Valutazione di appropriatezza, efficienza ed efficacia di alcune procedure analitiche per ridurre il turnaround time delle emocolture

S. Grosso, A. Camporese

Unità Operativa di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli, Pordenone

Riassunto

Premesse. **Per migliorare l'impatto clinico del risultato microbiologico una delle esigenze gestionali emergenti oggi consiste nel produrre risultati in tempi sempre più rapidi: è infatti unanimemente riconosciuto che per incidere in maniera consistente nella scelta del farmaco antimicrobico riducendo la spesa e, se possibile, contestualmente il livello di mortalità, è necessario riuscire a fornire un antibiogramma in tempi il più possibile ridotti.**

Il presente lavoro ha inteso valutare la possibilità di migliorare il turnaround time delle emocolture nella diagnosi di sepsi utilizzando alcuni metodi per l'identificazione e i test di sensibilità direttamente da flacone di emocoltura, valutandone l'efficienza e l'efficacia.

Metodi. **Sono stati testati 70 ceppi isolati da emocoltura, valutando le performance analitiche di alcuni metodi, tra cui Vitek 2, Sensititre YeastOne, CHROMagar Candida, MRSA screen Agar ed eTest, utilizzati per l'identificazione e l'antibiogramma diretti da flaconi positivi, confrontando i risultati ottenuti con le procedure standard del nostro laboratorio.**

Risultati. **Tutte le identificazioni e i test di sensibilità dei 27 gram negativi testati hanno dimostrato ottime performance analitiche. Per quanto riguarda gli stafilococchi, solo 5 su 23 hanno consentito di ottenere un'identificazione corretta, mentre si sono ottenuti buoni risultati per quanto riguarda i test di sensibilità. Sensititre YeastOne ha invece dimostrato un'ottima performance per quanto concerne i test di sensibilità agli antifungini.**

Conclusioni. **Dai risultati ottenuti è possibile evincere che l'utilizzo dei test diretti, unitamente a un'adeguata riorganizzazione del personale e del workflow del laboratorio, possono incidere in modo significativo sul miglioramento dei tempi di risposta delle emocolture.**

Summary

Appropriateness, efficiency and efficacy of some analytical methods to improve blood cultures turnaround time

Background. To improve the clinical impact of microbiology results, one of the requirements now emerging is that of reducing the time needed to provide validated results. It is universally recognized that, in order to have a substantial impact on the choice of appropriate antibiotic treatment, reduction of overall hospitalization and diagnostic costs, and, if possible, reduce the levels of mortality, it is necessary to provide antibiotic susceptibility tests in the shortest possible timeframe. This study explores the possibility of improving turnaround time of laboratory diagnosis of septicemic patients using positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing.

Methods. In order to decrease the time lapse between initial inoculation of blood culture media and the reporting of results of identification and antimicrobial susceptibility tests for microorganism causing bacteriemia, we performed a study in which specially processed fluid from positive blood culture bottles were directly tested with some methods, like Vitek 2, Sensititre YeastOne, CHROMagar Candida, MRSA screen Agar and eTest. A total of 70 strains were investigated, comparing the results with our laboratory reference methods.

Results. All 27 bacterial strains with gram negative enteric bacillus-like morphology from positive blood cul-

Ricevuto: 12-01-2007 Accettato: 16-02-2007 Pubblicato on-line: 2-04-2007

Corrispondenza a: Dott.ssa Shamanta Grosso, Unità Operativa di Microbiologia e Virologia, Azienda Ospedaliera S.Maria degli Angeli, Via Montereale 24, 33170 Pordenone.
Tel. 0434-399247, fax 0434-399344, e-mail: capotecnici.batterio@aopn.fvg.it

tures were correctly identified and demonstrated a high percentage of MIC agreements. Among 23 *Staphylococci*, only 5 were correctly identified, but all demonstrated a good susceptibility testing performance. Sensititre YeastOne for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures demonstrated a high performance and a high percentage of MIC agreements.

Conclusions. The use of direct identification and susceptibility testing from positive blood cultures, as well as the reorganization of personnel, thus the workflow itself, can improve in response time and greater efficiency in diagnostic procedures.

Key words: blood cultures, turnaround time, appropriateness, efficacy, efficiency.

Introduzione

Per migliorare l'impatto clinico del risultato microbiologico una delle esigenze gestionali emergenti oggi consiste nel produrre risultati in tempi sempre più rapidi: è infatti unanimemente riconosciuto che per incidere in maniera consistente nella scelta del farmaco antimicrobico riducendo la spesa e, se possibile, contestualmente il livello di mortalità, è necessario riuscire a fornire un antibiogramma in tempi il più possibile ridotti[1-9].

La realtà odierna dimostra purtroppo però che ancora la maggior parte dei servizi di microbiologia lavora secondo turni del personale laureato e tecnico che non permettono di garantire una copertura per l'intera giornata e per l'intera settimana: ciò crea tuttora perciò problemi non indifferenti sui tempi di risposta, in quanto gli esami colturali non possono seguire in questo modo un costante flusso analitico. A tale proposito, una recente indagine policentrica di Goglio e Nicoletti[10] sulla gestione delle emocolture in Italia ha rivelato che ben il 66.6% dei servizi di microbiologia italiani non processa le emocolture durante la domenica.

Nonostante questa visione ormai "storica" della gestione, di orientamento prevalentemente "biologico", basata cioè più sull'attenzione posta alla sola qualità analitica piuttosto che al tempo entro il quale produrre una risposta "clinicamente fruibile", si sta facendo strada invece l'esigenza di passare ad una gestione più concretamente "clinica", efficiente ed efficace, volta cioè a fornire un risultato che conservi comunque caratteristiche di assoluta "eccellenza". Questo senza pregiudicare la velocità di refertazione, che è presupposto essenziale per guidare la terapia, riducendo al tempo stesso l'uso scorretto degli antibiotici e consentendo di incidere efficacemente sui processi di guarigione delle malattie da infezione[6,8].

In termini pratici, oggi è concretamente possibile, attraverso un'efficiente organizzazione del personale che garantisca una continuità analitica sette giorni su sette e l'utilizzo di metodiche e tecnologie diagnostiche adeguate, dimezzare i tempi di refertazione della maggior parte delle emocolture positive, influendo così in maniera significativa non solo sul *Turnaround time* (TAT), ma soprattutto sulla scelta del farmaco antimicrobico e più in generale su una migliore gestione clinica generale del paziente[8,9].

Nella gestione delle emocolture, gli elementi critici

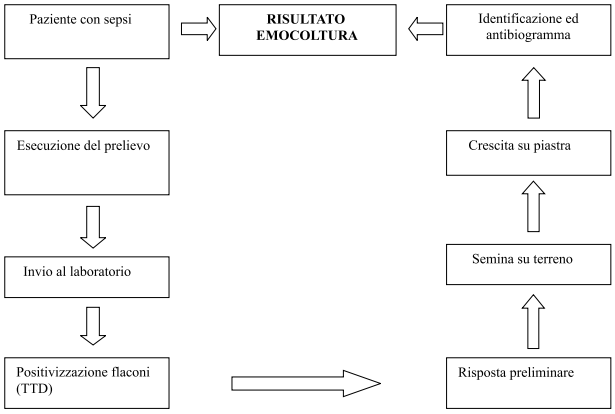


Figura 1. Normale flusso preanalitico-analitico-postanalitico di un'emocoltura.

del TAT sono costituiti essenzialmente da: tempo di positivizzazione dei flaconi (o *time to detection*, TTD); tempo di risposta preliminare (per via telefonica o informatica); tempo di risposta completa.

Nella Figura 1 viene esemplificato il normale flusso preanalitico-analitico-postanalitico di un'emocoltura, caratterizzato da diversi *steps* che insieme costituiscono il TAT complessivo dell'esame. Facile evincere che l'organizzazione analitico-gestionale del laboratorio può influire in maniera consistente su diversi elementi del flusso operativo complessivo.

Infatti, fermo restando il tempo di positivizzazione dei flaconi (Tab. I), legato alla performance analitica strumentale, il TAT può cambiare in modo consistente se si è in grado di intervenire sui successivi steps del flusso[3,8,9]. Se, infatti, è presente un'organizzazione estesa su tutto l'arco della settimana, è possibile ridurre il tempo di risposta preliminare e anticipare i tempi di semina.

La presenza costante di personale consente, infine, di predisporre test che permettano l'identificazione del microrganismo direttamente dal flacone e l'esecuzione di eventuali test di sensibilità diretti, riducendo così in modo consistente il TAT analitico.

E' ormai noto che ogni giorno perso per giungere alla diagnosi eziologica di sepsi e per ottenere una valutazione della sensibilità dell'isolato agli antimicrobici aumenta di 1-2 volte la probabilità di decesso del paziente, come dimostrato da recenti autorevoli studi[11].

E' vero, peraltro, che il tempo necessario al raggiun-

Tabella I. Stima dei tempi medi di crescita (*Time To Detection*) da emocoltura dei principali ceppi microbici presso l'U.O. di Microbiologia Clinica di Pordenone, utilizzando il sistema BacT/ALERT (bioMerieux, Roma, Italia).

Ceppi isolati	*% media isolamenti in 24 ore*	*% media isolamenti in 48 ore*	*% media isolamenti in 72 ore*
Stafilococchi coag. negativi	78%	20%	2%
Enterobacteriaceae (E. coli, Proteus spp., Klebsiella spp.)	90%	10%	0%
Pseudomonas spp.	60%	35%	5%
Staphylococcus aureus	60%	38%	2%
Candida spp.	5%	93%	2%

gimento della diagnosi microbiologica è dovuto in buona parte al livello organizzativo del servizio di microbiologia.

Infatti, le variabili che giocano un ruolo fondamentale nel computo del TAT sono essenzialmente: gli orari di apertura del servizio; la disponibilità di metodi per una diagnosi rapida; un efficiente sistema informatico per il collegamento con i reparti di degenza.

Il presente lavoro ha inteso valutare l'efficacia e l'efficienza di alcuni metodi di laboratorio che possono contribuire, se correttamente utilizzati, a ridurre i tempi di risposta preliminari.

Sia per le identificazioni che per i test di sensibilità diretti non esistono allo stato attuale procedure standardizzate e approvate e l'utilizzo dei vari sistemi disponibili viene lasciato alla responsabilità ed esperienza del microbiologo, tenendo presente che una identificazione non ragionevolmente certa può fuorviare l'indirizzo terapeutico ed essere pertanto dannosa.

Per quanto riguarda, invece, i test di sensibilità, pur non esistendo procedure validate e standardizzate[12-19], essi vengono fortemente raccomandati in quanto possono fornire indicazioni terapeutiche preliminari di grande importanza, soprattutto per escludere i più importanti meccanismi di resistenza, quali ad esempio la meticillino-resistenza degli stafilococchi, la produzione di beta lattamasi a spettro esteso delle *Enterobacteriaceae* o la resistenza al fluconazolo dei lieviti.

Bisogna tra l'altro sottolineare che è ormai dimostrato che gli errori rinvenibili nei test di sensibilità diretti sono per la maggior parte dei casi "*minor errors*" e numericamente molto ridotti[12-16].

Materiali e metodi

Nella nostra routine quotidiana, i flaconi per emocoltura, dopo le procedure di prelievo[4], vengono di norma inviati al laboratorio e incubati a 37° C utilizzando il sistema BacT/ALERT 3D (bioMerieux, Roma, Italia).

Per l'esecuzione sperimentale delle identificazioni e dei test di sensibilità diretti da flacone di emocoltura sono stati valutati diversi metodi: per quanto riguarda l'automazione, sia per Gram positivi che per Gram negativi, si è utilizzato il sistema Vitek 2 (bioMerieux); per i test di sensibilità diretti dei lieviti in semiautomazione si è utilizzato il sistema Sensititre YeastOne (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, USA); si sono poi valutati altri possibili metodi, dai più semplici, quali l'esame microscopico, i terreni cromogeni (CHROMagar Candida, KIMA, Padova, Italia) e le gallerie ID32C per l'identificazione dei lieviti (bioMerieux), l'MRSA screen Agar (KIMA) per gli stafilococchi, ai più complessi, quali l'eTest (AB-Biodisk, Solna, Svezia) per l'esecuzione di alcuni specifici test di sensibilità su batteri e lieviti.

Per l'allestimento dei diversi metodi diretti si è proceduto seguendo alcuni passaggi in sequenza: agitazione del flacone da emocoltura positivo; allestimento del vetrino per l'esame microscopico con colorazione di gram (si è infatti proceduto con i metodi diretti solo nel caso l'esame microscopico abbia rivelato un monomicrobismo, viceversa il campione ha seguito il normale iter diagnostico); aspirazione di 5-6 ml del campione con una provetta *vacutainer* munita di gel separatore (Sarstedt, Verona, Italia); centrifugazione del campione a 3200 giri per 15 minuti; eliminazione del sovranatante; prelievo del *pellet* microbico al top del gel con una pipetta Pasteur monouso sterile aggiungendo una piccola aliquota di soluzione fisiologica e risospendendo il materiale con delicatezza; sospensione di tutta l'aliquota prelevata in una provetta con fisiologica fino ad ottenere una torbidità di 0,5 Mc Farland per allestire l'identificazione diretta e l'antibiogramma (le semine su CHROMagar e l'MRSA screen Agar possono essere allestite direttamente dal *pellet* prelevato).

Nella Tabella II vengono riassunte le modalità scelte per l'esecuzione dei test diretti, in relazione al tipo di microrganismo isolato ed evidenziato all'esame microscopico.

L'esame microscopico, allestito di regola da tutti i flaconi risultati positivi al rilevamento strumentale, può essere di per sé considerato un test diretto preliminare presuntivo, in quanto, oltre a fornire una prima informazione sulla probabile eziologia dell'infezione (bacilli, cocchi, miceti), è in grado di orientare sulla presenza di una flora polimicrobica o monomicrobica.

Nel nostro laboratorio, l'esito dell'esame microscopico viene di norma comunicato tempestivamente al medico di reparto per fornire una prima indicazione eziologica.

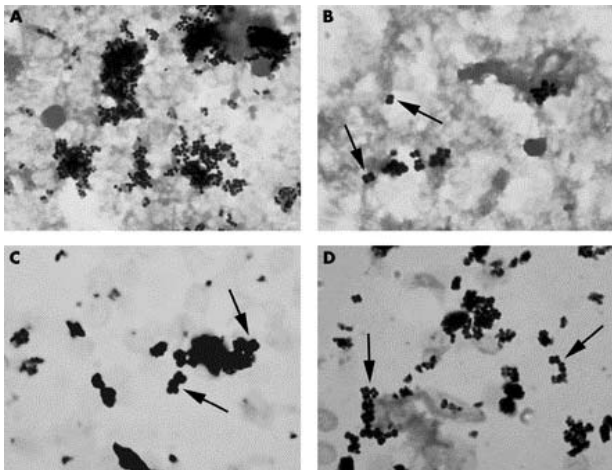


Figura 2. Relazioni tra l'aspetto microcopico degli stafilococchi e la loro identificazione presuntiva (da *Murdoch DR and Greenlees RL J Clin Path, 2004*).
(A) Bottiglie per anaerobi e *S aureus*: piccole cellule, grandi clusters;
(B) Bottiglie per anaerobi e stafilococchi coagulasi negativi: grandi cellule a tetradi (freccia) e piccoli clusters;
(C) Bottiglie per aerobi e *S aureus*: grandi cellule, stretti clusters (freccia);
(D) Bottiglie per aerobi e stafilococchi coagulasi negativi: tetradi e piccoli clusters (freccia).

Nel caso dei cocchi gram positivi, alcuni Autori[20] suggeriscono di utilizzare già l'esame microscopico diretto (Fig. 2) come prima valutazione presuntiva della presenza di *Staphylococcus aureus* piuttosto che di altri stafilococchi coagulasi negativi, con una sensibilità riferita dell' 89% e una specificità del 98%.

In questo caso, vengono suggeriti alcuni principali parametri da considerare, quali: le dimensioni della cellula batterica; il numero delle cellule che costituiscono il tipico grappolo; se il campione proviene da flaconi per aerobi od anaerobi.

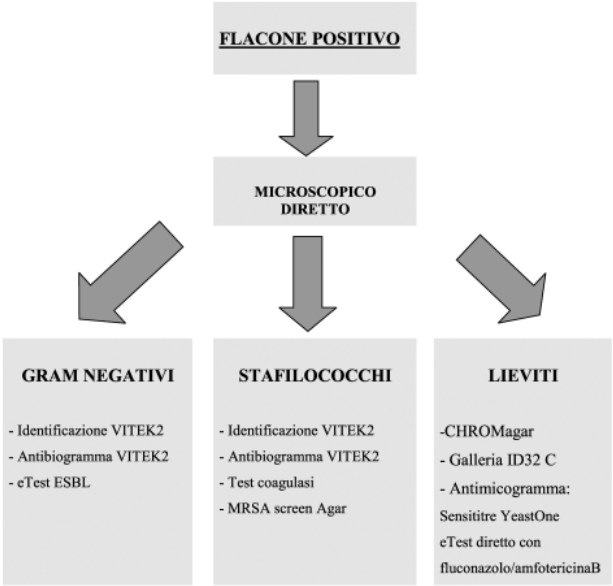
In base a questi parametri, nella Tabella III, viene descritto sinteticamente come può essere utilizzato questo metodo di identificazione presuntiva semplice ed economico[20].

Il test della coagulasi si basa sulla capacità di *Staphylococcus aureus* di produrre l'enzima coagulasi, in grado di determinare *in vitro* la coagulazione di plasma di coniglio[1,2]. Il test è stato allestito miscelando il *pellet* ottenuto da flacone con il plasma di coniglio, incubando poi il plasma così inoculato a 37° C per tre ore. In presenza di evidente coagulazione del plasma si identifica il microrganismo presuntivamente come *Staphylococcus aureus,* in attesa della identificazione definitiva.

Gli stafilococchi che non producono coagulazione del plasma sono definiti "coagulasi negativi" e devono essere comunque identificati mediante le reazioni biochimiche strumentali.

Il test epsilometrico (eTest) è stato utilizzato direttamente dal *pellet* ottenuto da flacone come precedente-

Tabella II. Modalità scelte per l'esecuzione dei test diretti.



mente descritto, per valutare il sospetto di eventuale produzione di beta lattamasi a spettro esteso da parte degli enterobatteri e come valutazione preliminare, in alternativa a Sensititre Yeast-One, della sensibilità/resistenza dei lieviti a Fluconazolo e Amfotericina B[21,22].

L'eTest è un metodo quantitativo di valutazione della MIC, in cui si impiega una striscia di materiale inerte caricato con un gradiente continuo ed esponenziale di antibiotico.

Negli ultimi anni sono state messe in commercio strisce di eTest realizzate per lo screening della produzione di ESBL (eTest ESBL strips).

Agli estremi di tali strisce vi sono gradienti di concentrazioni di due sostanze distinte: cefotaxime e cefotaxime + acido clavulanico (CT/CTL) su una; ceftazidime e ceftazidime + acido clavulanico (TZ/TZL) sull'altra.

La presenza di ESBL è confermata dalla comparsa di una zona fantasma o da una deformazione dell' ellissi di inibizione del CT o TZ (Fig. 3).

La lettura della MIC è data dal punto di intersezione della ellissi di inibizione con il margine della striscia di materiale plastico dell' eTest.

Un rapporto tra i valori della MIC del ceftazidime e della MIC del ceftazidime-acido clavulanico >= 8 indica la presenza di beta- lattamasi a spettro esteso.

Nella pratica è stata allestita una sospensione 0,5 Mc Farland del *pellet* batterico in soluzione fisiologica. Mediante tampone sterile si è proceduto a inoculare su una piastra di Mueller-Hinton Agar, avendo cura di strisciare tre volte tutta la superficie, ruotando la piastra di 60°, per assicurare un' uniforme distribuzione del microrganismo sul terreno. Dopo aver atteso che la superficie fosse asciutta, si sono deposte le strisce sul terreno.

Le piastre sono state incubate per 16-18 ore, valu-

Tabella III. Descrizione sintetica della possibile interpretazione dell'esame microscopico per la discriminazione preliminare degli stafilococchi (da *Murdoch DR and Greenlees RL J Clin Path, 2004*).

Tipo di flacone	*Organismo*	*Dimensioni cellule*	*Caratteristiche del Grappolo*
	Staphylococcus aureus	Piccola (<1μ*m*)	Grande numero di cellule (200-300), raggruppate in modo irregolare.
ANAEROBI			
	Stafilococchi coagulasi negativi	Grande (>1 μ*m*)	Tetradi o piccoli gruppi fino a 16 cellule
	Staphylococcus aureus	Grande (>1μ*m*)	Gruppi molto compatti di 8-32 cellule. Le singole cellule non si distinguono.
AEROBI			
	Stafilococchi coagulasi negativi	Variabile (tipicamente <1μ*m*)	Tetradi o piccoli gruppi fino a 16 cellule

Tabella IV. Distribuzione dei ceppi testati sperimentalmente.

CEPPI TESTATI		
GRAM NEGATIVI	STAFILOCOCCHI	LIEVITI
27	**23**	**20**

tando poi l'alone di inibizione creatosi e calcolando il rapporto fra la MIC (minima concentrazione inibente) del singolo antibiotico e quella dell'antibiotico in associazione con l'acido clavulanico.

L'eTest diretto, da un punto di vista operativo, si può allestire con le stesse modalità descritte anche per valutare la sensibilità/resistenza dei lieviti a diversi farmaci antifungini in alternativa al Sensititre Yeast-One[19]. Nel nostro caso è stato scelto di testare i più significativi sotto il profilo terapeutico: Fluconazolo e Amfotericina B.

L'MRSA screen Agar è un terreno selettivo raccomandato come test di screening per l'identificazione degli stafilococchi meticillino resistenti. Il terreno base è costituito dal Mueller Hinton agar con cloruro di sodio al 4%, a cui viene aggiunta l'oxacillina in rapporto di 6 mg/l di terreno[1-3,17]. Il terreno (KIMA, Padova, Italia) è stato utilizzato seminando direttamente il *pellet* ottenuto dal flacone risultato positivo, dal quale l'esame microscopico aveva evidenziato la presenza di cocchi gram positivi S*taphylococcus-like*. Una volta seminato, il terreno è stato incubato per 24 ore a 35-37° C. L'evidenza di crescita dopo il periodo di incubazione rileva la presenza di stafilococchi meticillino resistenti. La mancata crescita, viceversa, significa che il ceppo in esame è sensibile all'oxacillina[1-3,17].

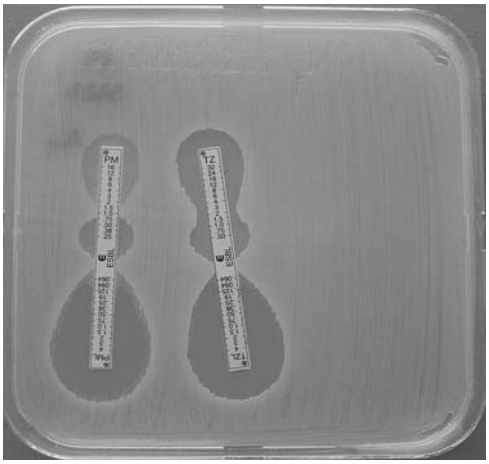


Figura 3. Beta lattamasi a spettro esteso, messa in evidenza con due strips di eTest (AB-Biodisk, Solna, Svezia).

CHROMagar Candida (KIMA, Padova, Italia) è un terreno di coltura selettivo e differenziale a base di peptoni, glucosio, cloramfenicolo e di una miscela di sostanze cromogeniche per l'identificazione presuntiva di lieviti[23,24].

Le colonie cresciute su tale terreno, in seguito alla reazione di enzimi specie-specifici su appositi substrati cromogenici, assumono una morfologia ed una colorazione particolare che le rendono distinguibili le une dalle altre. *Candida albicans* ad esempio produce colonie di colore verde (Fig. 4), *Candida tropicalis* blu con un alone rosa scuro intorno alla colonia, *Candida glabrata* colonie lisce rosa scuro, *Candida krusei* colonie larghe, rugose color rosa pallido e *Candida papapsilosis* colonie bianche o rosa pallido.

L'utilità di tale terreno è evidente soprattutto nel caso di *Candida albicans,* che assume un evidente colore verde, unico, specifico e ben distinguibile dalle altre colo-

Figura 4. Aspetto di *Candida albicans* e *non albicans* con CHROMagar Candida (KIMA, Padova, Italia).

Tabella V. Distribuzione delle identificazioni degli gram negativi, ottenute con i metodi di riferimento e secondo le procedure standardizzate utilizzate di routine.

GRAM NEGATIVI (27 ceppi testati)					
E.coli	*P.aeruginosa*	*M.morganii*	*K.pneumoniae*	*E.cloacae*	*Salmonella spp*
16	**5**	**1**	**3**	**1**	**1**

Tabella VI. Distribuzione delle identificazioni degli stafilococchi, ottenute con i metodi di riferimento e secondo le procedure standardizzate utilizzate di routine.

STAFILOCOCCHI (23 CAMPIONI TESTATI)			
S. aureus	*S.haemolyticus*	*S.epidermidis*	*S.warneri*
11	**3**	**8**	**1**

nie[23,24].

Per gli altri tipi di lieviti, le indicazioni sono presuntive e non permettono di eliminare i metodi di identificazione tradizionali. Peraltro, la distinzione tra *Candida albicans* e *non albicans* è già di per sé molto importante a fini terapeutici, se si considera che, mentre *Candida albicans* è di solito sensibile a tutti gli antifungini, le candide *non albicans* esprimono viceversa alcune refrattarietà, soprattutto nei confronti degli azoli, quali il fluconazolo. Tale terreno assume inoltre un notevole rilievo, qualora siano presenti in uno stesso campione due tipi diversi di lieviti.

Per valutare i metodi descritti, sono stati testati un totale di 70 ceppi isolati da emocoltura, distribuiti come evidenziato nella Tabella IV.

Tutti i ceppi sono stati identificati e testati per la sensibilità agli antimicrobici sia con il metodo diretto da flacone, sia con la normale procedura prevista dopo la risemina su terreni solidi per confermare i risultati ottenuti.

Nelle Tabelle V, VI, VII vengono illustrate le identificazioni ottenute con i metodi di riferimento e secondo le procedure standardizzate utilizzate di routine, nell'ambito dei diversi gruppi: batteri gram negativi, stafilococchi e lieviti. Si è deciso di non testare gli streptococchi in quanto è difficile individuare preliminarmente quale metodo utilizzare sia per la corretta identificazione di specie, sia per la rilevazione delle sensibilità agli antibiotici. In questo caso, si può solo ipotizzare di valutare eventualmente in via preliminare con eTest diretto solo la MIC dei glicopeptidi (se si sospetta un enterococco) o eventualmente la MIC della penicillina, per quanto attiene il sospetto di *Streptococcus pneumoniae* o di uno streptococco viridante.

Risultati

Nella Tabella VIII sono raccolti sinteticamente i risultati ottenuti dal confronto tra identificazioni e test di sensibilità eseguiti secondo i metodi di riferimento di norma utilizzati per la diagnostica delle emocolture e i test eseguiti direttamente da flacone.

Come è evidente da una prima valutazione generale, per quanto attiene le identificazioni, si è riscontrata una totale sovrapponibilità nei batteri gram negativi tra il risultato eseguito su Vitek 2 da risemina e quello ottenuto direttamente da flacone (27 risultati concordanti su 27 testati). Lo stesso dicasi per i lieviti, testati in entrambe i casi con gallerie ID32C (20 risultati concordanti su 20 testati). Anche per quanto riguarda l'utilizzo del CHROMagar Candida si è ottenuta la corretta rilevazione presuntiva di tutti i 10 stipiti di *Candida albicans* rispetto ai 10 ceppi di *Candida non albicans*.

Per quanto concerne gli stafilococchi, invece, le identificazioni dirette coerenti sono state solo 5 sui 23 ceppi testati, con un valore predittivo positivo di 0,21, ritenuto analiticamente inaccettabile.

Le difficoltà riscontrate nell'identificazione degli stafilococchi, la cui valutazione biochimica con tutti i sistemi manuali e automatici non è sempre facile anche nella normale routine diagnostica, potrebbero essere riferibili alle interferenze dovute alla presenza di cellule del sangue nel brodo di coltura. Queste cellule, infatti, non completamente separabili dal *pellet* batterico, possono influire sul risultato delle reazioni biochimiche coinvolte nel processo di identificazione di Vitek 2, andando anche ad influire in modo significativo sulla valutazione del Mc Farland, così come riferito anche da altri Autori[16].

Molto interessante è risultata, invece, la *performance* del test diretto della coagulasi, che ha consentito di identificare direttamente da flacone tutti i ceppi di *Staphylococcus aureus*, rivelandosi un'ottima ed economica soluzione come test preliminare per l'inquadramento eziologico delle sospette sepsi da stafilococchi, unitamente all'esame microscopico presuntivo, così come descritto dalla letteratura[20].

Per quanto riguarda i test di sensibilità, il confronto tra i dati dei test diretti rispetto a quelli ottenuti secondo i metodi di routine ha prodotto interessanti risultati.

Nel caso dei batteri gram negativi tutti i principali fenotipi di resistenza espressi sono stati identificati cor-

Tabella VII. Distribuzione delle identificazioni dei lieviti, ottenute con i metodi di riferimento e secondo le procedure standardizzate utilizzate di routine.

LIEVITI (20 CAMPIONI TESTATI)				
C. albicans	*C. glabrata*	*C.tropicalis*	*C.krusei*	*C.parapsilosis*
10	**5**	**2**	**1**	**2**

Tabella VIII. Confronto tra risultati delle identificazioni e dei test di sensibilità eseguiti secondo i metodi di riferimento di norma utilizzati e i test eseguiti direttamente da flacone.

	Gram negativi (27 testati)	**Stafilococchi** (23 testati)	**Lieviti** (20 testati)
IDENTIFICAZIONI CORRETTE	**27**	**5**	**20**
TEST DI SENSIBILITA' COERENTI	**27**	**21**	**19**

rettamente, con una concordanza pressoché totale anche dei valori di MIC tra il risultato eseguito su Vitek 2 da risemina e quello ottenuto direttamente da flacone.

Solo in due ceppi di *Escherichia coli* si è ottenuta una variazione di due diluizioni di ampicillina/sulbactam, con una sovrastima del livello di sensibilità/resistenza del test diretto rispetto al test eseguito come da routine, con modifica in senso più restrittivo dell'interpretazione qualitativa del dato (da S a I in un caso e da I a R nell'altro). Tale risultato, però, è stato considerato un *minor error*, in quanto non in grado di influire negativamente sull'impatto terapeutico finale.

Va sottolineata, inoltre, la corretta rilevazione in un ceppo di *Morganella morganii* anche di un meccanismo di resistenza, quale la produzione di cefalosporinasi ad alto livello, di difficile interpretazione fenotipica.

Per quanto riguarda gli stafilococchi, contrariamente a quanto constatato per i test di identificazione, si è ottenuta una buona *performance* dei test di sensibilità diretti.

Si è, infatti, rilevata solo una discrepanza in due ceppi di stafilococchi coagulasi negativi tra il risultato di clindamicina ed eritromicina ottenuto da risemina e quello ottenuto da flacone. E' noto, peraltro, che tutti i metodi in diluizione possono talora produrre risultati non attendibili sugli stafilococchi per questi due farmaci, mentre il test di riferimento rimane il *Disk approximation test* (D-test) da eseguirsi con un dischetto di eritromicina e uno di clindamicina su terreno solido[17].

Importante rilevare, invece, che sono stati correttamente individuati sia i sei ceppi meticillino-resistenti, sia i 17 ceppi meticillino sensibili, così come tutti i ceppi produttori di beta lattamasi. Inoltre, l'utilizzo diretto da flacone del terreno per lo *screening* della meticillino-resistenza (MRSA screen Agar) ha prodotto risultati eccellenti (Tab. IX) in quanto ha consentito di evidenziare tutti i sei ceppi meticillino-resistenti e tutti i 17 ceppi sensibili all'oxacillina (sia coagulasi positivi che negativi), confermandosi come test diretto assolutamente utile ed economico per rilevare questo fondamentale meccanismo di resistenza espresso dagli stafilococchi.

Per quanto riguarda, infine, i lieviti, i risultati, sperimentalmente inediti[25], sono stati di estremo interesse clinico, in quanto Sensititre YeastOne ha dimostrato un'ottima e per certi versi inaspettata *performance* analitica nei test eseguiti direttamente da flacone, con un'ottima sovrapponibilità dei risultati, unitamente a una più semplice interpretabilità della MIC rispetto a e-Test, riferibile alla più facile e intuitiva rilevazione dei valori in colorimetria. Le poche differenze nei valori di MIC riscontrate tra test diretto e da risemina non hanno modificato (se non in rari casi che sono di seguito descritti) il livello interpretativo del test, anche nei diversi ceppi di *Candida non albicans*, le cui resistenze sono sempre di difficile evidenziazione[18,25,26]. Rispetto ai test eseguiti da risemina, tutti i 10 ceppi di *Candida albicans* esaminati direttamente da flacone hanno prodotto risultati assolutamente sovrapponibili. Nell'unico ceppo testato di *Candida krusei*, stipite particolarmente critico sotto il profilo interpretativo per le resistenze naturali espresse, si è ottenuta una sola diluizione di differenza per il fluconazolo, senza però che ciò abbia in alcun modo influito sulla valutazione di resistenza (naturale) attesa.

Su due ceppi esaminati di *Candida tropicalis* si è ottenuto nel test diretto un solo *minor error* con sovrastima da S a I del fluconazolo, peraltro clinicamente ininfluente.

Su cinque ceppi di *Candida glabrata* testati, in uno solo si è ottenuta una differenza di una diluizione per quanto concerne il fluconazolo, con sovrastima da I a R del risultato, considerato anche in questo caso come *minor error*, in quanto clinicamente ininfluente.

Solo nel caso di *Candida parapsilosis* si sono verificati in uno dei due ceppi testati due errori, considerati *major errors*, con sottostima del livello interpretativo da I ad S per fluconazolo e voriconazolo, che avrebbero potuto generare un problema nella gestione clinica dell'infezione.

Peraltro, considerati nel loro insieme, i dati ottenuti sono di estremo interesse, in quanto su un totale di 20

Tabella IX. Risultati ottenuti con l'utilizzo di MRSA screen Agar (KIMA, Padova, Italia) direttamente da flacone.

MRSA screen AGAR	
Ceppi testati	**23**
Ceppi meticillino-resistenti	**6**
Ceppi sensibili a oxacillina	**17**

ceppi testati (per un totale di 100 antifungini analizzati) non si sono rilevati *very major errors* e solo due *major errors* (su un unico ceppo) e due *minor errors*.

Conclusioni

L'esigenza di accelerare quanto più possibile la risposta delle emocolture è uno degli obiettivi prioritari in microbiologia, per poter incidere in maniera consistente nella scelta del farmaco antimicrobico riducendo la spesa e, se possibile,contestualmente il livello di mortalità[6,8,9]. La sperimentazione descritta ha inteso valutare quanto sia possibile ridurre il TAT delle emocolture utilizzando metodi assolutamente tradizionali, per l'identificazione e i test di sensibilità, rendendoli però più efficienti mediante l'utilizzo diretto da flacone positivo anziché attendere il tempo di risemina, in un contesto organizzativo in cui il lavoro si svolge su sette giorni consecutivi per offrire una maggiore continuità analitica e una maggiore efficacia diagnostica.

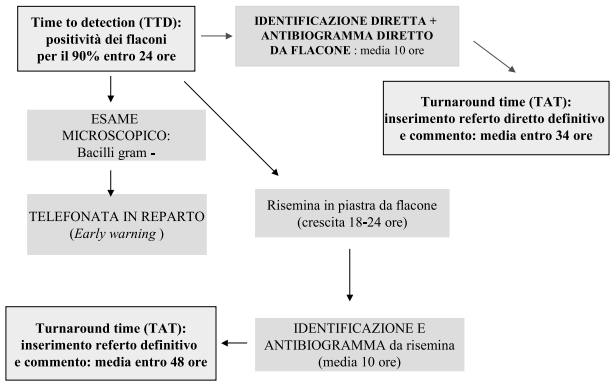
E' stata volutamente tralasciata l'ipotesi di testare le più recenti tecniche di biologia molecolare in quanto, se da un lato consentono oggi di identificare in tempi assolutamente competitivi i patogeni più significativi con sensibilità elevatissima, senza l'ausilio dei tradizionali metodi di coltura in flacone[5], dall'altro richiedono la disponibilità di dispendiose tecnologie analitiche e di personale altamente specializzato, non certo disponibile per tutto l'arco della settimana e in qualsiasi laboratorio, ciò che ne fa decadere in buona parte l'efficienza e l'efficacia.

La sperimentazione di alcune metodiche tradizionali eseguite direttamente da flacone positivo, eseguita su un totale di 70 ceppi, ha invece portato a risultati molto interessanti che hanno consentito di intervenire in modo significativo sui flussi diagnostici della nostra Unità Operativa e più in generale sul TAT delle emocolture.

Per quanto attiene i batteri gram negativi, le performance dimostrate dai metodi diretti, sia per quanto concerne le identificazioni che gli antibiogrammi ci hanno consentito di intervenire introducendo di routine entrambe i test su Vitek 2, riducendo così tendenzialmente il TAT medio dei risultati disponibili a video dalle attuali 48 ore a 34 ore, con un risparmio di tempo che in media si può quantificare intorno alle 14 ore rispetto alle procedure tradizionali, come sinteticamente evidenziato nella Tabella X.

Inoltre, l'efficacia dimostrata da e-Test nella rileva-

Tabella X. Possibile *work flow* per ridurre il TAT delle emocolture in caso di sospetta sepsi da gram negativi.



zione delle ESBL direttamente da flacone ci ha consentito di introdurne l'utilizzo qualora vi sia il sospetto di particolari enterobatteri che più spesso esprimono questo meccanismo di resistenza in pazienti e/o contesti critici nei quali sia urgente escludere con sicurezza questa refrattarietà ai beta lattamici.

L'inaccettabile valore predittivo positivo di 0,21 ottenuto con le identificazioni dirette degli stafilococchi da flacone, ci ha portato ad accantonare l'ipotesi di utilizzare Vitek 2 per questo tipo di test.

Viceversa, gli ottimi riscontri rilevati con l'utilizzo della coagulasi diretta, del MRSA screen AGAR (100% di concordanza), nonchè dei test diretti di sensibilità con Vitek 2 ci hanno portato a valutare un diverso e altrettanto efficace *work flow* per la diagnostica delle sepsi da stafilococchi, come esemplificato in Tabella XI per lo *Staphylococcus aureus*, con un risparmio di tempo che in media si può quantificare intorno alle 17 ore rispetto alle procedure tradizionalmente utilizzate. Questo dimostra ancora una volta, se ce ne fosse bisogno, che "vecchi" test, utilizzati in un contesto organizzativo efficiente, possono produrre la stessa efficacia, se non superiore, di test di ultima generazione.

I migliori risultati in termini di efficienza/efficacia della sperimentazione si sono ottenuti con i lieviti, in quanto i test utilizzati hanno consentito di ridurre potenzialmente il TAT in maniera molto significativa, con un risparmio di tempo che in media si può quantificare in circa la metà (3,5 giorni *versus* 6) rispetto alle procedure tradizionalmente utilizzate[25,26].

Nella Tabella XII viene riportata l'analisi sintetica del potenziale *work flow* analitico in caso di candidemia.

Da sottolineare soprattutto i risultati raggiunti con il test di sensibilità agli antifungini Sensititre YeastOne, che ha consentito di ottenere, in media dopo solo 3,5 giorni dal prelievo, una valutazione della terapia in atto o una sua modifica (se necessario), con risultati di assoluta eccellenza rispetto alle procedure tradizionalmente utilizzate da risemina su terreni solidi (2% rispettivamente di *minor* e *major errors* e nessun riscontro di *very major errors*) e con una notevole semplicità di esecuzio-

Tabella XI. Possibile *work flow* per ridurre il TAT delle emocolture in caso di sospetta sepsi da Staphylococcus aureus.

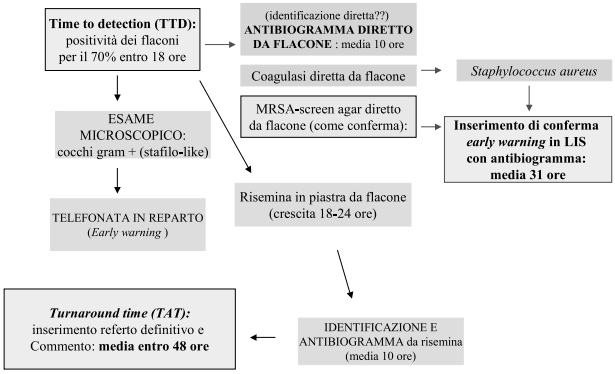
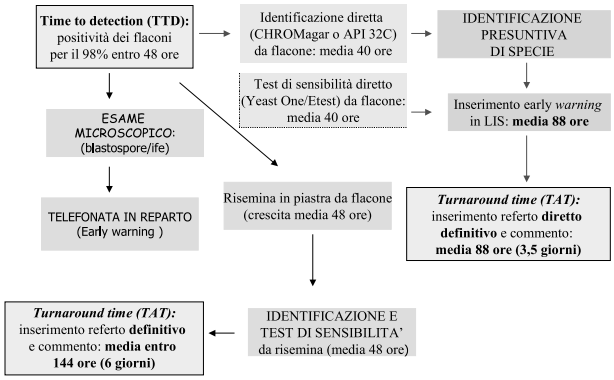


Tabella XII. Possibile *work flow* per ridurre il TAT delle emocolture in caso di sospetta sepsi da *Candida spp.*



ne e interpretazione rispetto ad altri analoghi test di riferimento, quale ad esempio l'e-Test[22].

Quest'ultimo metodo, infatti, a fronte di un'ottima dimostrata performance[22] anche nell'utilizzo diretto da flacone, evidenzia qualche difficoltà per quanto concerne l'interpretazione del dato analitico, oltre ad avere un costo relativamente elevato non certo gestibile da qualsiasi laboratorio.

La nostra sperimentazione ci ha comunque permesso di ottenere risultati apprezzabili per quanto concerne la revisione di alcuni flussi di lavoro relativi alle emocolture, anche se rimangono ancora insoluti alcuni problemi. Fra questi ad esempio il comportamento da tenere qualora si ipotizzi la presenza di enterococchi o streptococchi viridanti, soprattutto in contesti clinici di particolare criticità, quali ad esempio le endocarditi, laddove la celerità della diagnosi eziologica e della rilevazione della sensibilità agli antibiotici potrebbero cambiare seriamente le prospettive terapeutiche e l'esito stesso della malattia. In questo caso, sarebbe quanto meno auspicabile eseguire sui viridanti un eTest diretto per penicillina e, per quanto attiene gli enterococchi, solo in particolari contesti critici e solo nel caso di evidenza epidemiologica di elevate resistenze ai glicopetpidi, eseguire anche un eTest diretto per vancomicina e teicoplanina.

In prospettiva, invece, si renderà necessario implementare l'intervento diagnostico molecolare. Le tecniche di biologia molecolare disponibili sul mercato dei diagnostici, infatti, possiedono oggi caratteristiche di sensibilità e specificità impensabili fino a qualche anno fa e potenzialità di sviluppo interessanti soprattutto per alcune tipologie di test[5].

Si tratta però di creare le condizioni in termini di formazione del personale per poter lavorare in modo continuo per tutto l'arco della settimana.

Infatti, nonostante le notevoli performance di alcune metodologie[5], quali ad esempio il *SeptiFast*® (Roche Diagnostics, Milano, Italia), consentano in sole sei ore e senza l'ausilio di alcun mezzo di coltura di ottenere l'identificazione di 25 diversi patogeni (compresi i lieviti) e di rilevare, mediante l'utilizzo dello strumento *Light Cycler*® (Roche Diagnostics, Milano, Italia), già disponibile nella nostra Unità Operativa per l'esecuzione di altre metodiche, la meticillino-resistenza espressa dagli stafilococchi e la resistenza ai glicopeptidi espressa dagli enterococchi, è difficile giustificarne oggi il pieno sfruttamento se non si garantisce prima di tutto la continuità analitica.

Comunque sia, l'introduzione e lo sfruttamento di queste tecnologie rimane uno degli obiettivi prioritari sotto il profilo organizzativo, gestionale e analitico per l'immediato futuro, soprattutto perché permetterebbe di intervenire su quei microrganismi, come gli streptococchi e gli enterococchi, per i quali, come si è detto, allo stato attuale i metodi diretti non consentono performance sufficienti a garantire sempre sicurezza e qualità analitica.

Bibliografia

1. Murray PR, Barron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH. Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Publ.; 2003.
2. Isenberg HD. Clinical microbiology procedures handbook. Washington, D.C.: American Society for Microbiology Publ.; 2004.
3. Camporese A. La diagnostica microbiologica delle sepsi e delle infezioni del sistema nervoso centrale. Atti Convegno "La diagnostica microbiologica delle sepsi e delle infezioni del Sistema Nervoso Centrale". Bussolengo (VR), 10 giugno 2005.
4. Camporese A, e Gruppo di Coordinamento per il Controllo delle Infezioni Ospedaliere. Protocollo per l'uso appropriato delle emocolture. Azienda Ospedaliera Santa Maria degli Angeli (PN), 2006.
5. Nicoletti P, Pecile P. Il contributo del laboratorio di microbiologia alla diagnosi di sepsi; limiti e potenzialità dell'emocoltura. Esa Dia 2006; 24:17-21.
6. Camporese A, Li Bergoli M. Il cambiamento del microbiologo: dalla visione "biologica" alla visione "clinica". Riv Med Lab 2002; 3:116-20.
7. Camporese A, Tizianel G, Cappelletti P. L'impatto dell'automazione e dell'informatica nel processo di cambiamen-

to dell'organizzazione del laboratorio di microbiologia. Abstr 17° Congr Naz SIMeL, Lamezia Terme (CZ), 2003.
8. Camporese A. Il microbiologo Clinico nel panorama di modernizzazione della medicina di laboratorio. Riv Med Lab 2004; 5:121-32.
9. Camporese A. The impact of automation on organizational changes in a community hospital microbiology laboratory: the passage from a "biological" management to a "clinical" management. Infez Med 2004; 12:118-25.
10. Goglio A, Nicoletti P. Indagine nazionale sulle metodiche per emocoltura in Italia. Microbiologia Medica 2004; 19:1-13.
11. Bouza E, Sousa D, Munoz P, Rodriguez-Creixems M, Fron C, Lechuz JG. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting blood culture results. Clin Infect Dis 2004; 39:1161-9.
12. Ling TKW, Liu ZK, Cheng AFB. Evaluation of the Vitek 2 system for rapid direct identification and susceptibility testing of Gram-Negative Bacilli from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2003; 41:4705-7.
13. Mirret S, Reller LB, Petti CA, Woods CW, Vazirani B, Sivadas R, et al. Controlled clinical comparision of BacT/ALERT standard aerobic medium with BACTEC standard aerobic medium for culturing blood. J Clin Microbiol 2003; 41:2391-4.
14. Funke G, Funke-Kissling P. Use of the BD PHOENIX automated microbiology system for direct identification and susceptibility testing of Gram-Negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial. J Clin Microbiol 2004; 42:1466-70.
15. Bruins MJ, Bloembergen P, Ruijs GJ, Wolfhagen MJ. Identification and susceptibility testing of Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa by direct inoculation from positive BACTEC blood culture bottles into Vitek 2. J Clin Microbiol 2004; 42:7-11.
16. De Cueto M, Ceballos E, Martinez-Martinez L, Perea EJ, Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the Vitek 2 system. J Clin Microbiol 2004; 42:3734-8.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Sixteenth Informational Supplement. Document M100-S16. CLSI, Villanova, PA, 2006.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. Document M27-A2. NCCLS, Villanova, PA, 2002.
19. Camporese A. Infezioni fungine disseminate: approccio integrato tra diagnosi e terapia. Atti Convegno "Infezioni fungine disseminate: dagli studi clinici alla terapia del paziente". Mestre (VE), 7 ottobre 2005.
20. Murdoch DR, Greenlees RL. Rapid identification of Staphylococcus aureus from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. J Clin Pathol 2004; 57:199-201.
21. Navon-Venezia S, Ben-Ami R, Schwaber MJ, Leavitt A, Schwartz D, Carmeli Y. Evaluation of an accelerated protocol for detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing gram-negative bacilli from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2005; 43:439-41.
22. Chang HC, Jung Chang J, Huang Chan S, Huey Huang A, Lan WU T, Chu Lin M, et al. Evaluation of Etest for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. J Clin Microbiol 2001; 39:1328-33.
23. Horvath LL, Hospenthal DR, Murray CK, Dooley DP. Direct isolation of Candida spp from blood cultures on the chromogenic medium CHROMagar Candida. J Clin Microbiol 2003; 41:2629-32.
24. Yera H, Poulain D, Lefebvre A, Camus D, Sendid B. Polymicrobial candidaemia revealed by peripheral blood smear and chromogenic medium. J Clin Pathol 2004; 57: 196-8.
25. Tortorano AM, Rigoni AL, Biraghi E, Prigitano A, Viviani MA e FIMUA-ECMM candidaemia study group. The European Confederation of medical mycology (ECMM) survey of candidaemia in Italy: antifungal susceptibility patterns of 261 non-albicans Candida isolates from blood. J Antimicrob Chemother 2003; 52:679-82.
26. Ellepola ANB, Morrison CJ. Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. J Microbiol 2005; 43:65-84.