

Direct antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria from positive blood cultures

Andrea Zappavigna, Enrica Cavatorta, Rossana Chiarabini, Roberta Schiavo, Daniela Padrini, Camilla Reboli, Massimo Confalonieri

U.O.C Microbiologia, Dipartimento di Patologia Clinica, Ospedale "Guglielmo da Saliceto", Piacenza, Italy

Key words: Bacterial sensitivity test, Bacteraemia, Gram-negative bacteria, Blood culture.

Antibiogramma diretto per batteri Gram-negativi da emocolture positive

SUMMARY

Every year, a great number of people die for bloodstream infections, especially by too late or inappropriate pharmacological treatment. The principal laboratory test for this type of infections is the blood culture; its limit is a turnaround time of about 96 hours. The aim of this work was to compare direct susceptibility testing with the automated VITEK 2 system. Fifty blood cultures, positive for Gram-negative bacteria, were processed for amikacin, ciprofloxacin, ceftazidime, piperacillin-tazobactam, cefotaxime, meropenem and colistin with VITEK 2 and direct susceptibility testing by Kirby-Bauer or E-test methods. We found 93.7% correlation with 5.0% minor errors, 0.5% very major errors and 0.8% major errors. Piperacillin-tazobactam has shown the lowest percentage of correlation (79%) and the highest percentage of errors (21%). To conclude, direct susceptibility testing of positive blood cultures has shown promising results, rendering this method useful for giving to clinicians preliminary informations for therapy.

INTRODUZIONE

Ogni anno, nel mondo, una persona su quattro muore per le complicanze delle infezioni del torrente circolatorio, incidenza simile ai decessi per politraumi o per infarto (6). Alcuni studi hanno dimostrato che il trattamento farmacologico tardivo ed inadeguato delle sepsi si traduce nell'aumento della durata dell'ospedalizzazione e della mortalità (3).

L'emocoltura rappresenta un *test* cardine in caso di sepsi, ma soffre il limite di un *turnaround time* (T.A.T.) medio di 96 ore che rende il referto finale poco fruibile dal punto di vista clinico.

L'emergenza e la diffusione di batteri multi-resistenti impone lo sviluppo di metodiche semplici ed economiche che consentano di fornire al clinico informazioni utili in tempi rapidi. È stato osservato in alcuni lavori come la comunicazione orale o scritta di dati preliminari relativi a identificazione e/o antibiogramma consenta, attraverso l'aggiustamento della terapia empirica iniziale, di migliorare l'*outcome* clinico del paziente e di ridurre i tempi di ospedalizzazione (1).

Nella nostra realtà, la crescente incidenza dell'isolamento di enterobatteri, spesso con profili di multi-resistenza, ci ha indotto a sperimentare una metodica che consentisse di disporre più rapidamente di informazioni relative alla sensibilità agli antibiotici. Il presente studio, ha voluto nel contempo valutare la concordanza, nei Gram-negati-

vi, tra la modalità di saggio in agar-diffusione direttamente dal flacone positivo e quella tradizionale eseguita con sistema automatico VITEK 2.

MATERIALI E METODI

Nel periodo aprile – ottobre 2012, 50 emocolture risultate positive all'esame batterioscopico per presenza di bastoncini Gram-negativi, sono state processate in maniera tradizionale mediante subcoltura in piastra, identificazione e antibiogramma eseguite con analizzatore automatico VITEK 2 (card AST-N201, Software Version 05.04 del 14/06/2012, bioMérieux).

Parallelamente quattro gocce di brodocoltura del flacone positivo sono state inoculate direttamente e poi strisciate con un tampone per confluenza su due piastre di Mueller-Hinton Agar (Oxoid); su una piastra sono stati depositi i dischetti contenenti gli antibiotici da saggiare secondo il metodo Kirby Bauer: Amikacina (AK), Ciprofloxacina (CIP), Ceftazidime (CAZ), Piperacillina/Tazobactam (TZP), Meropenem (MEM); sull'altra sono stati allestiti il saggio di Colistina (CT) con E-test (bioMérieux) e il *test* fenotipico per la rilevazione della produzione di ESBL (Cefotaxime e Cefotaxime/Acido Clavulanico, Bekton Dickinson). Le piastre sono state incubate a 36°C *overnight*.

Il giorno dopo si è proceduto alla misura degli aloni di inibizione della crescita ed alla lettura della MIC di colistina. Si è poi provveduto, per

Corresponding author: Andrea Zappavigna

U.O.C Microbiologia, Dipartimento di Patologia generale, Ospedale "Guglielmo da Saliceto"

Viale Taverna 49 - 29121 Piacenza, Italy - Tel.: (+39) 0523 302488

E-mail: andrezappa81@gmail.com

ogni antibiotico saggiato, all'assegnazione della relativa categoria interpretativa secondo EUCAST 2012 (14) e all'interpretazione del *test* fenotipico per ESBL, rilevando la presenza di una differenza >5mm tra Cefotaxime (CTX) e Cefotaxime/Acido Clavulanico (CTX-CLA) nei casi di ceppi ESBL produttori.

Come ceppi di controllo sono stati utilizzati il ceppo di *E. coli* ATCC 2992 e ceppi isolati da campioni clinici interni al laboratorio.

Le categorie interpretative ottenute con l'antibiogramma preliminare sono state poi confrontate con quelle ottenute col metodo tradizionale per valutarne la percentuale di concordanza sia complessiva sia per ogni singolo antibiotico saggiato.

RISULTATI

La concordanza di categoria risultata dal confronto tra i 50 antibiogrammi eseguiti con i due metodi è stata del 93.7%.

Del 6.3% discordante, il 5.0% è rappresentato da *minor errors*, ovvero da scostamenti di una sola categoria interpretativa (Sensibile – Intermedio, Intermedio – Sensibile, Intermedio – Resistente, Resistente - Intermedio), mentre lo 0.5% da *very major errors*, ovvero da false sensibilità con discordanza nell'ambito di due categorie, di tipo Sensibile-Resistente e lo 0.8% da *major errors*, ovvero da false resistenze con una discordanza di tipo Resistente-Sensibile.

L'analisi comparativa sui singoli antibiotici saggiati, (Tabella 1) ha evidenziato nel complesso, una buona concordanza con percentuali comprese tra il 92% (Ceftazidime) ed il 100% (Cefotaxime). In particolare è possibile osservare che, mentre per alcuni antibiotici come Ciprofloxacina, Cefotaxime, Meropenem e Colistina, la percentuale di concordanza si attesta oltre il 95% con percentuali di errore inferiori al 5%, rappresentate esclusivamente da *minor errors*, per altri antibiotici come Amikacina e Ceftazidime la percentuale di concordanza è comunque superiore al 90% con percentuali di errore sotto al 10% (costituiti totalmente da *minor errors*).

Solo l'associazione Piperacillina/Tazobactam ha mostrato una percentuale di concordanza più bassa (79%) dovuta nel 15% a *minor errors*, nel 4% a *very major errors* e nel 2% a *major errors* con una percentuale di errore totale del 21%.

La percentuale di concordanza per quest'associazione e di conseguenza quelle di errore sono decisamente al di fuori dei valori di accettabilità riportati in letteratura (8) (percentuale totale di errore <=10%, <= 1.5% per i *major errors* e <= 3% per i *very major errors*). Il *test* fenotipico è invece risultato concordante in 8 dei 9 ceppi ESBL produttori.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I dati ottenuti nel presente studio hanno mostrato nel complesso una buona concordanza tra la metodica diretta e quella *standard*. Dagli anni '70 si è cercato di mettere a punto metodiche che, da un lato abbreviassero il tempo di esecuzione degli antibiogrammi e dall'altro fossero affidabili quanto le metodiche classiche. Questi studi hanno mostrato sempre una concordanza compresa tra il 94 e il 97%. In particolare Johnson, et al. hanno trovato una percentuale di errore pari al 2.4% per i *minor errors* e all'1% per i *major errors* (9). Doern, et al. (7) invece hanno trovato una percentuale di errore pari all'1.6% per i *minor errors*, all'1.5% per i *major errors* e allo 0.1% per i *very major errors* (7). Confrontando i nostri dati con quelli della letteratura si deduce che, non considerando l'associazione Piperacillina – Tazobactam che ha una percentuale di concordanza inaccettabile, da indagare con metodiche ulteriori, le medie delle percentuali di errore ottenute sono di poco più alte ma comunque nel *range* di affidabilità. Questa differenza può essere causata dalla soggettività interpretativa dei diametri "borderline" nella fase di lettura, o dalla mancata standardizzazione della procedura di allestimento delle prove (centrifugazione e sospensione di 0.5 MF) che si riscontrano invece nei dati di letteratura.

D'altro canto la media delle percentuali di concordanza tra i singoli antibiotici ottenuta da noi, sempre escludendo la Piperacillina – Tazobactam, è perfettamente in linea con i dati della letteratura. Nonostante i limiti citati, lo studio ha dimostrato che la metodica adottata per l'esecuzione dell'antibiogramma preliminare sia affidabile e che, in virtù anche dei costi contenuti e della facilità di esecuzione, possa essere utilizzata per anticipare di 24 ore il referto definitivo.

Si ritiene che l'esecuzione dell'antibiogramma diretto, al pari dell'esame batterioscopico, dovrebbe entrare a far parte del percorso diagno-

Tabella 1. Percentuali di concordanza e di errore per antibiotico

	AK	CIP	TZP	CTX	CAZ	MEM	CT	TOT
Concordanti	92	98	79	100	92	98	96	93.7
Minor errors	8	2	15	0	8	2	0	5.0
Very major errors	0	0	4	0	0	0	0	0.5
Major errors	0	0	2	0	0	0	4	0.8

stico routinario delle batteriemie almeno nei casi clinici segnalati come critici.

BIBLIOGRAFIA

1. Beekman, et al. Effects of rapid detection on bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3119-25.
2. Behera B, Mathur P, Gupta B. Blood culture Gram stain, acridine orange stain and direct sensitivity-based antimicrobial therapy of bloodstream infection in patients with trauma. *Indian J Med Microbiol* 2010; 28: 138-42.
3. Bouza, et al. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. *Clin Infect Dis.* 2004; 39: 1161-9.
4. Casella P, et al. Utilizzo di E-test nell'antibiogramma diretto da emocoltura su bacilli Gram negativi a crescita rapida e *Staphylococcus* spp. *Mic Med.* 2004; 19: 34-6.
5. De Cueto M, et al. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the VITEK 2 System. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 3734-8.
6. Dellinger JP, et al. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008; 36: 296-327.
7. Doern GV, Scott DR, Rashad AL, Kim KS. Evaluation of direct blood culture disc diffusion antimicrobial susceptibility test. *Antimicrob Agents Chem.* 1981; 20: 696-8.
8. Ferraro MJ, Jorgesen JH. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. *Manual of clin microb.* 1999; 1593-600.
9. Johnson JE, Washington JA. Comparison of direct and standardized antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures. *Antimicrob Agents Chem.* 1976; 10: 211-4.
10. Ling KW, et al. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of Gram-negative bacillifrom positive blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4705-7.
11. Proposta di percorso diagnostico per infezioni del torrente circolatorio. XXXVII Congresso Nazionale AMCLI, Stresa, 5-8 ottobre 2008.
12. Soloaga, et al. Blood cultures: usefulness of presumptive antibiograms. *Rev Argen de Microb.* 2000; 32: 149-52.
13. Stanley M. Comparison of direct and standard antimicrobial disc susceptibility method. *J Clin Microbiol* 1979; 4: 482-7.
14. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 2.0, 2012. <http://www.eucast.org>.