

Position paper AMCLI sulla possibilità di *Identificazione diretta dei microrganismi da emocoltura positiva con il dispositivo Vitek® MS*

M. Sarti¹, C. Farina², F. Luzzaro³, V. Sambri⁴, A. Cellini⁴, M. Cosentino², C. Mauri³, D. Nozzi¹, M.F. Pedna⁴, L. Pifferi¹ e P. Clerici⁵

¹ SSD Microbiologia Clinica Provinciale AUSL di Modena-Baggiovara (Modena)

² USC Microbiologia e Virologia AO 'Papa Giovanni XXIII' di Bergamo

³ USC Microbiologia e Virologia AO della Provincia di Lecco

⁴ UO di Microbiologia AUSL della Romagna - *Pievesestina (Cesena)*

⁵ Presidente AMCLI - UO Microbiologia AO di Legnano (Milano)

Introduzione

L'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) per l'identificazione rapida da colonie microbiche cresciute su terreni solidi agarizzati si è rapidamente diffuso nei Laboratori di Microbiologia Clinica a partire dal 2010, determinando una vera e propria "rivoluzione" metodologica di entità non inferiore a quella causata dall'avvento delle tecniche di biologia molecolare. Fra le varie applicazioni pratiche ipotizzate è subito emersa come particolarmente interessante la possibilità di ottenere identificazioni rapide ed accurate direttamente dai flaconi delle emocolture positive. A tutt'oggi non esiste però un consenso sui diversi possibili protocolli operativi utilizzabili né esistono metodiche accuratamente "standardizzate" e mancano anche studi che abbiano messo a confronto protocolli diversi.

Già nel 2011 bioMérieux Italia aveva stimolato, attraverso l'AMCLI, una valutazione da parte di alcuni Laboratori di Microbiologia Clinica italiani di una metodica basata sul principio della cosiddetta "Lisi-Filtrazione" (eluizione della brodocoltura mediante soluzione lisante le cellule ematiche e sua successiva filtrazione su membrana con allestimento dell'identificazione a partire dal residuo). Tale studio (presentato durante il Congresso Nazionale AMCLI 2013) ha evidenziato come la suddetta metodica, pur offrendo una discreta accuratezza nell'identificazione microbica diretta dalla brodocoltura positiva (77,5% di risultati corretti rispetto all'identificazione da coltura *overnight*), risulti però essere piuttosto indaginosa e di difficile applicabilità specialmente per laboratori che debbano processare quotidianamente un numero considerevole di emocolture.

Nell'estate 2013 bioMérieux Italia ha nuovamente promosso attraverso AMCLI una valutazione multicentrica al fine di raffrontare performance e praticabilità di ulteriori possibili approcci metodologici per l'utilizzo della MALDI-TOF MS nell'identificazione diretta da emocolture positive.

Centri partecipanti e impostazione dello studio

Sono stati coinvolti nello studio quattro Laboratori di Microbiologia Clinica:

- USC Microbiologia e Virologia dell'AO 'Papa Giovanni XXIII' - *Bergamo*
- USC Microbiologia e Virologia dell'AO della Provincia di Lecco - *Lecco*
- UO di Microbiologia dell'AUSL della Romagna - *Pievesestina (Cesena)*
- SSD Microbiologia Clinica Provinciale dell'AUSL di Modena - *Baggiovara (Modena)*.

La sperimentazione è stata impostata sul confronto fra quattro diversi approcci metodologici: *Centrifugazione e Filtrazione (CF)*, *Centrifugazione e Semina su piastra (CS)*, *Arricchimento in brodo e Centrifugazione (AC)*, *Semina Diretta su piastra (SD)*. Per le ultime tre metodiche, che prevedono un ulteriore sviluppo colturale in terreno solido o liquido, sono stati valutati differenti periodi di incubazione (rispettivamente 3 e 4 ore per CS, 1 e 2 ore per AC, 2-3-4 e 5 ore per SD). In aggiunta alla metodica tradizionale, basata sull'identificazione microbica di colonie ottenute da coltura overnight, ogni laboratorio ha processato, nell'arco di quattro mesi, 200 flaconi positivi di emocoltura non ripetuti (un flacone per paziente) utilizzando due dei quattro approcci metodologici di identificazione diretta. Sono stati esclusi dallo studio i flaconi per i quali l'esame microscopico diretto dopo colorazione di Gram, eseguito dal flacone positivo, ha evidenziato la presenza di lieviti o di colture polimicrobiche. Tutte le emocolture sono state eseguite utilizzando lo strumento BacT/ALERT (bioMérieux) e considerando idonei i campioni raccolti nei flaconi BacT/ALERTPlus (addizionati di resine) indifferentemente aerobi o anaerobi.

Descrizione sintetica dei protocolli utilizzati

Centrifugazione e Filtrazione (CF)

Inserire in una provetta sterile da 7-10 ml un'aliquota pari a 3 ml prelevata dalla emocoltura positiva; centrifugare a 3500 G per 10'; risospendere il pellet in 100 µl di soluzione fisiologica; raccogliere il residuo sul filtro mediante la punta di un tampone e depositarlo in doppio sulla piastrina porta-campione predisposta per il Vitek[®] MS.

Centrifugazione e Semina su piastra (CS)

Dopo avere centrifugato e risospeso in soluzione fisiologica come per CF seminare la sospensione su due piastre di agar sangue; incubare le piastre a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ in atmosfera arricchita di CO_2 ; dopo 3 ore raccogliere mediante tampone la patina di crescita da una piastra e depositarla in doppio sulla piastrina porta-campione; ripetere la stessa operazione con la seconda piastra incubata per 4 ore.

Arricchimento in brodo e Centrifugazione (AC)

Preparare due provette coniche da 15 ml con 9 ml di brodo BHI, inoculare in ognuna 5 gocce di emocoltura positiva; richiudere le provette e miscelare per inversione; incubare le provette a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ in atmosfera aerobia; dopo 1 ora centrifugare una provetta a 3500 G per 10'; risospendere il pellet in 5 ml di soluzione fisiologica; centrifugare a 3500 G per 5'; risospendere nuovamente il pellet in 5 ml di fisiologica e centrifugare a 3500 G per altri 5'; depositare il pellet finale in doppio sulla piastrina porta-campione; ripetere la stessa procedura, dopo 2 ore di incubazione, dalla seconda provetta.

Semina Diretta su piastra (SD)

Depositare 5 gocce dal flacone dell'emocoltura positiva nel medesimo punto di una piastra di agar sangue (semina "a spot"); strisciare poi a tutta piastra, utilizzando un'ansa, una porzione periferica dello spot, come illustrato nella figura 1;

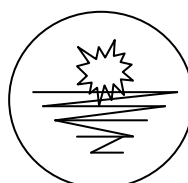


Fig. 1- Schema di semina "a spot"

ripetere tale procedura di semina su altre 3 piastre di agar sangue; incubare le 4 piastre a 36°C ± 1 in atmosfera arricchita di CO₂ protrando l'incubazione rispettivamente per 2, 3, 4 e 5 ore; trascorso ognuno di questi periodi di incubazione rimuovere una piastra e subito dopo raccogliervi mediante tampone la patina di crescita (preferibilmente dalla zona strisciata con l'ansa) depositandola poi in doppio sulla piastrina porta-campione.

Risultati analitici

Per l'elaborazione dei risultati finali sono stati considerati idonei 791 campioni escludendo i casi in cui si era sviluppato un microrganismo anaerobio ovvero un lievito o una crescita polimicrobica non riconosciute all'esame microscopico preliminare. Nella tabella 1 è riportato l'elenco delle specie microbiche complessivamente isolate dai 791 campioni considerati, secondo l'identificazione finale ottenuta dalla coltura su terreno solido incubata *overnight*.

<i>A. baumannii</i>	4	<i>E. faecalis</i>	45
<i>E. aerogenes</i>	7	<i>E. faecium</i>	16
<i>E. cloacae/asburiae</i>	18	<i>S. agalactiae</i>	3
<i>E. coli</i>	198	<i>S. aureus</i>	86
<i>K. pneumoniae</i>	45	<i>S. coagulati-negativi</i>	241
<i>P. aeruginosa</i>	25	<i>S. pneumoniae</i>	17
<i>P. mirabilis</i>	16	<i>Streptococchi α-emolitici</i>	22
Altri Gram-negativi	34	Altri Gram-positivi	14
totale Gram-	347	totale Gram+	444

Tab. 1 - Elenco isolati batterici identificati con metodica standard

I risultati ottenuti con i 9 diversi protocolli di identificazione diretta complessivamente utilizzati (CF, CS a 3 ore, CS a 4 ore, AC a 1 ora, AC a 2

ore, SD a 2 ore, SD a 3 ore, SD a 4 ore e SD a 5 ore) sono stati confrontati con il risultato dell'identificazione ottenuta mediante coltura *overnight* dallo stesso flacone e categorizzati secondo una delle seguenti quattro possibilità:

- 1) Corrispondenza a livello di specie tra le due identificazioni
- 2) Corrispondenza a livello di genere tra le due identificazioni
- 3) Nessuna identificazione o viceversa più di una identificazione possibile fornita dal protocollo sperimentale
- 4) Identificazione errata fornita dal protocollo sperimentale (identificazione univoca ma discordante rispetto a quella ottenuta dalla coltura *overnight* sia a livello di genere che di specie)

Nella tabella 2 e nella figura 2 sono riportati i risultati ottenuti nei confronti di tutti i microrganismi isolati nel corso dello studio con i 9 diversi protocolli analitici sperimentali utilizzati, presentati secondo la categorizzazione sopra descritta.

	CF	CS 3°h	CS 4°h	AC 1°h	AC 2°h	SD 2°h	SD 3°h	SD 4°h	SD 5°h
% ID SPECIE CORRETTE	67,3	71,1	84,3	60,2	69,8	39,8	58,9	72,5	83,6
% ID GENERE CORRETTE	1,8	0,8	1,3	2,3	1,0	1,0	0,8	1,3	1,8
% NO ID/NO ID UNIVOCHÉ	26,9	27,2	13,2	33,5	25,7	55,7	37,0	24,4	13,9
% ID ERRATE	4,1	1,0	1,3	4,0	3,5	3,5	3,3	1,8	0,8

Tab. 2-Risultati complessivi (tutti i microrganismi)

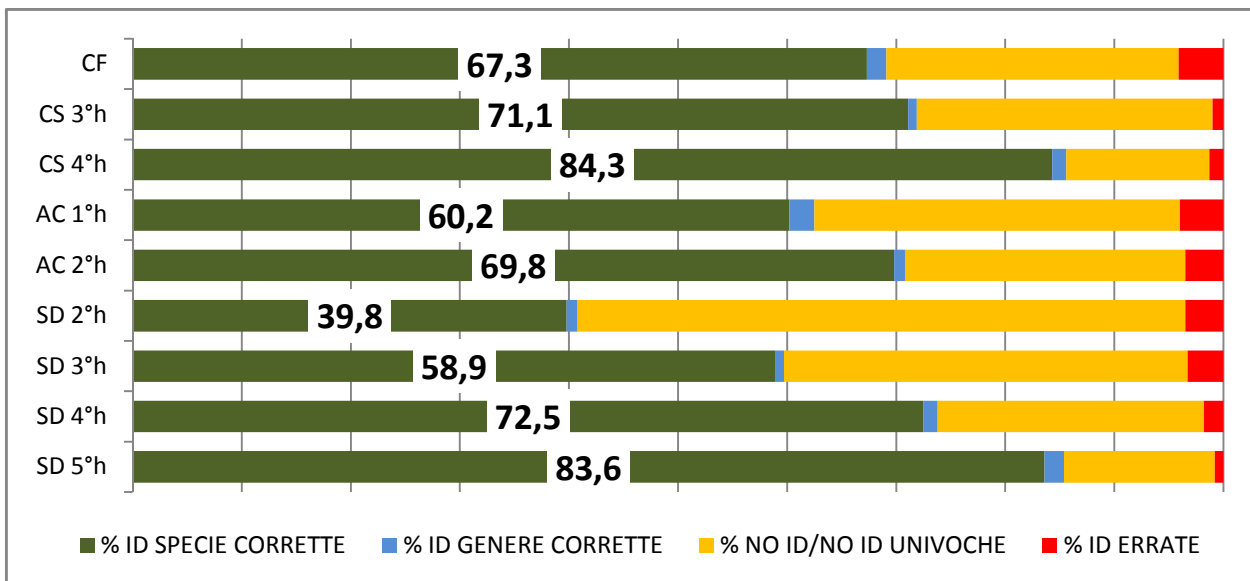


Fig. 2 - Risultati complessivi (tutti i microrganismi)

Le più elevate percentuali di corrette identificazione a livello di specie sono risultate, comprensibilmente, quelle ottenute con i tempi di incubazione più protratti su terreno solido (4 ore per CS e 5 ore per SD).

Per tutti i protocolli sperimentali utilizzati la concordanza con l'identificazione finale da coltura *overnight* è stata sensibilmente migliore nei confronti dei batteri Gram-negativi (tabella 3 e figura 3) piuttosto che nei confronti dei batteri Gram-positivi (tabella 4 e figura 4)

	CF	CS 3^h	CS 4^h	AC 1^h	AC 2^h	SD 2^h	SD 3^h	SD 4^h	SD 5^h
% ID SPECIE CORRETTE	80,8	92,3	97,8	81,1	84,1	65,2	78,7	81,7	89,6
% ID GENERE CORRETTE	1,6	0,5	0,5	1,8	0,6	1,2	0,6	1,2	1,2
% NO ID/NO ID UNIVOCHES	17,0	7,1	1,6	16,5	14,0	29,9	19,5	17,1	8,5
% ID ERRATE	0,5	0,0	0,0	0,6	1,2	3,7	1,2	0,0	0,6

Tab. 3 - Risultati per batteri Gram-negativi

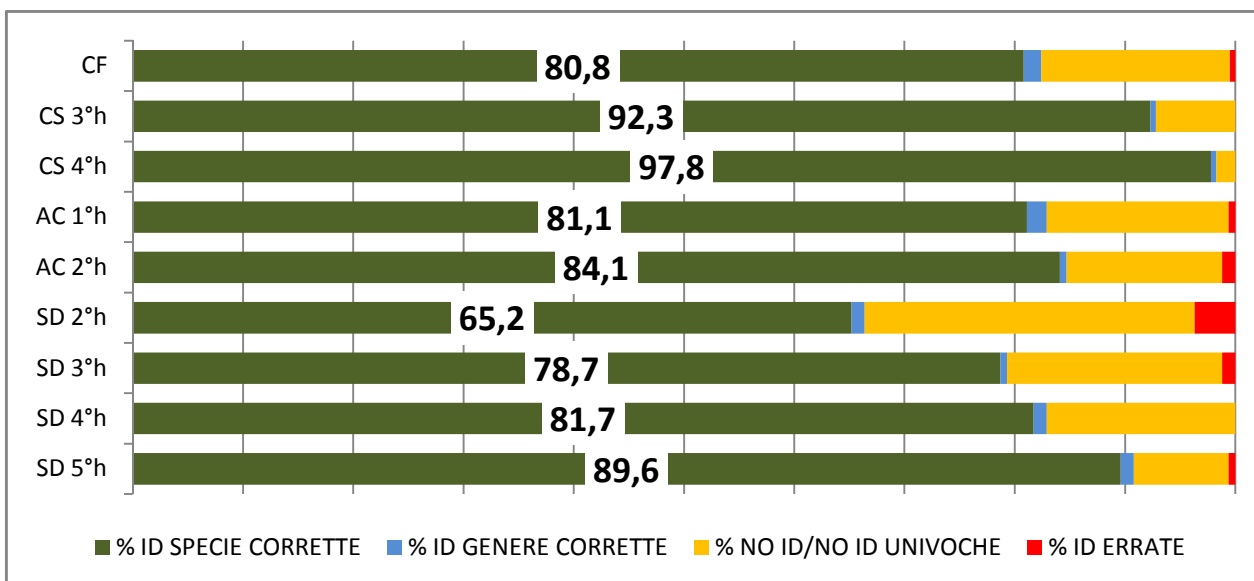


Fig. 3 - Risultati per batteri Gram-negativi

	CF	CS 3 ^h	CS 4 ^h	AC 1 ^h	AC 2 ^h	SD 2 ^h	SD 3 ^h	SD 4 ^h	SD 5 ^h
% ID SPECIE CORRETTE	55,7	52,8	72,6	45,5	59,7	21,9	45,1	66,1	79,4
% ID GENERE CORRETTE	1,9	0,9	1,9	3,4	1,3	0,9	0,9	1,3	2,1
% NO ID/NO ID UNIVOICHE	35,4	44,3	23,1	45,5	33,9	73,8	49,4	29,6	17,6
% ID ERRATE	7,1	1,9	2,4	5,6	5,2	3,4	4,7	3,0	0,9

Tab. 4 - Risultati per batteri Gram-positivi

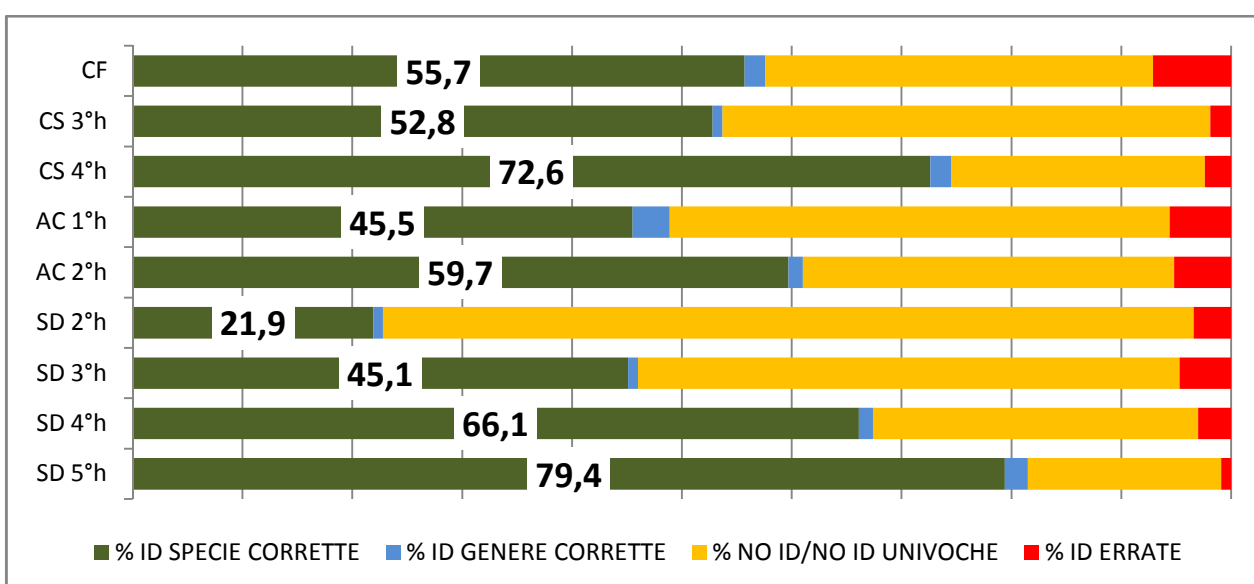


Fig.4 - Risultati per batteri Gram-positivi

Le identificazioni errate fornite dalle diverse metodiche (tabella 5) sono risultate essere complessivamente piuttosto contenute per tutte le metodiche considerate (< 5%) e peraltro nella maggior parte dei casi l'identificazione erroneamente proposta si riferiva ad una specie microbica di riscontro assolutamente inusuale e, come tale, di facile riconoscimento quale esito di scarsa affidabilità.

CF	CS 3°h	CS 4 h	AC 1h	AC 2h
<i>C. neteri</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>B. linens</i> (1)	<i>B. licheniformis</i> (2)	<i>C. koseri</i> (1)
<i>E. coli</i> (1)	<i>E. faecalis</i> (1)	<i>E. aerogenes</i> (1)	<i>C. sakazakii</i> (1)	<i>C. tertium</i> (1)
<i>E. faecalis</i> (3)	<i>K. varians</i> (1)	<i>E. coli</i> (1)	<i>G. sanguinis</i> (1)	<i>L. grayi</i> (3)
<i>L. grayi</i> (2)	<i>S. liquefaciens</i> (1)	<i>E. faecalis</i> (1)	<i>L. grayi</i> (3)	<i>E. coli</i> (1)
<i>M. osloensis</i> (1)		<i>S. liquefaciens</i> (1)	<i>R. dentocariosa</i> (1)	<i>E. faecalis</i> (1)
<i>P. aeruginosa</i> (1)			<i>V. fluvialis</i> (8)	<i>P. shigelloides</i> (1)
<i>P. yeei</i> (1)				<i>S. saprophyticus</i> (1)
<i>S. aureus</i> (2)				<i>S. typhi</i> (1)
<i>S. hyointestinalis</i> (1)				<i>V. fluvialis</i> (4)
<i>S. intermedius</i> (1)				
<i>S. suis</i> (1)				
<i>V. fluvialis</i> (1)				
SD 2h	SD 3h	SD 4h	SD 5h	
<i>C. farmeri</i> (3)	<i>C. freundii</i> (2)	<i>C. freundii</i> (2)	<i>C. sakazakii</i> (1)	
<i>E. billingiae</i> (1)	<i>C. tertium</i> (1)	<i>C. tertium</i> (1)	<i>L. grayi</i> (1)	
<i>G. vaginalis</i> (1)	<i>C. turicensis</i> (1)	<i>L. grayi</i> (2)	<i>Peainibacillus</i> spp (1)	
<i>L. grayi</i> (4)	<i>L. grayi</i> (6)			
<i>P. avidum</i> (1)	<i>S. hominis</i> (1)			
<i>P. shigelloides</i> (1)	<i>V. fluvialis</i> (2)			
<i>V. fluvialis</i> (3)				

Tab. 5 - Identificazioni errate fornite dalle diverse metodiche (in parentesi il numero dei casi)

Di particolare interesse sono stati i risultati ottenuti nei confronti dei 374 isolati appartenenti alle specie microbiche di maggiore rilevanza clinica

(sia per il loro ruolo etiologico, sia per la loro frequente multi-resistenza): *E. coli* (198 isolati), *S. aureus* (86 isolati), *K. pneumoniae* (45 isolati), *P. aeruginosa* (25 isolati), *E. faecium* (16 isolati), *A. baumannii* (4 isolati). Tali risultati, illustrati in figura 5, evidenziano come 6 dei nove protocolli valutati abbiano consentito di ottenere, nei confronti di queste specie microbiche (il cui rapido riconoscimento quali responsabili di una batteriemia può meglio favorire un'appropriate terapia antibiotica) valori di corretta identificazione a livello di specie superiori all'80%.

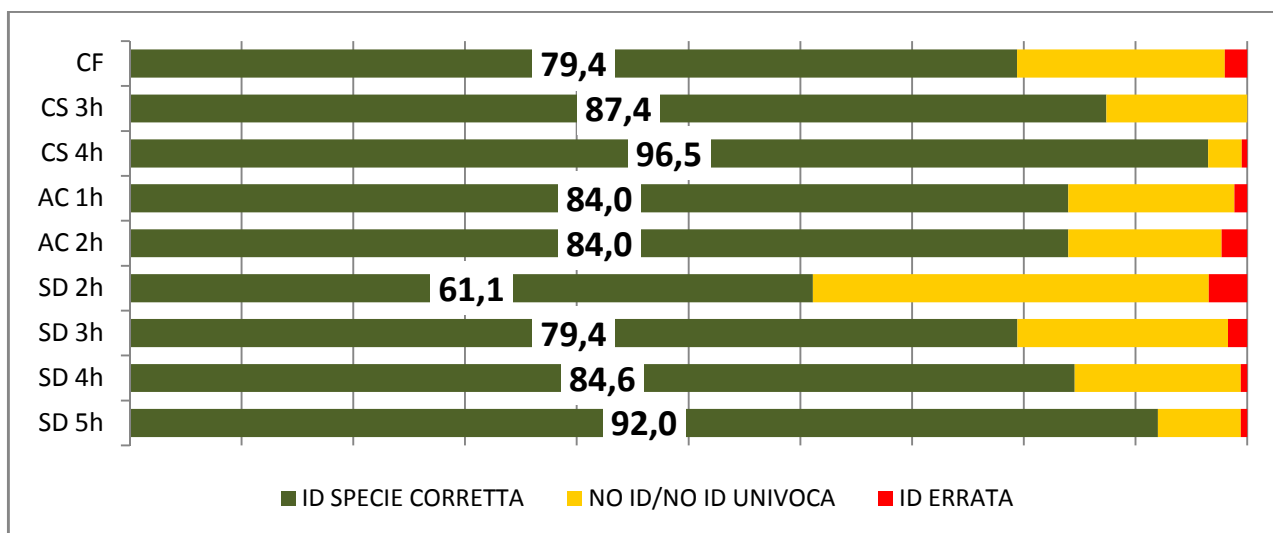


Fig. 5 - Risultati per 374 isolati di *E. coli* (n=198), *S. aureus* (n=86), *K. pneumoniae* (n=45), *P. aeruginosa* (n=25), *E. faecium* (n=16), *A. baumannii* (n=4)

Valutazioni operative

Come indicatore di performance dei diversi protocolli sperimentali di identificazione microbica diretta da emocolture positive può essere considerata la percentuale di identificazioni concordanti, a livello di specie, con l'identificazione ottenuta dalla coltura *overnight*, riportata nella figura 6.

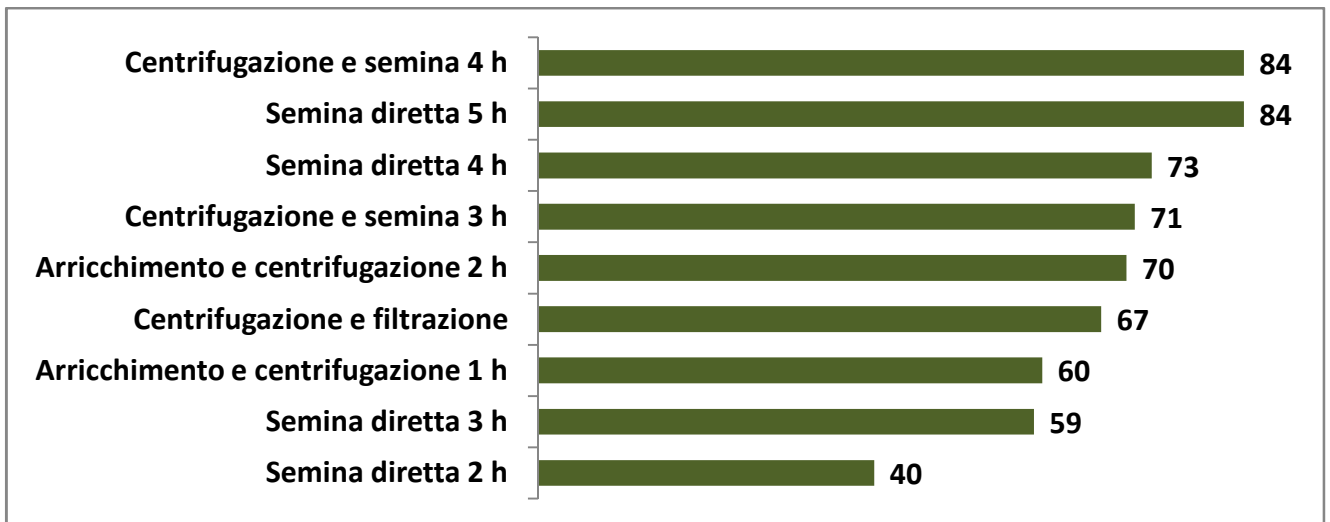


Fig. 6 - **PERFORMANCE** dei diversi protocolli sperimentali (% id. concordanti a livello di specie)

Ovviamente, però, di una metodica da utilizzare quotidianamente, a diverse ore del giorno e spesso su un numero elevato di campioni, devono essere presi in considerazione anche aspetti correlati alla effettiva praticabilità nell'ambito della normale attività diagnostica routinaria. Si è dunque deciso di attribuire un punteggio arbitrario ai diversi protocolli sperimentati, in scala da 1 a 5, riferito ai seguenti parametri: facilità d'uso (fig.7); tempo necessario per l'ottenimento del risultato a partire dall'avvio del protocollo di identificazione diretta (fig.8), impegno complessivo (personale e materiali) di risorse (fig.9).

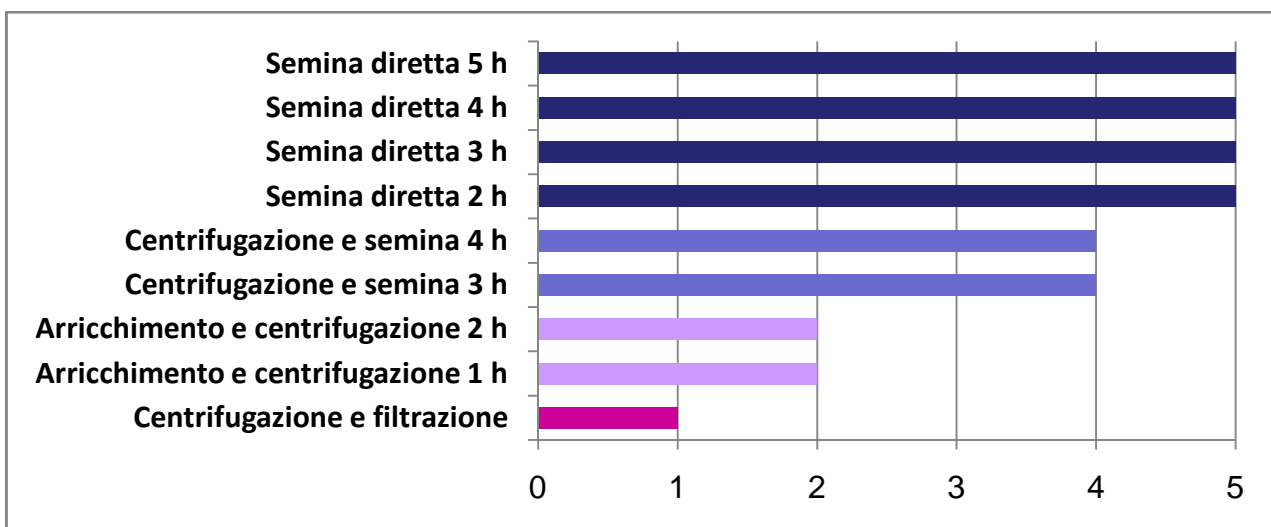


Fig.7 - Punteggi attribuiti per la **FACILITA' D'USO**

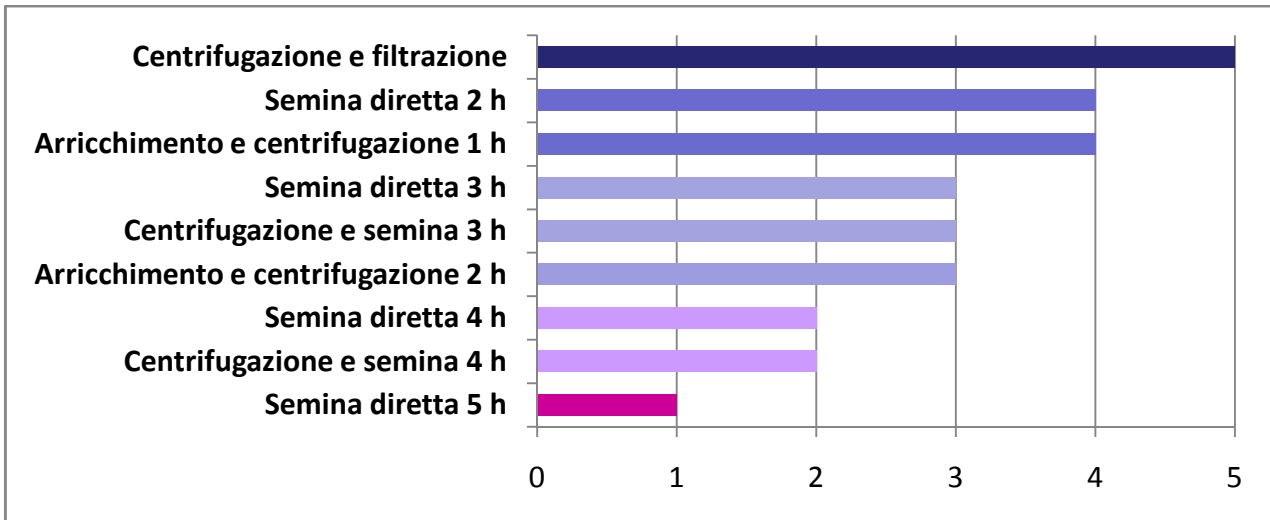


Fig.8 - Punteggi attribuiti per il **TEMPO NECESSARIO ALL'OTTENIMENTO DEL RISULTATO**

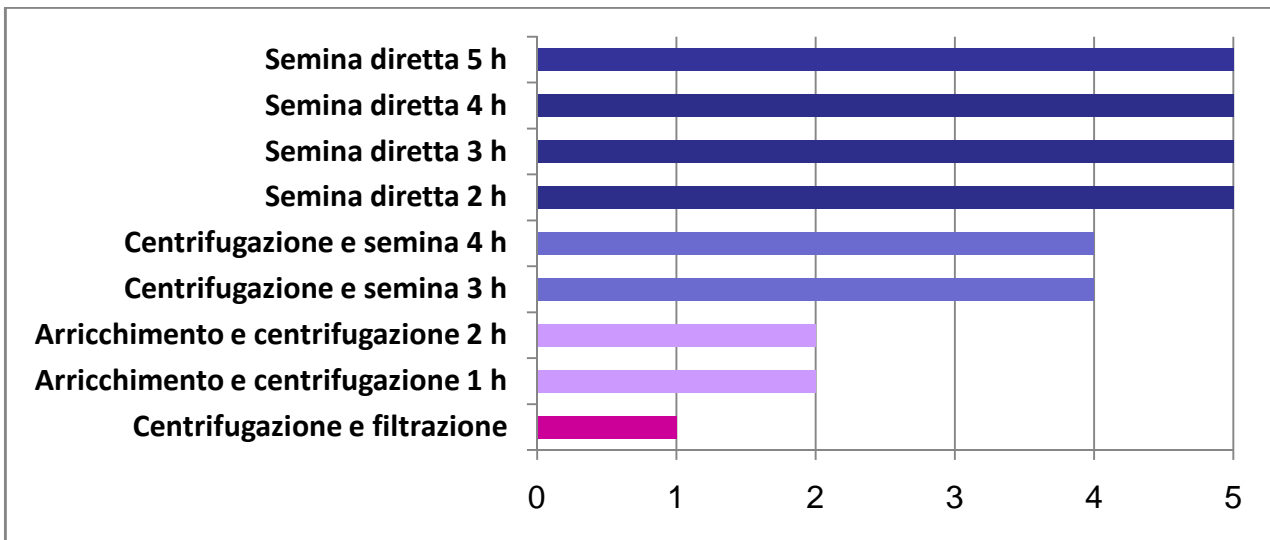


Fig.9 punteggi attribuiti per l' **IMPEGNO DI RISORSE**

Sommando ai risultati di performance dei protocolli di identificazione diretta i relativi punteggi attribuiti per i parametri operativi considerati (*% risultati concordanti a livello di specie + punteggio facilità d'uso + punteggio tempo necessario per il risultato + punteggio impegno risorse*) si è così tentato di ottenere, pur nella consapevolezza dell'arbitrarietà insita nella scelta dei parametri operativi e nell'aggiudicazione dei punteggi, uno *score* complessivo che meglio graduasse la resa dei diversi protocolli in relazione al loro possibile utilizzo routinario.

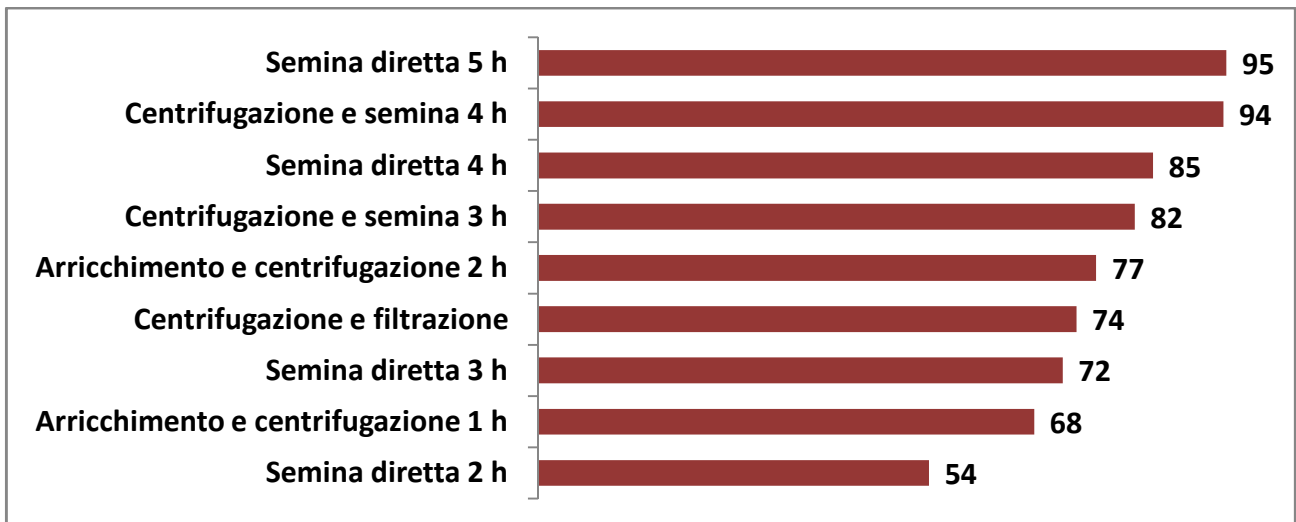


Fig. 10 - SCORE COMPLESSIVO dei diversi protocolli di identificazione diretta

Considerazioni finali

L'utilizzo della tecnologia MALDI-TOF MS per l'identificazione diretta dei batteri aerobi da emocoltura positiva si è confermata essere una possibilità diagnostica di grande interesse, essendo in grado di fornire (soprattutto per le specie microbiche maggiormente critiche sul piano clinico-terapeutico) una importante anticipazione nell'identificazione batterica con livelli di accuratezza adeguati.

Fra i protocolli operativi considerati nella nostra valutazione si sono in particolare dimostrati altamente performanti la *Centrifugazione e Semina* con incubazione del terreno solido per 4 ore e la *Semina Diretta* con incubazione protratta per 5 ore.

Eventuali accorgimenti tecnico-operativi non previsti dal protocollo di studio seguito nella ns. valutazione potrebbero migliorare ulteriormente l'accuratezza dei singoli protocolli. A conclusione dello studio sono stati ad esempio riscontrate, negli stessi centri partecipanti, percentuali di corretta identificazione più elevate con il protocollo *Centrifugazione e*

Filtrazione grazie all'utilizzo di provette da centrifuga dotate di gel separatore.

E' di grande importanza comunque considerare che la scelta fra l'una o l'altra opzione operativa, come spesso si verifica in Microbiologia Clinica, deve anzitutto basarsi sull'attenta valutazione delle esigenze cliniche e delle possibilità tecnico-organizzative locali (orari di servizio, carichi di lavoro...) in quanto il protocollo adottato deve integrarsi in modo efficace nel workflow complessivo del laboratorio.

Ringraziamenti

Per la preziosa collaborazione tecnica ed organizzativa si ringrazia la dott.ssa Gaia Raspini della bioMérieux Italia S.p.A. - *Bagno a Ripoli (Firenze)*

Luglio 2014