

Validity of direct identification and antibiotic susceptibility of microorganisms from bottles of blood culture

Carmela Mazzone, Maria Luisa Laterza, Lucio Tauro

Laboratorio Analisi Cliniche e Microbiologiche

Ente Ecclesiastico Ospedale Miulli, Acquaviva delle fonti (Bari)

Key Words: blood cultures, survey direct, turnaround time

Validità dell'identificazione e antibiogramma diretti dei microrganismi dai flaconi di emocoltura

SUMMARY

The blood culture is a very important laboratory test: if bacteremia or sepsis are suspected, the diagnosis of the pathogen and antibiotic therapy may be achieved making use of it. Identification and antibiotic susceptibility test carried out directly from the bottle may give important information in a shorter time.

The introduction of the automatic instrumentation has improved the discovering of pathogens in the blood, however the elapsing time between the positive detection and the microbiological report is still along. The aim of our work was to verify the validity of the direct use of blood culture broth in which growth of microorganisms has been detected, which could reduce the response time of the bacteremia diagnosis.

During the period February - July 2009, a total of 150 blood cultures were analysed: we compared the results obtained both by direct method and by reference method. 20 Gram positive microorganisms and 13 Gram negative microorganisms were respectively isolated and identified. The identification of Gram-negative and Gram-positive microorganisms showed an agreement of 100% between the direct and the reference method. For antibiotic susceptibility tests, among the Gram positive has reported 1.3% very major error, 2.9% major error and 1.4% minor error, while the Gram negative, respectively 0.3%, 1.4%, 0%.

The use of direct identification and susceptibility testing from positive blood cultures, can improve the response time and better efficiency in diagnostic procedures.

INTRODUZIONE

L'emocoltura è un esame di laboratorio fondamentale, quando si sospetti la presenza di una batteriemia o di una sepsi, per la diagnosi dell'agente patogeno e per impostare una terapia antibiotica efficace. La rapida identificazione e l'antibiogramma dei germi presenti nel torrente circolatorio facilita molto il recupero della salute da parte dei pazienti: soggetti debilitati o immunologicamente compromessi per neoplasie o altre gravi malattie sistemiche ricevono un grande aiuto da terapie tempestive e mirate (5, 6, 10).

È noto tuttavia che l'indagine emocolturale presenta alcuni limiti (8): 1) il tempo intercorrente tra il prelievo e l'emissione dei referti è spesso eccessivo rispetto alla gravità delle condizioni cliniche; 2) nessun mezzo di coltura è valido per tutti i potenziali microrganismi patogeni e alcuni richiedono un'incubazione particolarmente prolungata; 3) i falsi negativi sono piuttosto frequenti nei pazienti sottoposti in precedenza a terapia antibiotica; 4) una singola emocoltura positiva non è sempre segno certo d'infezione (3).

Il progresso tecnologico in questi anni ha permesso la commercializzazione di apparecchi automatici per il rilevamento continuo 24 ore su 24, della crescita batterica nei flaconi inoculati: ne è risultata una notevole riduzione del tempo necessario ad individuare i flaconi positivi, dai quali si procede a subcolture su terreni solidi, su cui, in genere entro 24 ore, si sviluppano le colonie da utilizzare per l'identificazione e l'antibiogramma (1, 7).

Obiettivo del nostro lavoro è stato studiare la validità dell'utilizzo diretto del brodo d'emocoltura (in cui sia stata rilevata crescita di microrganismi) per l'identificazione e l'antibiogramma, prescindendo dalla pratica delle subcolture su terreno solido con conseguente riduzione (24 ore) dei tempi di attesa dei risultati.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato nel periodo compreso tra febbraio e luglio 2009 presso il Laboratorio di Analisi Cliniche e Microbiologiche dell'Ente Ecclesiastico Ospedale Miulli di Acquaviva delle fonti su emocolture provenienti da pazienti ricoverati nei vari reparti.

Il sangue venoso è stato prelevato in coincidenza dei picchi febbrili, con appositi flaconi d'emocoltura (BacT-ALERT FA

aerobic e BacT-ALERT FN anaerobic) successivamente collocati a incubare a 37°C, nell'apparecchio BacT-ALERT 3D (bioMérieux): l'eventuale comparsa di CO₂ (prodotta dai microrganismi) all'interno di ciascun flacone viene rilevata dall'apparecchio che segnala una positività. Successivamente la procedura convenzionale prevede la semina del brodo contenuto in ciascun flacone resosi positivo, su terreni solidi idonei, sui quali dopo non meno di 24 ore, ottenute le colonie, è possibile procedere all'identificazione e antibiogramma.

Abbiamo comunque proceduto tanto nel modo suesposto, quanto avviando in parallelo, dal momento della positivizzazione di ciascun flacone anche la seguente procedura: 1) allestimento di un vetrino dal mezzo di coltura, colorazione con il metodo di Gram e successiva comunicazione ai medici di reparto delle qualità tintoriali dei germi individuati; 2) dispensazione di 20 microlitri del brodo d'emocoltura nel medium (Prompt Inoculation System D) successivamente inoculato in tutti i pozzetti degli appositi pannelli in uso con l'apparecchio automatico per identificazione e antibiogramma presente nel nostro laboratorio (Microscan Walk away 40 SI); 3) invio dei risultati ottenuti dopo 24 ore ai reparti con l'esplicita precisazione che i dati ufficiali e definitivi (ottenuti dalla procedura convenzionale) vengono comunque ottenuti mediante il medesimo apparecchio Microscan Walkaway e inviati il giorno successivo. L'identificazione dei germi, quando necessario, è stata confermata con alcuni test quali la "citocromo-ossidasi" e la "coagulasi".

I controlli di qualità delle metodiche per stabilire la sensibilità o resistenza dei microrganismi agli antibiotici sono stati effettuati utilizzando ceppi di controllo e confrontando i risultati ottenuti dal Microscan Walkaway con i dati di riferimento del CLSI (2).

RISULTATI

Sono state analizzate 150 emocolture delle quali 33 (22%) sono risultate positive (20 isolamenti di germi Gram positivi e 13 di Gram negativi): le identificazioni eseguite direttamente dal brodo d'emocoltura sono risultate sempre sovrapponibili a quelle ottenute seguendo la procedura convenzionale che utilizza le colonie sviluppatesi su terreni solidi.

La tabella 1 elenca i microrganismi isolati.

Corresponding author: Carmela Mazzone

Via Salvatore del re n.14 - 74017 Mottola (TA) - Tel.: 349-6932742

E-mail: carmela.mazzone@yahoo.it

Tabella 1. Identificazione dei microrganismi isolati

Microrganismo	n° ceppi	% sul totale degli isolati
<i>S. haemolyticus</i>	8	24
<i>S. hominis</i>	4	12
<i>S. aureus</i>	2	6
<i>S. capitis</i>	1	3
<i>S. epidermidis</i>	1	3
<i>S. saprophyticus</i>	1	3
<i>E. coli</i>	9	27
<i>E. faecalis</i>	2	6
<i>E. faecium</i>	1	3
<i>P. aeruginosa</i>	1	3
<i>S. maltophilia</i>	1	3
<i>K. pneumoniae</i>	1	3
<i>K. oxytoca</i>	1	3

La tabella 2 mostra i risultati del confronto dei test di sensibilità agli antibiotici ottenuti con metodo diretto e metodo standard (coltura in piastra) nei diversi ceppi batterici isolati. Ci siamo serviti a tal fine delle definizioni adottate da vari Autori (4):

- *very major error* (falso sensibile): ceppi risultati sensibili con il metodo diretto ma resistenti con il metodo che utilizza le colonie delle colture in piastra;

- *major error* (falso resistente): ceppi che si comportano in modo opposto ai precedenti: resistenti col metodo diretto e sensibili con le colture in piastra;

- *minor error*: ceppi sensibili o resistenti col metodo diretto e intermedi con le colture in piastra o viceversa.

I risultati sono espressi in percentuale di errore rispetto al totale di combinazioni di antibiotici testati per ogni ceppo batterico.

Dei 33 ceppi isolati, 7 (21.2%) hanno mostrato una completa concordanza di risultati per tutte le combinazioni antibiotico/microrganismo testate: non si sono mai verificati “*very major error*”, “*major error*” e “*minor error*”.

Il confronto tra i risultati ottenuti dai test di sensibilità agli antibiotici eseguiti mediante l'inoculo diretto dal brodo d'emocoltura con i risultati dell'antibiogramma ottenuto utilizzando le colonie sviluppatesi su terreno solido, sono rappresentati nelle tabelle 3 e 4. I risultati sono espressi come percentuale di errore sul totale di combinazioni antibiotici-

Tabella 2. Sensibilità agli antibiotici per specie isolata: confronto tra metodo diretto e ceppi da coltura su terreno solido

Microrganismi	N° ceppi testati	% very major errors	% major errors	% minor errors
Gram negativi				
<i>E. coli</i>	9	0	2.0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	0	0
<i>S. maltophilia</i>	1	3.7	0	0
<i>K. pneumoniae</i>	1	0	0	0
<i>K. oxytoca</i>	1	0	0	0
Totale	13	0.3	1.4	0
Gram positivi				
<i>S. haemolyticus</i>	8	1.8	0.4	1.8
<i>S. hominis</i>	4	0	4.6	0.9
<i>S. aureus</i>	2	0	0	0
<i>S. capitis</i>	1	0	0	0
<i>S. epidermidis</i>	1	0	0	0
<i>S. saprophyticus</i>	1	11.1	0	3.7
<i>E. faecalis</i>	2	0	0	0
<i>E. faecium</i>	1	0	7.4	7.4
Totale	20	1.3	2.9	1.4

Tabella 3. Batterii Gram negativi. Sensibilità agli antibiotici: due metodi a confronto. (- non testato).

Antibiotico	N° ceppi testati	N° very major errors	N° major errors	N° minor errors
Amikacina	13	1	0	0
Amoxicillina/Ac.Clav.	11	0	0	0
Amoxicillina	13	0	0	0
Ampicillina	13	0	0	0
Aztreonam	12	0	2	0
Cefazolina	12	0	0	0
Cefepime	13	0	0	0
Cefotaxime	13	0	0	0
Cefotetan	12	0	0	0
Cefoxitina	12	0	0	0
Ceftazidime	13	0	0	0
Ceftriaxone	13	0	0	0
Cefuroxime	13	0	0	0
Ciprofloxacina	11	0	0	0
Ertapenem	12	0	1	0
Gatifloxacina	10	0	0	0
Gentamicina	12	0	0	0
Imipenem	13	0	0	0
Levofloxacina	13	0	1	0
Meropenem	12	0	1	0
Netilmicina	13	0	0	0
Nitrofurantoina	-	-	-	-
Ofloxacina	13	0	0	0
Piperacillina/Tazobac.	12	0	0	0
Piperacillina	13	0	0	0
Tetraciclina	11	0	0	0
Tobramicina	13	0	0	0
Trimetoprim/Sulfa.	13	0	0	0
Totale (%)	334	1 (0,3)	5 (1,4)	0 (0)

co/microorganismo testate per classe di chemioterapico. Per quanto riguarda i Gram negativi, sono stati testati 13 ceppi e 334 combinazioni antibiotico/microorganismo; la percentuale di "very major error", "major error" e "minor error" è stata rispettivamente 0.3%, 1.4%, 0%.

Per i 20 Gram positivi isolati, sono state testate 462 combinazioni antibiotico/microorganismo. La percentuale di "very major error", "major error" e "minor error" è stata rispettivamente di 1.3%, 2.9%, 1.4%. La produzione di β -lattamasi in *Staphylococcus* spp., così come la produzione di β -lattamasi ad ampio spettro in microrganismi Gram negativi, è stata correttamente rilevata dalla strumentazione automatica in tutti i campioni esaminati.

CONCLUSIONI

L'esigenza di ottenere indicazioni terapeutiche attendibili e tempestive per il trattamento antibiotico dei pazienti settici è imperativa: è noto che il successo terapeutico nei pazienti più critici è assai più probabile quanto prima si imposti una terapia antibiotica mirata: in tal senso si è orientato il nostro lavoro.

I risultati ottenuti mediante il metodo "rapido" sono sempre stati successivamente seguiti da identificazioni e antibiogrammi eseguiti secondo metodiche convenzionali.

Le identificazioni dei germi da noi ottenute con le due metodiche sono risultate sempre sovrapponibili. Gli antibiotici testati sia per i Gram positivi che per i Gram negativi, hanno mostrato una percentuale di very major errors molto bassa, rispettivamente di 1.3% e 0.3%, analogamente a quanto riportato in letteratura (4, 10).

Tali risultati ci consentono di considerare accettabile l'utilizzo del metodo rapido per l'identificazione e l'antibiogramma, dal momento che gli antibiotici con risultati divergenti tra le due metodiche sono stati in numero significativamente inferiore rispetto a quelli con risultati concordanti. La notevole riduzione dei tempi di risposta riteniamo costituisca un vantaggio che giustifica l'utilizzo della metodica "rapida" con l'invio al medico di reparto di un referto preliminare riportante l'esito dell'esame microscopico, l'identificazione e l'antibiogramma, fermo restando l'opportunità di far riferimento ai risultati ufficiali successivamente emessi.

Tabella 4. Batteri Gram positivi. Sensibilità agli antibiotici: due metodi a confronto. (N/R= non refertato) (- non testato).

Antibiotico	N° ceppi testati	N° very major errors	N° major errors	N° minor errors
Acido fusidico	18	0	0	0
Amoxicillina/Ac. Clav.	18	0	0	0
Ampicillina	19	0	0	0
Cefalotina	20	0	0	0
Cefuroxime	20	0	0	0
Ciprofloxacina	20	0	0	0
Claritromicina	20	0	1	2
Clindamicina	20	2	3	1
Cloramfenicolo	20	0	1	0
Eritromicina	19	0	1	0
Fosfomicina	N/R	-	-	-
Gatifloxacina	14	0	0	0
Gentamicina	20	0	0	0
Levofloxacina	18	0	2	0
Linezolid	20	0	0	0
Netilmicina	18	2	0	2
Nitrofurantoina	-	-	-	-
Norfloxacina	-	-	-	-
Ofloxacina	20	0	0	0
Oxacillina	20	0	0	0
Penicillina	20	0	0	0
Rifampicina	20	2	1	2
Synercid	20	0	2	0
Teicoplanina	19	0	0	0
Tetraciclina	20	0	2	0
Trimetoprim/Sulfam.	19	0	0	0
Vancomicina	20	0	0	0
Totale (%)	462	6 (1,3)	13 (2,9)	7 (1,4)

BIBLIOGRAFIA

- Bellini C, Petignat C, Francioli P, et al. Comparison of automated strategies for surveillance of nosocomial bacteria. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 1030-5.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement. Document M100-S16. CLSI, Villanova, PA, 2006.
- Flayhart D, Borek A, Wakefield T, et al. Comparison of Bactec Plus Blood Culture Media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 816-21.
- Frugoni S, Viola G, Conte E, et al. Evaluation of a direct method for the identification and antibiotic susceptibility assessment of microorganisms isolated from blood cultures by automatic systems. *AMCLI* 2008; 23(1): 22-28.
- Grosso S, Camporese A. Valutazione di appropriatezza, efficienza ed efficacia di alcune procedure analitiche per ridurre il turnaround time delle emocolture. *RIMeL/IJLaM* 2007; 3: 203-12.
- Hugonnet S, Sax H, Eggimann P, et al. Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. *Emerg Infect Dis* 2007; 33: 947-53.
- Microbiologia Medica (AMCLI). Traccia per la formulazione di linee guida per l'emocultura.
- Nicoletti P, Pecile P. Il contributo del laboratorio di microbiologia alla diagnosi di sepsi: limiti e potenzialità dell'emocultura. *Esa Dia* 2006; 24: 17-21.
- Schinella M, Galdi P, Collini L, et al. La gestione delle emocolture come livello di qualità istituzionale: revisione e casistica del laboratorio di Rovereto. *SIMeL* 2008; 4: 271-9.
- Waites KB, Brookings ES, Moser SA, et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated cost of care. *Critical Care* 2004; 8: 291-8.