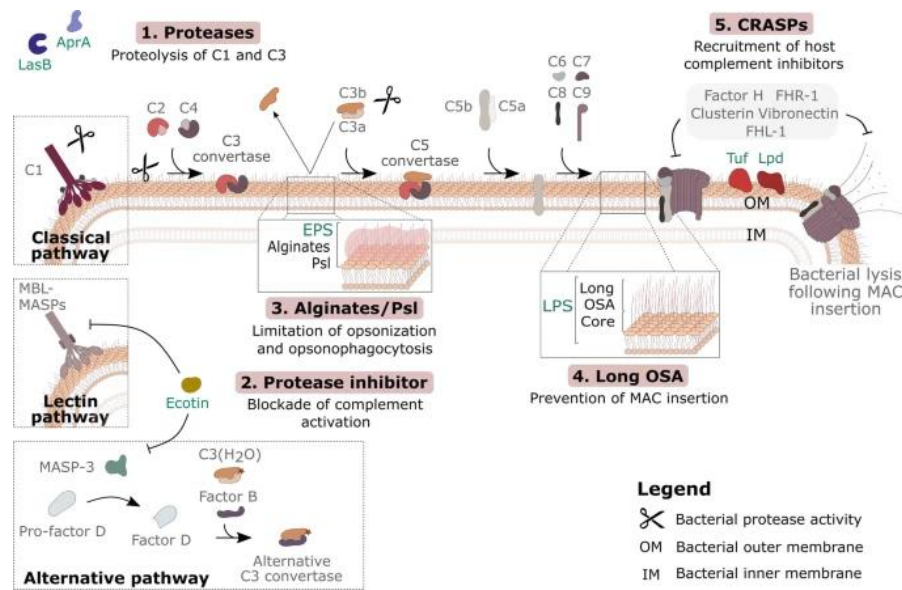
Pseudomonas aeruginosa è l'agente responsabile dell'8,5% di tutte le batteriemie, con una mortalità stimata dal 20% al 50%, la più alta tra tutti i batteri che determinano batteriemia [58-60].

Nella maggior parte dei casi la batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa* è secondaria ad un'infezione polmonare, intra-addominale o urinaria, ma può anche originare da un catetere venoso centrale o essere una batteriemia primaria, ovvero una batteriemia in cui non si è determinato il sito di origine [60].

I meccanismi con cui *Pseudomonas aeruginosa* causa batteriemia sono ad oggi non del tutto chiari. In questo processo *Pseudomonas aeruginosa* compie tre step cruciali [60]:

1. La colonizzazione di un sito primario di infezione: esso tende a invadere le membrane apicali avvalendosi in particolare del flagello [61].
2. Il superamento della barriera tissutale ed endoteliale: si è visto che questo batterio tende ad approfittare di condizioni di debolezza dell'epitelio, come la divisione cellulare o la presenza di lesioni, in modo da migrare a livello del versante baso-laterale dell'epitelio. Successivamente il batterio può indebolire le giunzioni intercellulari tramite i suoi fattori di virulenza, in particolare le tossine ExoU e ExoS rilasciate dal T3SS (Type 3 secretion system) ed il lipopolisaccaride, per poi superarle per via paracellulare [60,62]. I meccanismi di superamento della barriera endoteliale sono meno noti, ma probabilmente riconducibili a quelli della barriera epiteliale [63].
3. La sopravvivenza nel torrente ematico: *Pseudomonas aeruginosa* è in grado di sfuggire al sistema immunitario, in particolare neutrofili e monociti, inibendo la fagocitosi grazie agli effettori rilasciati dal T3SS [64]. Esso è inoltre in grado di evadere l'azione del complemento, rilasciando proteasi come LasB e AprA, che inattivano alcuni componenti come C1q, C2 e C3 [65]; sembra che anche il lipopolisaccaride, in particolare l'antigene O, protegga il batterio dal complemento, inibendo l'azione del MAC (complesso di attacco delle membrane) [66]. *Pseudomonas aeruginosa* può anche rilasciare alginato e Pls, che interferiscono con la cascata del complemento [67], e reclutare dei regolatori negativi del complemento dall'ospite [68].

Figura 4.1: Fisiopatologia della batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: *Molecular Mechanisms Involved in Pseudomonas aeruginosa Bacteremia*, Pont, S., Janet-Maitre, M., Faudry, E., Cretin, F., Attrée, I.; *Pseudomonas aeruginosa* pp 325-345

5 Scopo dello studio

Come già accennato nell'introduzione, lo shock settico è una complicanza di rilievo nei pazienti affetti da batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, a causa delle conseguenze devastanti ad essa correlate [3, 4, 5].

Nei pazienti con noto o sospetto shock settico dovuto a *Pseudomonas aeruginosa*, è generalmente raccomandata una terapia empirica di combinazione [69-71]. Questa strategia mira a garantire la suscettibilità *in vitro* ad almeno uno degli antibiotici combinati [72,73], e a ridurre l'emergenza di ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* resistenti [74, 75].

I dati attuali riguardanti gli effetti sinergici della terapia empirica di combinazione sono scarsi e contrastanti [76-83]; pochi studi si sono focalizzati su questo aspetto, e nessuno si è concentrato in modo specifico sui pazienti con shock settico, la popolazione con il più alto rischio di esito infausto, e che dunque potrebbe trarre i maggiori benefici da un'adeguata terapia empirica [84].

L'obiettivo del presente studio è quello di valutare l'efficacia di un'adeguata terapia empirica di combinazione rispetto ad una adeguata monoterapia sull'outcome primario, ovvero la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'insorgenza dell'infezione, in pazienti affetti da shock settico causato da batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*.

6 Materiali e Metodi

6.1 Disegno dello studio

Si tratta di uno studio di coorte, retrospettivo e multicentrico, focalizzato su pazienti ospedalizzati affetti da shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, nel periodo compreso tra gennaio 2021 e dicembre 2022.

Lo studio include pazienti provenienti da 14 ospedali pubblici, situati in 8 regioni italiane (Liguria, Piemonte, Lombardia, Lazio, Veneto, Emilia-Romagna, Puglia e Sicilia), in particolare:

1. Policlinico Universitario San Martino (ospedale universitario con 1200 posti letto a Genova);
2. Ospedale Molinette (ospedale con 1400 posti letto a Torino);
3. Ospedale Santa Croce e Carle (ospedale con 800 posti letto a Mestre);
4. Ospedale di Ivrea (ospedale con 240 posti letto a Ivrea);
5. Grande Ospedale Metropolitano Niguarda (ospedale con 1200 posti letto a Milano);
6. Ospedale Nuovo (ospedale con 550 posti letto a Legnano);
7. Ospedale Civile (ospedale con 1300 posti letto a Brescia);
8. Policlinico Universitario Azienda Ospedaliera (ospedale universitario con 1600 posti letto a Padova);
9. Ospedale Dell'Angelo (ospedale con 680 posti letto a Mestre);
10. IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico di Sant'Orsola (ospedale universitario con 1500 posti letto a Bologna);
11. Policlinico Universitario Agostino Gemelli (ospedale universitario con 1500 posti letto a Roma);
12. Policlinico Universitario Giovanni XXIII (ospedale universitario con 1550 posti letto a Bari);
13. Policlinico Universitario Gaspare Rodolico (ospedale universitario con 800 posti letto a Catania);

14. Policlinico Universitario Paolo Giaccone (ospedale con 490 posti letto a Palermo).

In ogni centro ospedaliero, un team di medici specialisti in malattie infettive gestisce dal punto di vista clinico tutti i pazienti con batteriemia, fornendo ai colleghi direttamente responsabili di questi pazienti consigli diagnostici e terapeutici. Ai fini di tale studio, ciascun paziente è stato seguito dal momento in cui le emocolture si sono positivizzate, fino alla dimissione, morte o fino a 30 giorni dalla diagnosi, a seconda di quale di questi eventi si sia verificato prima.

6.2 Criteri di inclusione ed esclusione

Per poter essere inclusi nel presente lavoro, tutti i pazienti con shock settico dovevano avere ricevuto una terapia antibiotica empirica adeguata, definita come una terapia che rispetta le seguenti caratteristiche:

- una terapia somministrata entro le 24 ore dall'insorgenza della batteriemia;
- una terapia somministrata prima di conoscere i risultati dei test di suscettibilità antibiotica;
- una terapia successivamente verificata essere efficace *in vitro*.

Per quanto riguarda le batteriemie ricorrenti da *Pseudomonas aeruginosa*, l'analisi finale ha incluso solamente il primo episodio per ogni paziente.

6.3 Raccolta dei dati

Le cartelle cliniche sono state consultate retrospettivamente, al fine di raccogliere alcune variabili generiche del paziente, come età, genere, comorbidità e Charlson comorbidity index [85].

Altre variabili aggiuntive che sono state raccolte sono la presenza di immunosoppressione (chemioterapia, radioterapia, e/o altre terapie immunosoppressive al momento dell'insorgenza della batteriemia), neutropenia (definita come una conta assoluta di granulociti neutrofili

inferiore a 500/ μ L), e procedure invasive a cui il paziente è stato sottoposto nei 30 giorni precedenti all'insorgenza della batteriemia; queste includono: posizionamento di catetere vescicale, catetere venoso centrale (CVC) o operazioni chirurgiche.

Sono state anche raccolte informazioni rilevanti in merito all'infezione, quali, ad esempio, la precedente storia di colonizzazione nei 90 giorni precedenti la batteriemia, la suscettibilità antibiotica dei ceppi di *Pseudomonas aeruginosa* isolati, la fonte dell'infezione, l'aver ricevuto un adeguato source control dell'infezione, la terapia antibiotica ricevuta e la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'insorgenza dell'infezione.

6.4 Variabile d'esposizione primaria

La variabile d'esposizione primaria è stata identificata nel numero di antibiotici attivi *in vitro* somministrati come terapia antibiotica empirica.

Secondo il protocollo adoperato nello studio, i pazienti sono stati classificati, in base al numero di antibiotici somministrati empiricamente ed attivi *in vitro*, nei seguenti due gruppi:

- **AECT** (terapia empirica adeguata di combinazione), in cui i pazienti hanno ricevuto simultaneamente almeno due antibiotici attivi *in vitro*, con diverso meccanismo di azione contro il patogeno isolato;
- **AEMT** (monoterapia empirica adeguata), in cui i pazienti hanno ricevuto solamente un antibiotico attivo *in vitro*.

Se un paziente aveva ricevuto due agenti anti-*Pseudomonas*, ma solo uno era attivo *in vitro*, la terapia antibiotica empirica è stata considerata come AEMT.

Inoltre, la monoterapia con aminoglicosidi è stata considerata adeguata solo quando somministrata per batteriemie originate dalle vie urinarie [79].

6.5 Endpoint primario

L'endpoint primario dello studio è la mortalità a 30 giorni per ciascuna causa, ovvero la mortalità conseguente a qualsiasi causa (non

necessariamente dovuta a *Pseudomonas aeruginosa*) nei 30 giorni successivi alla prima emocoltura positiva per *Pseudomonas aeruginosa*.

6.6 Altre definizioni

Tutte le definizioni utilizzate per le seguenti variabili sono state stabilite prima dell'analisi dei dati.

- **Un episodio di batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*** è stato definito con almeno un'emocoltura positiva per *Pseudomonas aeruginosa*, ottenuta da un paziente con segni e/o sintomi di infezione.
- **L'insorgenza della batteriemia** è stata definita come la data della raccolta della prima emocoltura positiva per il patogeno di interesse.
- **Lo shock settico** è stato registrato nelle prime 24 ore dall'insorgenza della batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, ed è stato definito in linea con la terza definizione di consenso internazionale per sepsi e shock settico (Sepsis-3) [86].
- **L'origine della batteriemia**, questa è stata definita in accordo ai criteri dello "US Centers for Disease Control and Prevention" [87]. In accordo a studi precedentemente pubblicati, la fonte della batteriemia è stata inoltre divisa in due categorie: "low-risk" (tratto urinario, CVC e cute e tessuti molli) e "high-risk" (tutte le altre fonti).
- **Un controllo precoce del focolaio infettivo** è stato definito come la rimozione precoce (entro 24 ore dall'insorgenza della batteriemia) di un preesistente dispositivo (es. CVC o pacemaker) o l'eventuale drenaggio (es. drenaggio di ascesso) di un focolaio infettivo considerato come possibile origine della batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*. [7].
- **La terapia definitiva** è stata considerata come il trattamento che è iniziato o continuato dal giorno in cui erano disponibili, al medico che aveva in cura il paziente, i risultati dei test di suscettibilità del batterio isolato.

- Tutte le terapie definitive sono state definite **terapie definitive adeguate** in base ai risultati dei test di suscettibilità *in vitro*; in particolare sono state definite:
 - ADCT (terapia definitiva adeguata di combinazione), quando sono stati somministrati almeno due antibiotici attivi *in vitro*;
 - ADMT (monoterapia definitiva adeguata), quando è stato somministrato un solo antibiotico attivo *in vitro*.

6.7 Studi Microbiologici

Le emocolture, l'identificazione del microrganismo e i test di suscettibilità sono stati condotti in ogni centro partecipante, sulla base di procedure operative standard.

L'interpretazione della suscettibilità antibiotica è stata fornita dai laboratori di ogni centro, secondo le raccomandazioni EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) [88].

I criteri con cui *Pseudomonas aeruginosa* è stato classificato come MDR, XDR o PDR, derivano dalle definizioni internazionali standardizzate proposte da Magiorakos et al. [36].

6.8 Etica

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico del centro coordinatore (Comitato Etico interaziendale, City of Health and Sciences, Turin, pratica N. 202/2023, PROT.N. 0066633) ed è conforme alla dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato è stato ritenuto non necessario, considerata la natura retrospettiva dello studio.

7 Analisi Statistica

Gli outcome clinici dei pazienti che hanno ricevuto AECT, sono stati comparati con quelli dei pazienti a cui è stata somministrata AEMT.

Le variabili continue sono state presentate tramite la mediana e l'interquartile range (IQR), mentre le variabili categoriche sono state descritte mediante conteggio e percentuale.

Le variabili categoriche sono state poste a confronto tramite il test del χ^2 o il test esatto di Fisher, quando appropriato; il test di Wilcoxon-Mann-Whitney è stato invece impiegato per le variabili continue.

L'impatto indipendente delle variabili sulla sopravvivenza è stato determinato sia con un'analisi univariata, sia con un'analisi multivariata, utilizzando la regressione di Cox.

Le variabili con p-value inferiore a 0.1 nell'analisi univariata sono state incluse nell'analisi multivariata.

La collinearità è stata valutata attraverso matrici di correlazione.

Per ogni variabile sono stati determinati hazard ratio aggiustato (aHR) ed il rispettivo intervallo di confidenza al 95% (95% CI). Un p-value ≤ 0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

Le analisi sono state condotte con il software SPSS versione 28.0.1.0 (SPSS Software, Chicago, IL).

8 Risultati

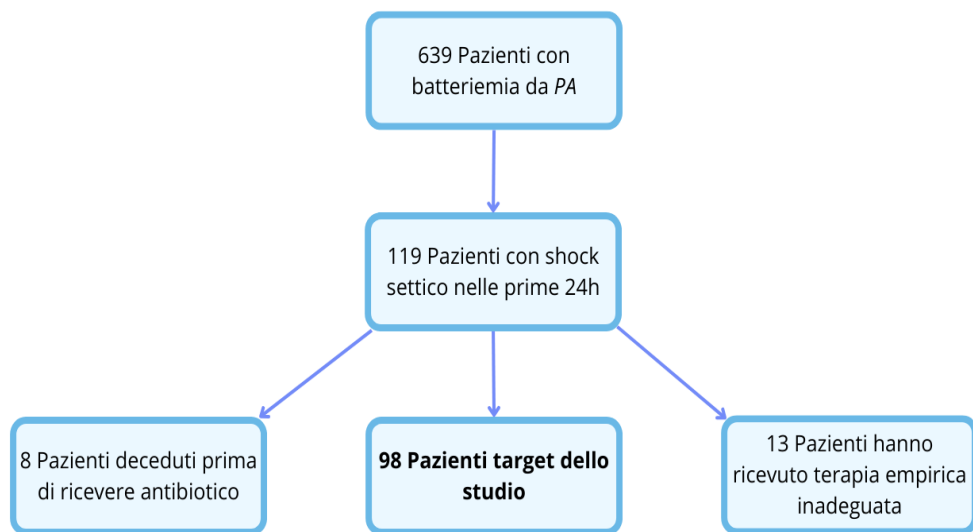
Durante i due anni considerati nello studio sono stati identificati un totale di 639 episodi di batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*.

Complessivamente, 119 pazienti su 639 (18.6%) hanno soddisfatto i criteri di shock settico entro le prime 24 ore dall'insorgenza della batteriemia.

Otto pazienti sono morti prima di ricevere qualsiasi terapia antibiotica e 13 pazienti sono stati esclusi perché hanno ricevuto una terapia empirica inadeguata.

In definitiva, 98 episodi di shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa* sono stati inclusi nell'analisi statistica finale, e rappresentano l'oggetto dello studio (Figura 8.1).

Figura 8.1: Diagramma di flusso del design dello studio con pazienti inclusi nell'analisi statistica definitiva.



La **Tabella 8.1** mostra le caratteristiche cliniche e demografiche della popolazione dello studio. I pazienti sono stati classificati secondo la terapia empirica ricevuta in AECT (24 pazienti [24.5%]) e AEMT (74 pazienti [75.5%]). Tra i 74 pazienti che hanno ricevuto AEMT, 2 (2.7%) sono stati trattati con due antibiotici contemporaneamente, ma solo uno era attivo *in vitro*.

Tabella 8.1: Caratteristiche demografiche e cliniche dei 98 pazienti con shock settico da batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, categorizzati in base al tipo di terapia empirica.

VARIABILE	Totale N=98	AEMT (n = 74)	AECT (n = 24)	P- value
Età (anni), mediana (IQR)	68.0 (58.0-76.0)	70.0 (59.8-78.0)	60 (49.8-69.7)	0.006
Sesso maschile, n (%)	63 (64.3)	46 (62.2)	17 (70.8)	0.48
Patologie sottostanti, n (%)				
Malattie cardiovascolari	33 (33.7)	26 (35.1)	7 (29.2)	0.63
Tumori solidi	24 (24.5)	18 (24.3)	6 (25.0)	1.00
Malattie neurologiche	23 (23.5)	19 (25.7)	4 (16.7)	0.42
Diabete mellito	17 (17.3)	15 (20.3)	2 (8.3)	0.23
Broncopneumopatia cronica ostruttiva	14 (14.3)	12 (16.2)	2 (8.3)	0.51
Malattie gastrointestinali	13 (13.3)	7 (9.5)	6 (25.0)	0.08
Insufficienza renale cronica	13 (13.3)	11 (14.9)	2 (8.3)	0.51
Tumori ematologici	13 (13.3)	8 (10.8)	5 (20.8)	0.29
Charlson comorbidity index (median, IQR)	4.0 (2.0-6.0)	4 (2-4)	2 (3.5-6)	0.39
Immunosoppressione, n (%)	44 (44.9)	31 (41.9)	13 (54.2)	0.35
Neutropenia, n (%)	10 (10.2)	5 (6.8)	5 (20.8)	0.06
Procedure invasive, n (%)				
Catetere urinario	66 (67.3)	50 (67.6)	16 (66.7)	1.00
Catetere venoso centrale	63 (64.3)	47 (63.5)	16 (66.7)	1.00
Chirurgia	32 (32.7)	26 (35.1)	6 (25.0)	0.46
Precedente colonizzazione da <i>P. aeruginosa</i>, n (%)	29 (29.6)	21 (28.4)	8 (33.3)	0.79
Degenza mediana in ospedale fino all'insorgenza della BSI, (IQR, giorni)	9.5 (2.0-31.0)	9 (2-33.5)	13 (2.25-26.0)	0.85

VARIABILE	Totale N=98	AEMT (n = 74)	AECT (n = 24)	P- value
Profilo di suscettibilità, n (%)				
Non-MDR	90 (91.8)	71 (95.9)	19 (79.2)	0.01
MDR-XDR	8 (8.2)	3 (4.1)	5 (20.8)	
Low-risk BSI, n (%)	25 (25.5)	19 (25.7)	6 (25.0)	0.46
BSI associate a CVC	17 (17.3)	11 (14.9)	6 (25.0)	0.35
Infezione cute e tessuti molli	5 (5.1)	5 (6.8)	0 (0.0)	0.33
Infezione urinaria	3 (3.1)	3 (4.1)	0 (0.0)	1.00
High-risk BSI, n (%)	73 (74.5)	55 (74.3)	18 (75.0)	1.00
Infezione respiratoria	35 (35.7)	25 (33.8)	10 (41.7)	0.63
Primaria	32 (32.7)	27 (36.5)	5 (20.8)	0.21
Addominale	6 (6.1)	3 (4.1)	3 (12.5)	0.16
Precoce controllo del focolaio infettivo, n (%)	9/23 (39.1)	7/16 (43.8)	2/7 (28.6)	0.66
Terapia definitiva, n (%)				
Monoterapia	46/71 (64.8)	38/50 (76.0)	8/ 21 (38.1)	0.006
Terapia di combinazione	25 /71 (32.2)	12/50 (24.0)	13/21 (61.9)	
Outcome, n (%)				
Necessità di CRRT dopo lo shock settico da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13 (13.3)	9 (12.2)	4 (16.7)	0.73
Mortalità per ciascuna causa a 30 gg	48 (49.0)	42 (56.8)	6 (25.0)	0.01

I carbapenemici (35.7%) e piperacillina-tazobactam (29.6%) sono stati i farmaci più utilizzati nel gruppo AEMT. Invece, tra i 24 pazienti trattati con AECT, le associazioni più utilizzate sono state meropenem+amminoglicoside e piperacillina-tazobactam+amminoglicoside (5.1% entrambe).

Maggiori informazioni sulle terapie antibiotiche prescritte e le relative frequenze sono consultabili nella **Tabella 8.2**.

Tabella 8.2: Caratteristiche del trattamento empirico dei 98 pazienti con shock settico da batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*.

Tipo di terapia empirica		Numero di pazienti (n=98)
AEMT 74 (75.5)	Meropenem	35 (35.7)
	Piperacillina-tazobactam	29 (29.6)
	Ceftazidime-avibactam	2 (2.0)
	Colistina	2 (2.0)
	Cefepime	1 (1.0)
	Ceftazidime	1 (1.0)
	Cefiderocol	1 (1.0)
	Ceftolozano-tazobactam	1 (1.0)
	Ceftobiprole	1 (1.0)
	Gentamicina	1 (1.0)
AECT 24 (24.5)	Piperacillina-tazobactam/ Amikacina	5 (5.1)
	Meropenem/ Amikacina	5 (5.1)
	Ceftazidime-avibactam/ Amikacina	3 (3.1)
	Colistina/ Meropenem	1 (1.0)
	Colistina/ Ceftazidime-avibactam	1 (1.0)
	Colistina/ Fosfomicina	1 (1.0)
	Piperacillina-tazobactam /Fosfomicina	1 (1.0)
	Cefiderocol / Ciprofloxacina	1 (1.0)
	Cefiderocol/ Fosfomicina	1 (1.0)
	Ceftazidime/Fosfomicina	1 (1.0)
	Ceftazidime/ Ciprofloxacina	1 (1.0)
	Ceftazidime-avibactam/ Fosfomicina	1 (1.0)
Ceftolozane-tazobactam/ Amikacina	1 (1.0)	

8.1 Mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione in rapporto alla terapia antibiotica empirica ricevuta

Il tasso di mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione è stato del 49.0% (48/98), con una mediana della degenza ospedaliera

dall'insorgenza della batteriemia di 13.0 giorni (IQR 2.0-32.0). Come mostrato nella **Tabella 8.1** il gruppo AECT ha presentato un tasso di mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione minore rispetto al gruppo AEMT (6 su 24 [25.0%] vs 42 su 74 [56.8%], $p=0.01$). I pazienti che hanno ricevuto AECT erano più giovani e avevano più frequentemente una batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa* MDR o XDR.

Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi in termini di comorbidità, procedure invasive, fonte dell'infezione o esecuzione di controllo precoce del focolaio infettivo.

8.2 Predittori di mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione

L'analisi univariata ha identificato le variabili significativamente associate con la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione (**Tabella 8.3**). La regressione di Cox multivariata (**Tabella 8.4**) ha confermato solo la batteriemia con "high-risk source" dell'infezione come fattore indipendentemente associato ad una maggiore mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione (aHR, 2.60; 95% CI, 1.16- 5.82; $p=0.02$).

D'altro canto, ricevere AECT è stata l'unica variabile associata ad una maggiore sopravvivenza (aHR 0.39; 95% CI 0.16-0.95; $p=0.04$).

Tabella 8.3: Analisi univariata con modello di Cox della mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione nei 98 pazienti con shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*.

VARIABILE	Vivi (n = 50)	Morti (n = 48)	HR	95% CI	P value
Età (anni), mediana (IQR)	66.0 (56.0- 73.0)	69.0 (58.0- 79.0)	1.02	0.99-1.04	0.09
Sesso maschile, n (%)	34 (68.0)	29 (60.4)	0.84	0.47-1.49	0.83
Patologie sottostanti, n (%)					
Malattie cardiovascolari	15 (30.0)	18 (37.5)	1.41	0.79-2.53	0.25
Tumori solidi	14 (28.0)	10 (20.8)	0.76	0.38-1.52	0.44

VARIABILE	Vivi (n = 50)	Morti (n = 48)	HR	95% CI	P value
Malattie neurologiche	13 (26.0)	10 (20.8)	0.88	0.44-1.78	0.73
Diabete mellito	11 (22.0)	6 (12.5)	0.66	0.28-1.54	0.33
Broncopneumopatia cronica ostruttiva	4 (8.0)	10 (20.8)	1.79	0.89-3.61	0.10
Malattie gastrointestinali	9 (18.0)	4 (8.3)	0.52	0.19-1.44	0.21
Insufficienza renale cronica	5 (10.0)	8 (16.7)	1.59	0.74-3.40	0.23
Tumori ematologici	7 (14.0)	6 (12.5)	0.95	0.40-2.24	0.91
Charlson comorbidity index, mediana (IQR)	4.0 (2.0- 6.0)	4.0 (3.0- 6.0)	1.02	0.92-1.13	0.73
Immunospressione, n (%)	23 (46.0)	21 (43.8)	0.93	0.53-1.65	0.82
Neutropenia, n (%)	5 (10.0)	5 (10.4)	1.01	0.40-2.56	0.97
Procedure invasive, n (%)					
Catetere urinario	35 (70.0)	31 (64.6)	0.91	0.50-1.65	0.76
Catetere venoso centrale	38 (76.0)	25 (52.1)	0.50	0.28-0.89	0.02
Chirurgia	18 (36.0)	14 (29.2)	0.84	0.45-1.56	0.57
Precedente colonizzazione da <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, n (%)	18 (36.0)	11 (22.9)	0.66	0.33-1.29	0.22
Degenza ospedaliera mediana dall'insorgenza della BSI, giorni (IQR)	7.5 (2.0- 24.0)	10.0 (4.0- 36.0)	1.00	0.99-1.01	0.98
Profilo di suscettibilità, n (%)					
Non-MDR	45 (90.0)	45 (93.8)	Ref	Ref	Ref
MDR-XDR	5 (10.0)	3 (6.3)	0.65	0.20-2.10	0.47
Low-risk BSI, n (%)	18 (36.0)	7 (14.6)	Ref	Ref	Ref
BSI associata a CVC	12 (24.0)	5 (10.4)	0.46	0.18-1.15	0.09
Infezione cute e tessuti molli	4 (8.0)	1 (2.1)	0.31	0.04-2.24	0.25
Infezione urinaria	2 (4.0)	1 (2.1)	0.71	0.09-5.14	0.73
High-risk BSI, n (%)	32 (64.0)	41 (85.4)	2.49	1.11-5.57	0.03
Infezione respiratoria	15 (30.0)	20 (41.7)	1.33	0.75-2.37	0.33
BSI primaria	14 (28.0)	18 (37.5)	1.48	0.82-2.66	0.19
Infezione addominale	3 (6.0)	3 (6.3)	0.96	0.29-3.10	0.95
Terapia empirica, n (%)					

VARIABILE	Vivi (n = 50)	Morti (n = 48)	HR	95% CI	P value
AEMT	32 (64.0)	42 (87.5)	Ref	Ref	Ref
AECT	18 (36.0)	6 (12.5)	0.35	0.15-0.82	0.01
Precoce controllo del focolaio infettivo n (%)	6/13 (49.2)	3/10 (33.3)	0.66	0.16-2.64	0.56
Terapia definitiva, n (%)					
ADMT	30 (60.0)	16/21 (76.2)	Ref	Ref	Ref
ADCT	20 (40.0)	5/21 (23.8)	0.48	0.17-1.32	0.15
Necessità di CRRT dopo shock settico da <i>P.aeruginosa</i>	6 (12.0)	7 (14.6)	1.05	0.47-2.36	0.89

*Tabella 8.4: Regressione multivariata di Cox della mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione nei 98 pazienti con shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*.*

Variabile	aHR	IC 95%	P value
Età, anni	1.01	0.99-1.04	0.22
Terapia empirica adeguata di combinazione	0.39	0.16- 0.95	0.04
High risk source della batteriemia	2.60	1.16-5.82	0.02

Bisogna inoltre sottolineare che, una volta escluso l'unico paziente trattato empiricamente in monoterapia con un aminoglicoside, il modello finale non cambiava, offrendo dei risultati del tutto sovrapponibili a quelli della intera coorte di pazienti (dati non riportati).

La **Figura 8.2** mostra la sopravvivenza cumulativa dei pazienti con shock settico che hanno ricevuto AECT rispetto a quelli che hanno ricevuto AEMT (p-value= 0.009). Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier, stratificate in base al grado di rischio della sorgente dell'infezione ("low-risk

source” e “high-risk source”), confermano la ridotta mortalità associata alla AECT. Queste curve sono mostrate nella **Figura 8.3**.

Figura 8.2: Curva della sopravvivenza cumulativa dei pazienti che hanno ricevuto terapia di combinazione empirica adeguata (AECT) rispetto a quelli che hanno ricevuto monoterapia empirica adeguata (AEMT).

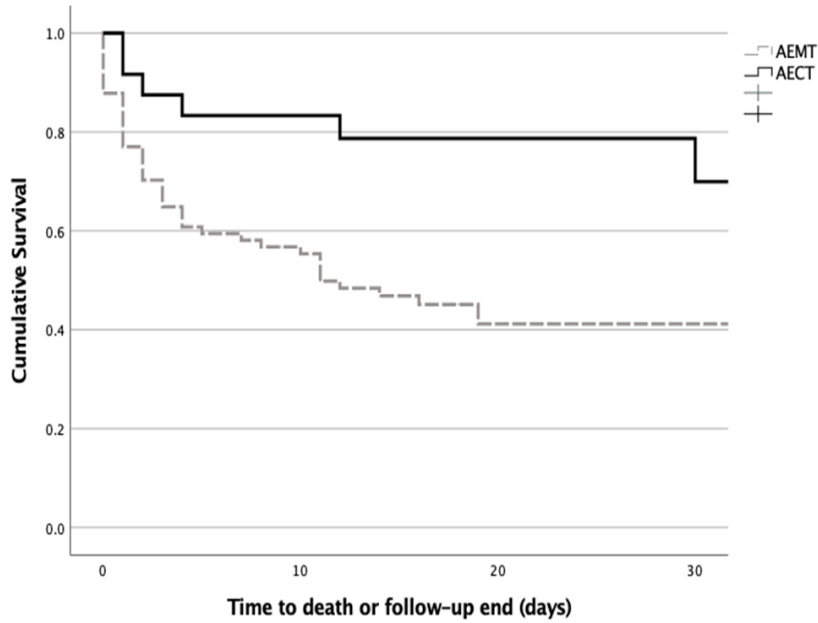
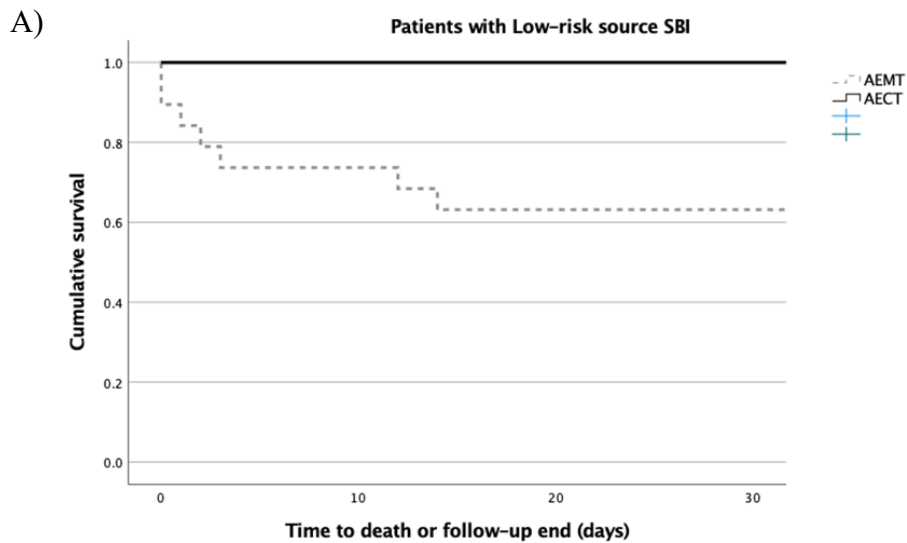
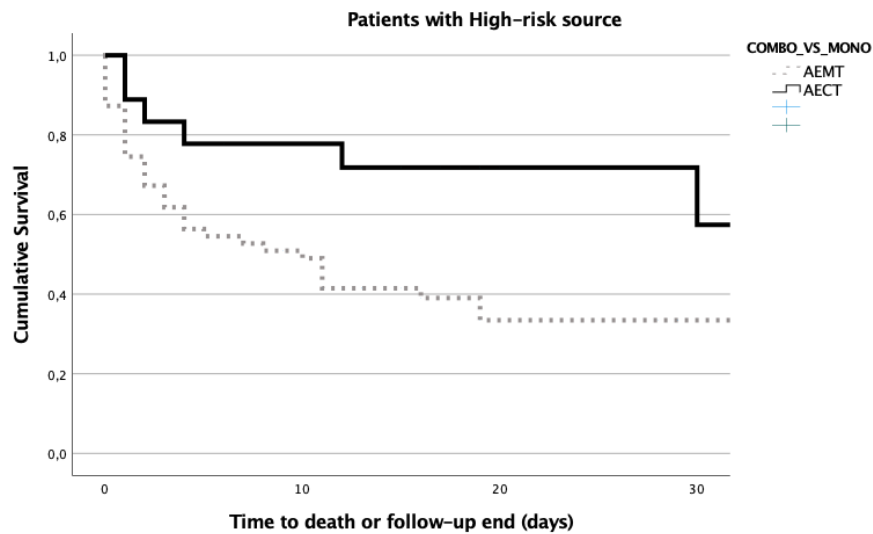


Figura 8.3: Curve di sopravvivenza cumulativa che confrontano la terapia di combinazione empirica adeguata (AECT) con la monoterapia (AEMT) tra pazienti con “low risk” (A) e “high risk source” (B) della batteriemia.



B)



8.3 Mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione-in rapporto alla terapia antibiotica definitiva ricevuta

Dei 98 pazienti oggetto dell'analisi finale, 27 (27.5%) sono deceduti prima che i risultati dei test di suscettibilità antibiotica fossero disponibili.

Di conseguenza, 71 pazienti hanno ricevuto una terapia antibiotica definitiva: 25 (35.2%) hanno ricevuto ADCT e 46 (64.8%) hanno ricevuto ADMT.

Come mostrato nella **Tabella 8.3**, l'analisi univariata ha rivelato che ADCT e ADMT sono associate ad un rischio di morte simile (HR 0.48; 0.17-1.32; $p=0.15$). Anche la regressione multivariata di Cox ha concluso che la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione non cambiava significativamente tra i due gruppi di pazienti (aHR 0.75; 0.26-2.22, $p=0.61$).

9 Discussione della tesi

I risultati chiave dello studio possono essere riassunti come segue:

- Il tasso di mortalità in pazienti con shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa* è notevolmente elevato;
- Rispetto alla monoterapia empirica adeguata, ricevere una terapia antibiotica empirica adeguata di combinazione, che includa almeno due antibiotici attivi *in vitro*, riduce significativamente la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione;
- La somministrazione di una terapia definitiva adeguata di combinazione o una monoterapia definitiva adeguata si associa ad outcome clinici simili; questo suggerisce che, una volta che la suscettibilità antibiotica del batterio è stata documentata, è sicuro passare ad un solo antibiotico attivo *in vitro*.

Per quanto di nostra conoscenza, questo è il primo studio che valuta l'effetto di una terapia di combinazione empirica adeguata in pazienti con shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, adoperando i criteri SEPSIS-3 [86]. Inoltre, l'approccio multicentrico dello studio potenzia la sua valenza esterna, rendendo i risultati più ampiamente applicabili.

Diversi studi riportano una prognosi infausta in pazienti con shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, con un tasso di mortalità stimato tra 46% e 56% [6, 7, 8]. Nello studio in oggetto, la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione è stata del 49% ed è indipendentemente associata a due fattori. Il primo ("high-risk source" dell'infezione) è correlato allo stato clinico del paziente al momento dell'infezione, e questo risultato è in linea con precedenti studi [79, 81, 89].

Il secondo fattore (l'unico che è potenzialmente modificabile) è l'adozione di una terapia antibiotica empirica adeguata di combinazione. In merito a questo aspetto, le attuali linee guida raccomandano la somministrazione di una terapia empirica di combinazione in pazienti con batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, al fine di aumentare la probabilità

di includere almeno un agente antimicrobico efficace *in vitro* [69, 70]. Tuttavia, i benefici, in termini di mortalità, di un effetto sinergico tra i due antibiotici combinati sono ancora materia di grande dibattito nella letteratura scientifica.

Le ricerche su questo tema hanno prodotto risultati frammentati, a causa dell'ampio range di infezioni da Gram-negativi incluse negli studi [78, 84, 90] e il massiccio numero di pazienti che hanno ricevuto una monoterapia con solo un aminoglicoside [91]. Molti studi [77, 80, 83, 88], che hanno incluso un numero limitato di pazienti con shock settico, concordano nell'affermare che la AECT non riduce il rischio di morte rispetto a AEMT. Tuttavia, lo studio in oggetto, che valuta nello specifico pazienti con shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, sembra indicare come la scelta tra AECT e AEMT possa invece impattare sull'outcome dei pazienti.

Questo risultato è in linea con precedenti studi di coorte retrospettivi, dove la terapia empirica di combinazione si è dimostrata influenzare positivamente la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione [6, 76, 82], soprattutto in un sottogruppo di pazienti con shock settico causato da *Pseudomonas aeruginosa* [81].

Diversi fattori possono spiegare le differenze tra i risultati dello studio in oggetto rispetto a quelli degli studi precedenti, per esempio discrepanze nei dati demografici dei pazienti, la diversa prevalenza di ceppi MDR [77, 79] e diversità nella definizione di shock settico. Inoltre, lo studio in questione ha seguito i "breakpoints" di suscettibilità recentemente raccomandati dall'EUCAST [88], che sono più stringenti rispetto a quelli applicati in precedenti studi [89]. Di conseguenza è possibile che alcuni pazienti, che oggi sarebbero classificati nel gruppo AEMT, possano essere stati categorizzati nel gruppo AECT in precedenti ricerche.

Dal punto di vista clinico potrebbe essere complesso tradurre le i risultati di questo studio nella pratica di tutti i giorni. Tuttavia, i risultati suggeriscono che, per ridurre la mortalità da shock settico dovuto a batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, è ragionevole somministrare una terapia di combinazione empirica, costituita da almeno due agenti

antimicrobici attivi *in vitro* contro il patogeno. La scelta di questa strategia terapeutica deve sempre tenere in considerazione il rischio del paziente, la storia di precedenti colonizzazioni, e l'epidemiologia locale. Nell'ambito del nostro ospedale, potrebbe essere ragionevole utilizzare nei pazienti gravi con shock settico da *Pseudomonas aeruginosa* una terapia empirica di combinazione che includa i nuovi antibiotici, come ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam e cefiderocol, in associazione con amminoglicosidi o fosfomicina [7, 92-94]. Tuttavia, prima di giungere a conclusioni definitive, sono necessarie ulteriori ricerche.

9.1 Limiti dello studio

Lo studio presentato ha alcune limitazioni:

- a causa del disegno retrospettivo dello studio, è possibile che fattori confondenti associati alle scelte terapeutiche e agli outcomes clinici, non siano stati inclusi nella analisi multivariata;
- la terapia antibiotica è stata prescritta dai medici che avevano il paziente in cura, per cui sono state incluse varie combinazioni empiriche che possono avere avuto un diverso impatto sulla mortalità;
- non è stata monitorata la comparsa di resistenze antibiotiche o di effetti avversi correlati alla terapia di combinazione, anche se lo studio non è stato disegnato a tale scopo;
- in base ai criteri di inclusione, sono stati inclusi nello studio solo i pazienti che hanno ricevuto una terapia antibiotica empirica adeguata entro le 24 ore dall'insorgenza della batteriemia.

Per questo motivo non si può escludere un "immortal time bias", anche se avrebbe comunque influenzato entrambi i gruppi di studio;

- infine, il campione dello studio è relativamente piccolo, per cui per alcuni confronti non si può escludere un errore di tipo II, che si verifica quando si fallisce nel rifiutare un'ipotesi nulla falsa. Studi più ampi potranno determinare più precisamente dettagli riguardo i benefici di una terapia di combinazione empirica adeguata.

9.2 Conclusioni

In conclusione, lo studio descritto sostiene l'ipotesi che una terapia di combinazione empirica adeguata possa diminuire la mortalità per ciascuna causa a 30 giorni dall'infezione in pazienti con shock settico causato da batteriemia da *Pseudomonas aeruginosa*, ma sottolinea anche la necessità urgente di uno studio prospettico randomizzato per confermarlo.

10 Bibliografía

- [1] Jian Chen, Haixin Huang, Chengjun Liu, et al.
Risk factors for mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in children. *Pediatr Neonatol*. 2023 Jul 18.
- [2] Yulin Zhang, Yi Li, Ji Zeng, Yanzi Chang et al.
Risk Factors for Mortality of Inpatients with *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia in China: Impact of Resistance Profile in the Mortality. *Infect Drug Resist*. 2020 Nov 12.
- [3] Frem JA, Doumat G, Kazma J, Gharamti A, et al.
Clinical predictors of mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* infection. *PLoS One*. 2023 Apr 28.
- [4] Royo-Cebrecos C, Laporte-Amargos J, Pena M, et al.
Pseudomonas aeruginosa Bloodstream Infections in Patients with Cancer: Differences between Patients with Hematological Malignancies and Solid Tumors. *Pathogens* 2022, Sep 30.
- [5] Montero MM, Lopez Montesinos I, Knobel H, et al.
Risk Factors for Mortality among Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Bloodstream Infections: What Is the Influence of XDR Phenotype on Outcomes? *J Clin Med* 2020 Feb 14.
- [6] Chamot E, Boffi El Amari E, Rohner P, et al.
Effectiveness of combination antimicrobial therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2003 Sep.
- [7] Bassetti M, Castaldo N, Cattelan A, et al.
Ceftolozane/tazobactam for the treatment of serious *Pseudomonas aeruginosa* infections: a multicentre nationwide clinical experience. *Int J Antimicrob Agents* 2019.
- [8] Rolo M, Martin-Higuera MC, Viedma E, et al.
Clinical impact of time-to-positivity of blood cultures on mortality in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *J Glob Antimicrob Resist* 2022.
- [9] Raúl Recio, Mikel Mancheño A, Esther Viedma B, et al.

- Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by *Pseudomonas aeruginosa* and Impact of Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020 Feb.
- [10] Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., et al.
Trattato di Microbiologia, Piccin Editore, (900–902), 1981.
- [11] Stratton, C.
Pseudomonas aeruginosa *Infection Control & Hospital Epidemiology*, (36-40), 1983.
- [12] Adams, B. G., Marrie, T. J.
Hand carriage of aerobic Gram-negative rods by health care personnel. *The Journal of hygiene*, (23–11), 1982.
- [13] J Walker, G Moore.
Pseudomonas aeruginosa in hospital water systems: biofilms, guidelines, and practicalities. *Review J Hosp Infect.* 2015 Apr.
- [14] O'Donnell JN, Bidell MR, Lodise TP.
Approach to the treatment of patients with serious multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Pharmacotherapy.* 2020 Sep.
- [15] João Botelho, Filipa Grosso, Luísa Peixe.
Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* - Mechanisms, epidemiology, and evolution. *Drug Resist Updat.* 2019 May.
- [16] J.M. Munita, C.A. Arias.
Mechanisms of antibiotic resistance *Microbiol Spectr*, 2016.
- [17] E.B. Breidenstein, C. de la Fuente-Nunez, R.E. Hancock.
Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance *Trends. Microbiol*, 2011.
- [18] Zheng Pang, Renee Raudonis, Bernard R Glick et al.
Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Review Biotechnol* 2019 Jan-Feb.
- [19] L. Fernandez, R.E. Hancock.
Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance *Clin Microbiol Rev*, 2012.
- [20] Jingjing Sun, Ziqing Deng, Aixin Yan.

Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations.

Biochem Biophys Res Commun. 2014 Oct 17.

- [21] G. Cabot, A.A. Ocampo-Sosa, F. Tubau, et al.
Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011.
- [22] P. Dupont, D. Hocquet, K. Jeannot, et al.
Bacteriostatic and bactericidal activities of eight fluoroquinolones against MexAB-OprM-overproducing clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Apr.
- [23] K. Okamoto, N. Gotoh, T. Nishino.
Extrusion of penem antibiotics by multicomponent efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002.
- [24] M. Askoura, W. Mottawea, T. Abujamel, et al.
Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J Med*, 2011.
- [25] Zheng Pang A, Renee Raudonis B, Bernard R.
Research review paper Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv*. 2019 Jan-Feb.
- [26] D.L. Paterson, R.A. Bonomo.
Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 2005.
- [27] D. Rawat, D. Nair.
Extended-spectrum beta-lactamases in Gram negative bacteria. *J Glob Infect Dis*, 2010.
- [28] M. Berrazeg, K. Jeannot, V.Y. Ntsogo Enguene, et al.

- Mutations in beta-Lactamase AmpC increase resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates to Antipseudomonal Cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015.
- [29] M.S. Ramirez, M.E. Tolmasky.
Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat*, 2010.
- [30] S. Sandoval-Motta, M. Aldana.
Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2016.
- [31] P.S. Stewart.
Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*, 2002.
- [32] M.C. Walters 3rd, F. Roe, A. Bugnicourt et al.
Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003.
- [33] N.Q. Balaban, K. Gerdes, K. Lewis, et al.
Problem of persistence: still more questions than answers? *Nat Rev Microbiol*, 2013.
- [34] T.K. Wood, S.J. Knabel, B.W. Kwan.
Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl Environ Microbiol*, 2013.
- [35] E. Maisonneuve, K. Gerdes.
Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annu Rev Microbiol*. 2012.
- [36] P. Magiorakos a, A. Srinivasan b, R.B. Carey b.
Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar.
- [37] Pena C, Cabot G, Gomez-Zorrilla S, et al.
Influence of virulence genotype and resistance profile in the mortality of *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections. *Clin Infect Dis Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI)*, 2015.

- [38] Del Barrio-Tofiño E, Zamorano L, Cortes-Lara S, et al.
Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J Antimicrob Chemother* 2019 Jul.
- [39] Souli M, Galani I, Giamarellou H.
Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*, 2008 Nov 20.
- [40] Viedma E, Juan C, Acosta J, et al.
Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum beta-lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009 Nov.
- [41] Paterson DL, Rice LB.
Empirical antibiotic choice for the seriously ill patient: are minimization of selection of resistant organisms and maximization of individual outcome mutually exclusive? *Clin Infect Dis*, 2003 Apr 15.
- [42] Guillamet CV, Vazquez R, Noe J, et al.
A cohort study of bacteremic pneumonia: The importance of antibiotic resistance and appropriate initial therapy? *Medicine (Baltimore)*, 2016 Aug.
- [43] Kang C, Kim S, Kim H, et al.
Pseudomonas aeruginosa bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clin Infect Dis*, 2003 Sep 15.
- [44] Park S-Y, Park HJ, Moon SM, et al.
Impact of adequate empirical combination therapy on mortality from bacteremic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *BMC Infect Dis*, 2012 Nov 16.
- [45] Lima L.M., da Silva B.N.M., Barbosa G., et al.
 β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur. J. Med. Chem*, 2020 Dec 15.
- [46] Tamma P., Aitken S., Bonomo R.

- IDSA Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections: Version 2.0. IDSA; Arlington, VA, USA: 2022.
- [47] Tamma P., Aitken S., Bonomo R., et al.
 IDSA Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections: Version 1.0. IDSA; Arlington, VA, USA: 2022. A Focus on extended-spectrum β -lactamase producing *enterobacterales* (ESBL-E), carbapenem-resistant *enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with difficult-to-treat resistance (DTRP. *aeruginosa*).
- [48] Cristina Lasarte-Monterrubio, Pablo Arturo Fraile-Ribot, Juan Carlos Vázquez-Ucha et al.
 Activity of cefiderocol, imipenem/relebactam, cefepime/taniborbactam and cefepime/zidebactam against ceftolozane/tazobactam- and ceftazidime/avibactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, 2022 Sep.
- [49] Ezelarab H.A., Abbas S.H., Hassan H.A, et al.
 Recent updates of fluoroquinolones as antibacterial agents. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2018 Sep.
- [50] Steyger P.S.
 Mechanisms of aminoglycoside-and cisplatin-induced ototoxicity. *Am J Audiol*, 2021 Oct 11.
- [51] Tony Velkov, Kade D Roberts, Roger L Nation, et al.
 Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics, in *Future Microbiology*. Vol. 8, n.6 (711–724), 2013 June.
- [52] Abed Zahedi Bialvaei, Hossein Samadi Kafil.
 Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin*, 2015 Apr.
- [53] Lynn L Silver.
 Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold. Spring Harb Perspect Med*, 2017 Feb 1.
- [54] Dan Reynolds and Marin Kollef.

The Epidemiology and Pathogenesis and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Infections: An Update. *Drugs*, 2021 Dec.

- [55] Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, et al.
Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. *N Engl J Med*. 2014 Mar 27.
- [56] Micek ST, Kollef MH, Torres A, et al.
Pseudomonas aeruginosa nosocomial pneumonia: impact of pneumonia classification. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2015 Oct.
- [57] Fujitani S, Sun HY, Yu VL, et al.
Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest*. 2011 Apr.
- [58] Chatzinikolaou I, Abi-Said D, Bodey GP et al.
Recent experience with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia in patients with cancer: retrospective analysis of 245 episodes. *Arch Intern Med*, 2000 Feb.
- [59] Hilf M, Yu VL, Sharp J et al.
Antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: outcome correlations in a prospective study of 200 patients. *Am J Med*, 1989 Nov.
- [60] Stéphane Pont, Manon Janet-Maitre, Eric Faudry et al.
Molecular Mechanisms Involved in *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia. *Adv Exp Med Biol*, 2022.
- [61] Lillehoj EP, Kim BT, Kim KC.
Identification of *Pseudomonas aeruginosa* flagellin as an adhesin for Muc1 mucin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (751–756), 2002.
- [62] Hauser AR.
The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol*, (654–665), 2009.
- [63] Golovkine G, Reboud E, Huber P.
Pseudomonas aeruginosa takes a multi-target approach to achieve junction breach. *Infect Microbiol*, 2018 Mar.
- [64] Vareechon C, Zmina SE, Karmakar M, et al.

Pseudomonas aeruginosa effector ExoS inhibits ROS production in human neutrophils. *Cell Host Microbe*, 2017 May.

- [65] Leduc D, Beaufort N, de Bentzmann S, et al.
The *Pseudomonas aeruginosa* LasB metalloproteinase regulates the human urokinase-type plasminogen activator receptor through domain-specific endoproteolysis. *Infect Immun*, 2007 Aug.
- [66] Schiller NL, Joiner KA.
Interaction of complement with serum-sensitive and serum-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 1986 Dec.
- [67] Mishra M, Ressler A, Schlesinger LS, et al.
Identification of OprF as a complement component C3 binding acceptor molecule on the surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*, 2015 Aug.
- [68] Hallström T, Mörgelin M, Barthel D, et al
Dihydrolipoamide dehydrogenase of *Pseudomonas aeruginosa* is a surface-exposed immune evasion protein that binds three members of the factor H family and plasminogen. *J Immunol*, 2012 Nov 15.
- [69] Mensa J, Barberan J, Soriano A, et al.
Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by *Pseudomonas aeruginosa*: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy. *Rev Esp Quimioter*, 2018 Feb.
- [70] Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, et al.
Infectious Diseases Society of America 2022 Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum beta-lactamase Producing *Enterobacterales* (ESBL-E), Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* (CRE), and *Pseudomonas aeruginosa* with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-*P. aeruginosa*). *Clin Infect Dis*, 2022 Aug 25.
- [71] Bassetti M, Vena A, Russo A, et al.
Rational approach in the management of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Curr Opin Infect Dis*, 2018 Dec.
- [72] Bassetti M, Vena A, Croxatto A, et al.

How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs Context*, 2018 May.

- [73] Albasanz-Puig A, Gudiol C, Puerta-Alcalde P, et al.
Impact of the Inclusion of an Aminoglycoside to the Initial Empirical Antibiotic Therapy for Gram-Negative Bloodstream Infections in Hematological Neutropenic Patients: a Propensity- Matched Cohort Study (AMINOLACTAM Study). *Antimicrob Agents Chemother*, 2021 Jul 16.
- [74] Holmes AH, Moore LS, Sundsfjord A, et al.
Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*, 2016 Jan 9.
- [75] Mouton JW.
Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. *Infection*, 1999.
- [76] Park SY, Park HJ, Moon SM, et al.
Impact of adequate empirical combination therapy on mortality from bacteremic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *BMC Infect Dis*, 2012 Nov 16.
- [77] Bowers DR, Liew YX, Lye DC, et al.
Outcomes of appropriate empiric combination versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Dec 21.
- [78] Sjovall F, Perner A, Hylander Moller M.
Empirical mono- versus combination antibiotic therapy in adult intensive care patients with severe sepsis - A systematic review with meta-analysis and trial sequential analysis. *J Infect*, 2017 Apr.
- [79] Pena C, Suarez C, Ocampo-Sosa A, et al.
Effect of adequate single-drug vs combination antimicrobial therapy on mortality in *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infections: a post Hoc analysis of a prospective cohort. *Clin Infect Dis*, 2013 Jul.

- [80] Hu Y, Li L, Li W, et al.
Combination antibiotic therapy versus monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a meta-analysis of retrospective and prospective studies. *Int J Antimicrob Agents*, 2013 Dec.
- [81] Ripa M, Rodriguez-Nunez O, Cardozo C, et al.
Influence of empirical double-active combination antimicrobial therapy compared with active monotherapy on mortality in patients with septic shock: a propensity score-adjusted and matched analysis. *J Antimicrob Chemother*, 2018 Jun 1.
- [82] Albasanz-Puig A, Dura-Miralles X, Laporte-Amargos, et al.
Effect of Combination Antibiotic Empirical Therapy on Mortality in Neutropenic Cancer Patients with *Pseudomonas aeruginosa* Pneumonia. *Microorganisms*, 2022 Mar 29.
- [83] Vardakas KZ, Tansarli GS, Bliziotis IA, et al.
Beta-Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus beta-lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: a meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*, 2013 Apr.
- [84] Kumar A, Safdar N, Kethireddy S, et al.
A survival benefit of combination antibiotic therapy for serious infections associated with sepsis and septic shock is contingent only on the risk of death: a meta-analytic/meta-regression study. *Crit Care Med*, 2010 Aug.
- [85] Charlson ME, Pompei P, Ales KL, et al.
A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*, 1987.
- [86] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al.
The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 2016.
- [87] Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al.
CDC definitions for nosocomial infections. *Am J Infect Control* 1988.

- [88] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 13.1. 2023.
- [89] Paulsson M, Granrot A, Ahl J, et al. Antimicrobial combination treatment including ciprofloxacin decreased the mortality rate of *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: a retrospective cohort study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017 Jul.
- [90] Diaz-Martin A, Martinez-Gonzalez ML, Ferrer R, et al. Antibiotic prescription patterns in the empiric therapy of severe sepsis: combination of antimicrobials with different mechanisms of action reduces mortality. *Crit Care*, 2012 Nov 18.
- [91] Paul M, Leibovici L. Combination antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia. *Lancet Infect Dis*, 2005 Apr.
- [92] Bassetti M, Magne F, Giacobbe DR, et al. New antibiotics for Gram-negative pneumonia. *Eur Respir Rev*, 2022 Dec 21.
- [93] Vena A, Giacobbe DR, Castaldo N, et al. Clinical Experience with Ceftazidime-Avibactam for the Treatment of Infections due to Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria Other than Carbapenem-Resistant *Enterobacterales*. *Antibiotics (Basel)*, 2020 Feb 9.
- [94] Malisova L, Vrbova I, Pomorska K, et al. In Vitro Activity of Cefiderocol Against Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist*, 2023 Aug 22.