

Linea di indirizzo su: l'antibiogramma rapido da emocoltura mediante agar diffusione da dischetto

Razionale

L'aumentata incidenza di infezioni del torrente circolatorio sostenute da microrganismi MDR ha determinato nell'ultimo decennio una grande attenzione alla possibilità di ottenere, mediante metodi fenotipici o genotipici, informazioni rapide in merito a possibili profili di resistenza relativi a batteri sviluppati nell'emocoltura. La possibilità di effettuare un antibiogramma mediante agar diffusione da dischetto direttamente da una emocoltura positiva è da tempo descritta e utilizzata in alcuni laboratori di microbiologia clinica. Il comitato EUCAST da alcuni anni ha validato una metodica standardizzata per l'esecuzione e interpretazione dell'antibiogramma rapido da emocoltura mediante agar diffusione da dischetto utilizzabile per le principali specie microbiche con lettura dopo 4, 6, 8 oppure (dal 12 aprile 2022) 16-20 ore di incubazione.

I primi breakpoint forniti si riferivano a 7 specie microbiche: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Streptococcus pneumoniae*. Nel 2020 sono stati aggiunti i breakpoint per *Acinetobacter baumannii*. Nel corso del 2022 è prevista la pubblicazione di indicazioni relative ad ulteriori specie microbiche.

Rispetto ad altri sistemi in grado di fornire con analoghe tempistiche indicazioni sul pattern di resistenza di batteri isolati dal torrente circolatorio, questo metodo, oltre a risultare di facile esecuzione, presenta alcuni vantaggi:

- è di agevole inserimento nel normale flusso operativo per la processazione di un flacone da emocoltura positivo
- non richiede l'acquisizione e l'utilizzo di dispositivi dedicati
- ha costi molto contenuti.

Conseguentemente, il metodo EUCAST si presta ad essere applicato potenzialmente a tutte le emocolture positive senza necessità di selezionare i singoli casi sulla base di parametri clinici che spesso non sono di immediata disponibilità per il microbiologo.

Aspetti metodologici

Il metodo EUCAST è applicabile a partire da BACTEC (Becton Dickinson), BacT/ALERT (bioMérieux) e VersaTREK (Thermo Fisher) e può essere eseguito entro un intervallo di 0-18 ore dal momento della positivizzazione del flacone. Pur essendo opportuno effettuare l'antibiogramma diretto subito dopo la rimozione del flacone dallo strumento, la permanenza a temperatura ambiente sino a 3 ore non interferisce con i risultati.

La procedura EUCAST prevede i seguenti passaggi:

- dispensare 125±25 µl (3 gocce) dell'emo-brodo-coltura su una o più piastre da 90 mm di agar MH (o MH-F se si sospetta la presenza di *S. pneumoniae*)
- spandere il brodo con la punta di un tampone su tutta la superficie delle piastre
- applicare i dischetti (sino ad un massimo di 6 dischetti per piastra)
- incubare le piastre (vedi Tab. 1)
- effettuare le letture entro ± 5 minuti del tempo di incubazione rapido previsto (4, 6 o 8 ore) oppure quando questo non sia possibile in ragione della chiusura del laboratorio, leggere le piastre dopo 16-20 ore di incubazione
- eventualmente re-incubare le piastre entro 10 minuti per effettuare la lettura al successivo tempo di incubazione previsto (6, 8 oppure 16-20 ore).

Sul piano organizzativo l'antibiogramma diretto dal flacone dell'emocoltura può essere allestito contestualmente alla semina dei terreni solidi e alla preparazione del vetrino per la colorazione di Gram utilizzando un pannello di dischetti standard comprendente sia molecole che possano risultare attive verso bacilli Gram-negativi sia molecole che possano risultare attive verso *S. aureus* o *Enterococchi*.

Microrganismo	Tempo inc.	Terreno	Condizioni inc.
<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	4, 6, 8 o 16-20 ore	MH	35±1 °C in aria ambiente
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	4, 6 o 8 ore	MH	35±1 °C in aria ambiente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6, 8 o 16-20 ore	MH	35±1 °C in aria ambiente
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4, 6, 8 o 16-20 ore	MH-F	35±1 °C in aria + 4-6% CO ₂

Lettura e interpretazione dei risultati

Gli aloni di inibizione, meno evidenti rispetto a quelli che appaiono dopo incubazione “overnight”, possono essere considerati solo quando la crescita sia confluyente e i margini dell’alone siano chiaramente visibili (Fig. 1).

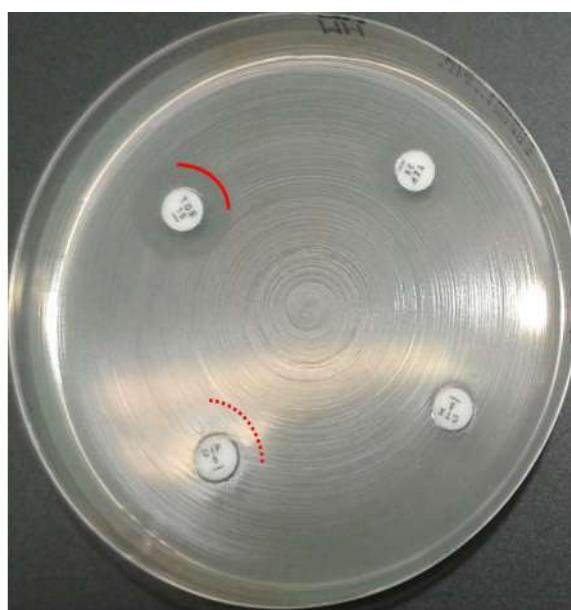


Fig. 1 E. coli dopo 4 ore di incubazione: margine evidente = possibile lettura (linea continua), margine sfumato = lettura non possibile (linea punteggiata).

Eventuali tenui crescite all’interno di un alone ben definito non devono essere considerate.

Per l’interpretazione degli aloni di inibizione devono essere utilizzati i seguenti breakpoint:

E. coli

Antibiotico	Contenuto del disco (µg)	4 ore			6 ore			8 ore			16 - 20 ore		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Piperacillina-tazo.	30-6	17	14-16	14	18	15-17	15	18	15-17	15	17	15-16	15
Cefotaxime	5	15	13-14	13	16	14-15	14	17	15-16	15	16	14-15	14
Ceftazidime	10	15	12-14	12	16	14-15	14	17	15-16	15	17	15-16	15
Ceftazidime-avi.	10-4	12	10-11	10	12	10-11	10	12	10-11	10	13	11-12	11
Ceftolozane-tazo.	30-10	16	14-15	14	18	16-17	16	18	16-17	16	20	16-19	16
Imipenem	10	16	12-15	12	17	13-16	13	17	13-16	13	17	12-16	12
Meropenem	10	17	15-16	15	17	15-16	15	17	15-16	15	15	13-14	13
Ciprofloxacina	5	17	14-16	14	19	16-18	16	20	17-19	17	21	18-20	18
Levofloxacina	5	16	14-15	14	18	15-17	15	18	15-17	15	23	15-22	15
Amikacina	30	15	13-14	13	15	13-14	13	15	13-14	13	13	11-12	11
Gentamicina	10	14	12-13	12	14	12-13	12	14	12-13	12	13	11-12	11
Tobramicina	10	14	12-13	12	15	13-14	13	15	13-14	13	13	11-12	11
Trimethoprim-sulf.	1.25-23.75	12	10-11	10	14	12-13	12	14	12-13	12	14	12-13	12

K. pneumoniae

Antibiotico	Contenuto del disco (µg)	4 ore			6 ore			8 ore			16 - 20 ore		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Piperacillina-tazo.	30-6	15	13-14	13	16	14-15	14	16	14-15	14	17	15-16	15
Cefotaxime	5	15	12-14	12	18	15-17	15	18	15-17	15	16	14-15	14
Ceftazidime	10	15	13-14	13	16	14-15	14	16	14-15	14	18	15-17	15
Ceftazidime-avi.	10-4	12	10-11	10	13	11-12	11	13	11-12	11	14	12-13	12
Ceftolozane-tazo.	30-10	16	14-15	14	16	14-15	15	17	15-16	15	20	17-19	17
Imipenem	10	16	14-15	14	17	15-16	15	17	15-16	15	15	12-14	12
Meropenem	10	15	13-14	13	17	15-16	15	17	15-16	15	15	13-14	13
Ciprofloxacina	5	17	15-16	15	18	16-17	16	18	16-17	16	19	17-18	17
Levofloxacina	5	17	14-16	14	18	15-17	15	18	15-17	15	18	15-17	14
Amikacina	30	15	13-14	13	14	12-13	12	14	12-13	12	15	13-14	13
Gentamicina	10	14	12-13	12	14	12-13	12	13	11-12	11	14	13	13
Tobramicina	10	14	12-13	12	13	11-12	11	13	11-12	11	14	13	13
Trimethoprim-sulf.	1.25-23.75	11	9-10	9	11	9-10	9	11	9-10	9	10	8-9	8

P. aeruginosa

Antibiotico	Contenuto del disco	6 ore	8 ore	16 - 20 ore
-------------	---------------------	-------	-------	-------------

	(µg)	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	S ≥	ATU	R <	R <
Piperacillina-tazo.	30-6	50	13-15	13	50	14-16	14	50 ¹	15-16 ¹	15 ¹
Cefepime	30	50	15-16	15	50	15-16	15	50	17	17
Ceftazidime	10	50	12-14	12	50	13-15	13	50	14	14
Ceftazidime-avi.	10-4	14	13-14	13	16	14-15	14	18	15-17	15
Ceftolozane-tazo.	30-10	15	14	14	16	15	15	-	18-50	18
Imipenem	10	50	15-16	15	50	15-16	15	50 ¹	16 ¹	16 ¹
Meropenem	10	16	14-15	14	16	14-15	14	16 ¹	15 ¹	15 ¹
Ciprofloxacina	5	50	17-18	17	50	20-21	20	50	20-22	20
Levofloxacina	5	50	14-15	14	50	15-16	15	50	15-16	15
Amikacina	30	15	13-14	13	14	13	13	12	11	11
Tobramicina	10	14	13	13	15	14	14	14	13	13

¹ non considerare eventuali colonie cresciute all'interno dell'alone di inibizione quando si effettua la lettura dopo 16-20 ore

A. baumannii

Antibiotico	Contenuto del disco (µg)	4 ore			6 ore			8 ore		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Imipenem	10	18	16-17	16	19	17-18	17	19	17-18	17
Meropenem	10	15	12-14	12	17	15-16	15	18	16-17	16
Ciprofloxacina	5	50	14-15	14	50	15-16	15	50	16-17	16
Levofloxacina	5	17	15-16	15	18	16-17	16	19	17-18	17
Amikacina	30	-	≥13	13	16	14-15	14	16	14-15	14
Gentamicina	10	14	12-13	12	14	12-13	12	15	13-14	13
Tobramicina	10	14	12-13	12	14	12-13	12	14	12-13	12
Trimethoprim-sulf.	1.25-23.75	13	≤12	-	13	10-12	10	13	10-12	10

S. aureus

Antibiotico	Contenuto del disco (µg)	4 ore			6 ore			8 ore			16 - 20 ore		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Cefoxitin (screening)	30	16	15	15	18	17	17	19	18	18	22	21	21
Norfloxacin (screening)	10	13	11-12	11	14	13	13	15	14	14	16	15	15
Amikacina	30	12	11	11	13	12	12	14	13	13	14	12-13	12
Tobramicina	10	14	12-13	12	15	13-14	13	15	13-14	13	16	14-15	14
Gentamicina	10	15	13-14	13	16	14-15	14	16	14-15	14	16	14-15	14
Clindamicina	2	16	14-15	14	19	16-18	16	19	16-18	16	19	16-18	16

E. faecalis

Antibiotico	Contenuto del disco	4 ore	6 ore	8 ore
-------------	---------------------	-------	-------	-------

	(µg)	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Ampicillina	2	9	6-8	-	9	6-8	-	9	6-8	-
Imipenem	10	50	6-13	-	50	6-14	-	50	6-15	-
Vancomicina	5	-	10-50	10	-	10-50	10	-	10-50	10
Linezolid	10	17	14-16	14	17	14-16	14	17	14-16	14

E. faecium

Antibiotico	Contenuto del disco (µg)	4 ore			6 ore			8 ore		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Ampicillina	2	10	8-9	8	10	8-9	8	10	8-9	8
Imipenem	10	-	18-50	18	-	18-50	18	-	18-50	18
Vancomicina	5	-	12-50	12	-	13-50	13	-	13-50	13
Linezolid	10	-	-	-	20	17-19	17	19	17-18	17

S. pneumoniae

Antibiotico	Contenuto del disco (µg)	4 ore			6 ore			8 ore			16 - 20 ore		
		S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Oxacillina (screening)	1	16	14-15	14	19	17-18	17	20	18-19	18	19	18	18
Norfloxacin (screening)	10	11	9-10	9	12	10-11	10	12	10-11	10	13	11-12	11
Erithromicina	15	19	17-18	17	19	17-18	17	19	17-18	17	24	22-23	22
Clindamicina	2	17	15-16	15	17	15-16	15	17	15-16	15	12	11	11
Trimethoprim-sulf.	1.25-23.75	12	10-11	10	12	10-11	10	12	10-11	10	11	9-10	9

Quando l'alone di inibizione rientra nel range **ATU (area di indeterminatezza tecnica)** oppure quando non si riesca ad effettuare la lettura in modo sicuro è indicato non refertare la categoria di interpretazione, eventualmente aggiungendo un commento che rimanda la valutazione ad una lettura effettuata in un momento successivo oppure mediante altra metodica.

Le molecole utilizzabili solo come **test di screening** consentono le seguenti interpretazioni:

- Cefoxitina per *S. aureus*: isolati negativi allo screening (S) possono essere refertati come S a tutti i beta-lattamici (per cefotaxime e ceftriaxone "sensibile ad alta esposizione"); isolati positivi allo screening (R) possono essere considerati verosimilmente meticillino-resistenti e dunque refertati R a tutti i beta-lattamici ad eccezione di ceftarolina e ceftobiprol.

- Norfloxacin per *S. aureus*: isolati negativi allo screening (S) possono essere refertati come S a moxifloxacin e I (sensibile ad alta esposizione) a ciprofloxacin e levofloxacin; isolati positivi allo screening (R) possono essere riportati come R alle stesse molecole.

- Oxacillin per *S. pneumoniae*: isolati negativi allo screening (S) possono essere refertati come S tutti i beta-lattamici; isolati positivi allo screening (R) devono essere refertati R alla penicillin, nel caso l'alone sia ≥ 9 mm però possono essere refertati S ad ampicillin, amoxicillin e piperacillin con o senza inibitore, cefotaxime e ceftriaxone, inipenem e meropenem.

- Norfloxacin per *S. pneumoniae*: isolati negativi allo screening (S) possono essere refertati come S a moxifloxacin e I (sensibile ad alta esposizione) a levofloxacin; isolati positivi allo screening (R) possono essere riportati come R alle stesse molecole.

Riferimenti:

- Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. Version 2.0 January 2022

- EUCAST Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. Version 5.0, 12-4-2022.

<http://www.eucast.org>.

Questo documento è stato elaborato da **Mario Sarti** e condiviso dai componenti del **CoSA** (Francesco Luzzaro, Gioconda Brigante, Nicoletta Corbo, Tommaso Giani, Roberta Migliavacca, Mario Sarti, Claudio Scarparo, Teresa Spanu) e del **GLACSA** (Mario Sarti, Fabio Arena, Giulia De Angelis, Floriana Campanile, Floriana Gona, Luigi Principe, Claudia Venturelli, Chiara Vismara)