



Verein für **medizinische Qualitätskontrolle**

Association **pour le contrôle de Qualité medical**

Associazione **per il controllo di qualità medico**

Commento al controllo circolare B9 microbiologia 2023-1

Campione A: Urina getto intermedio/infezione delle vie urinarie

Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie) + Esame delle resistenze

Il campione conteneva *Staphylococcus saprophyticus*, identificato correttamente da quasi tutti i partecipanti. Si tratta di un frequente agente di infezioni non complesse delle vie urinarie in giovani donne non ricoverate in ospedale.

S. saprophyticus è uno stafilococco coagulasi negativo resistente a novobiocina. EUCAST ha definito specificatamente per la determinazione di penicillinasi in *S. saprophyticus* l'uso di dischetti di ampicillina da 2 µg. L'alone misurava 23 mm, che corrisponde a sensibilità. I dischetti di penicillina non vanno usati in *S. saprophyticus*, pertanto questi risultati non sono stati valutati. Un ceppo di *S. saprophyticus* sensibile ad ampicillina con alone ≥ 18 mm è mec-A negativo e sensibile anche ad amoxicillina e piperacillina (con o senza inibitori della beta-lattamasi).

La commissione antibiogrammi Svizzera (SAC) sosteneva fino al 2023 che anche negli stafilococchi coagulasi negativi era possibile usare i dischetti di penicillina per determinare con sicurezza la beta lattamasi (penicillinasi) ed indicare la resistenza a penicillina, ampicillina/amoxicillina e piperacillina, e che ceppi con un alone oltre i 26 mm e con bordo sfuocato possono essere riportati come sensibili. Per EUCAST, questo è valido solo per *Staphylococcus aureus*, mentre per *Staphylococcus lugdunensis* EUCAST definisce solo il limite di 26 mm senza accennare al bordo sfuocato. Secondo la nostra decennale esperienza, anche per questo battere l'aspetto del bordo è facilmente valutabile. Come abbiamo invece fatto notare già in precedenza, la valutazione del bordo può risultare difficile per *S. saprophyticus*; per fortuna per questo battere EUCAST prevede ancora l'esame delle resistenze ad ampicillina, un antibiotico che viene inoltre spesso impiegato per combattere infezioni non complesse delle vie urinarie.

In una recente riunione della SAC il 31.3.2023 è stato deciso di adottare le direttive EUCAST, considerato che diversi laboratori hanno difficoltà nel valutare il bordo degli aloni da penicillina. Quindi in futuro penicillina ed ampicillina non verranno più valutate per gli stafilococchi, ad eccezione dei sopraindicati *S. aureus*, *S. lugdunensis* e *S. saprophyticus* per cui si accetterà solo ampicillina.

S. saprophyticus possiede una MIC naturalmente elevata per oxacillina, ma valori superiori a 2 mg/L (come anche in *S. aureus* e *S. lugdunensis*) indicano una resistenza a meticillina. Questa viene però in genere dedotta da cefoxitina e non da oxacillina. È da notare che nei test a dischetti con *S. saprophyticus* valgono gli stessi valori limite per cefoxitina come in *S. aureus* e negli altri stafilococchi coagulasi negativi (≥ 22 mm sensibile, ≤ 21 mm resistente). In *S. saprophyticus*, una MIC > 8 mg/L è una resistenza a meticillina – mentre in *S. aureus* e *S. lugdunensis* valori > 4 mg/L sono già indicatori di resistenza. Il ceppo del campione era sensibile a cefoxitina e quindi anche a cefalosporine. Quando si deriva la sensibilità a cefalosporine da quella a cefoxitina, si può riportare per cefotaxime e ceftriaxone solo sensibilità a dose elevate, si prega di consultare le direttive EUCAST in questi casi.

Per ciprofloxacina e levofloxacina si applica il dosaggio elevato in caso di sensibilità. L'analisi con ofloxacina non è stata valutata perché consigliata da EUCAST solo per uso topico. Come previsto, *S. saprophyticus* ha una resistenza intrinseca a fosfomicina, mentre la furantoina è consigliata specificamente nelle infezioni delle vie urinarie. L'acido fusidinico non è da testare su *S. saprophyticus* da campioni di urina. Il ceppo era resistente ad eritromicina e sensibile a clindamicina, ma fenotipicamente non aveva una resistenza MRS inducibile. La clindamicina viene impiegata nelle terapie della pelle e dei tessuti molli ma non in infezioni delle vie urinarie. Pertanto, l'indicazione di MRS come meccanismo di resistenza non è stata valutata. Sussisteva sensibilità agli aminoglicosidi, EUCAST li riporta fra parentesi, vedi il commento al campione B.

Anche l'analisi di glicopeptidi (vancomicina e teicoplanina) non è molto sensata nelle infezioni delle vie urinarie, ma offre l'occasione di discutere un'altra discrepanza fra SAC ed EUCAST.

Il test a dischetti non è sufficiente per la determinazione della sensibilità degli stafilococchi alla vancomicina, i risultati si basavano sulla misura della MIC. Abbiamo però consigliato, insieme alla SAC, di utilizzare i dischetti di teicoplanina come screening per non dovere accertare sempre anche la MIC. Considerato che anche CLSI non fornisce più valori per gli aloni di teicoplanina con gli stafilococchi, è stato deciso alla riunione **che anche per l'analisi delle resistenze degli stafilococchi a teicoplanina la SAC adotta le direttive EUCAST. Consigliamo la MIC solo per determinare la resistenza a glicopeptidi negli stafilococchi.**

Identificazione	Quantità
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	54
<i>Staphylococcus hominis</i>	1

Campione B: Segreto tracheale/polmonite associata a ventilatore meccanico

Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie) + Esame delle resistenze

Il campione conteneva *Serratia marcescens*, un tipico germe ambientale frequentemente presente nelle acque superficiali che può condurre a infezioni nosocomiali. L'identificazione riusciva facilmente con Maldi-TOF, Api 20E e test biochimici. *S. marcescens* è distinguibile da *S. liquefaciens* nel metabolismo dello xilosio, che è ossidativo in *S. marcescens* e fermentativo in *S. liquefaciens*. Il test mostra una colorazione gialla dopo 24 ore di incubazione in provette di xilosio con e senza uno strato di olio di paraffina. *S. marcescens*, *Serratia nematodiphila* e *Serratia ureilytica* danno spettri molto simili e non possono essere distinti in MALDI-TOF. Abbiamo attestato il punteggio massimo per tutte le diagnosi di *Serratia*.

S. marcescens possiede una beta-lattamasi di tipo AmpC intrinseca. L'indicazione di AmpC come meccanismo di resistenza era necessario per ottenere il punteggio massimo. Secondo le Expert Rules di EUCAST è però necessario avvisare sulla possibilità di uno sviluppo di resistenze, o selezione di mutanti resistenti, a cefalosporine della 3° generazione. Invece non è obbligatorio indicare resistenza se il ceppo è sensibile a ceftriaxone, ceftazidime e cefotaxime, con la conseguenza che vengono prescritti subito carbapenemi stimolando così lo sviluppo di resistenze, che si basano non solo su carbapenemasi ma anche su alterazione della membrana cellulare. L'analisi di piperacillina/tazobactam ha fornito valori intorno al breakpoint, per cui abbiamo accettato tutti i risultati.

S. marcescens possiede una resistenza intrinseca ad ampicillina/amoxicillina, amoxicillina/acido clavulanico, cefalosporine della 1a e 2a generazione, colistina e nitrofurantoina. La nuova terminologia EUCAST non parla più di resistenza intrinseca ma di resistenza prevista. Sulle tabelle EUCAST, sotto ai nomi delle specie batteriche, oppure sulla homepage di EUCAST a livello della banda laterale sinistra, è possibile cliccare su «Expert Rules and Expected Phenotypes» e scaricare direttamente i due documenti con le regole e con le definizioni. In genere, la parola «intrinseco» non viene più utilizzata, al suo posto si usa «previsto fenotipo resistente» quando più del 90% di una specie mostra una MIC per un certo antibiotico superiore al valore MIC farmacocinetico e farmacodinamico di sensibilità (non specie-specifico).

I valori clinici per gli aminoglicosidi sono stati rielaborati da EUCAST nel 2019 e per le enterobatteriacee valgono solo in caso di infezioni delle vie urinarie; per altre infezioni sono posti fra parentesi. Questo significa in genere che l'antibiotico in questione va usato solo in infezioni sistemiche e in combinazione con altri. Anche per *S. saprophyticus* del campione A gli aminoglicosidi sono riportati fra parentesi. Questi valori fra parentesi corrispondono in pratica ai valori ECOFF o ad un compromesso ECOFF fra specie dello stesso genere. Le Expert Rules precedenti per gli aminoglicosidi sono state eliminate dalle direttive per diversi motivi; data questa insicurezza, non abbiamo valutato l'analisi degli aminoglicosidi in questo campione.

Identificazione	Quantità
<i>Serratia marcescens</i>	50
<i>Serratia nematodiphila</i>	1
<i>Serratia marcescens</i> complesso	1
<i>Serratia marcescens</i> gruppo	2

Burkholderia pseudomallei

1

Campione C: Emocoltura/batteriemia, 1 di 4 bottiglie**Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie)**

Pseudomonas stutzeri, un bacillo gram-negativo non fermentante, è stato identificato dalla maggior parte dei partecipanti, sebbene l'identificazione con MALDI-TOF non sia facile e API NE abbia fornito come primo risultato *Ralstonia pickettii*. Riusciva invece con la carta GN-Vitek.

Sia *P. stutzeri* che *R. pickettii* sono molto comuni nell'ambiente, colonizzano diversi ecosistemi e sono stati descritti come agenti opportunistici dell'Uomo. Possono causare pseudo batteriemie dovute ad infusioni contaminate e infezioni nosocomiali. Molti lavori su questo tema sono stati pubblicati usando la nomenclatura precedente *Pseudomonas pickettii*. Inoltre, entrambi possono formare colonie ripiegate e asciutte. Anche la diagnosi *R. pickettii* ha ottenuto un punto.

Desideriamo però sottolineare alcune differenze che si notano con i test convenzionali. Entrambi i bacilli sono gram negativi, ossidasi positivi, non fermentanti e senza pioverdina, sono negative anche la formazione di H₂S e la produzione di indolo. Queste analisi sono elencate nell'11^{ima} edizione del Manual of Clinical Microbiology der American Society of Microbiology come criteri essenziali nel riconoscimento dei gram negativi non fermentanti. Inoltre, i seguenti test sono elencati nel capitolo 33: «Approaches to the identification of aerobic Gram-negative bacteria», di G. Wauters e M. Vaneechoutte, per distinguere *P. stutzeri* da *R. pickettii*:

Reazione	<i>P. stutzeri</i>	<i>R. pickettii</i>
Pirrolidonil aminopeptidasi (PYR)	negativa	positiva
Colistina	sensibile	resistente
Ureasi	negativa	positiva/ a volte ritardata
Crescita su NaCl 4%	no	sì

Identificazione	Quantità
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	47
<i>Pseudomonas stutzeri</i> gruppo	4
<i>Pseudomonas stutzeri</i> complesso	1
<i>Ralstonia pickettii</i>	2
Nessun risultato	1

Campione D: Artrocentesi / Bursitis olecrani**Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie)**

Il campione conteneva *Trueperella pyogenes*, un bacillo in grado, come dice il nome, di causare infezioni purulente. Era conosciuto da tempo come agente in bovini, capre e suini. Uno sguardo alla storia della nomenclatura documenta l'origine del nome di *T. pyogenes*: negli anni 80, *Corynebacterium pyogenes* fu ribattezzato *Actinomyces pyogenes* (Collins MD and D. Jones (1982) Reclassification of *Corynebacterium pyogenes* (Glage) in the genus *Actinomyces*, as *Actinomyces pyogenes* comb. nov. J Gen Microbiol 128: 901-903) e *Corynebacterium haemolyticum* fu ribattezzato *Arcanobacterium haemolyticum* (Collins MD, D Jones, GM Schofield (1982) Reclassification of 'Corynebacterium haemolyticum' (MacLean, Liebow & Rosenberg) in the genus *Arcanobacterium* gen. nov. as *Arcanobacterium haemolyticum* nom. rev., comb. nov. J Gen Microbiol 128: 1279-1281).

Actinomyces pyogenes era distinguibile da *A. haemolyticum* testando l'agglutinazione con anticorpi contro gli streptococchi del gruppo G. Come in questi ultimi, anche la reazione della β -glucuronidasi è positiva in *A. pyogenes*. Con il cambio di nomenclatura, alcune informazioni semplici possono andare perse. Insieme a MD Collins da Reading, UK sono stati descritti, all'istituto di microbiologia medica dell'università di Zurigo, ceppi isolati da ascessi che dal punto di vista biochimico erano molto simili ad *A. pyogenes*, ma che non reagivano agli anticorpi contro gli streptococchi del gruppo G ed invece reagivano debolmente al test CAMP. Furono considerati quindi come *Actinomyces pyogenes*-like e ribattezzati con referenze a Zurigo e Reading nella sottospecie: J. Wüst, S. Stubbs, N. Weiss, G. Funke, MD Collins (1995) Assignment of *Actinomyces pyogenes*-like (CDC coryneform group E) bacteria to the genus *Actinomyces* as *Actinomyces radingae* sp. nov. and *Actinomyces turicensis* sp. nov. Lett Appl Microbiol 20: 76-81).

Negli anni 90, MD Collins ribattezzò *A. pyogenes* e altre specie di actinomiceti in *Arcanobacterium* spp, basandosi sulle sequenze del rRNA 16S. (Ramos CP, G Foster, MD Collins (1997) Phylogenetic analysis of the genus *Actinomyces* based on 16S rRNA gene sequences: description of *Arcanobacterium phocae* sp. nov., *Arcanobacterium bernardiae* comb. nov., and *Arcanobacterium pyogenes* comb. nov. Int J Syst Bacteriol 47:46-53). In seguito però *A. pyogenes* e *A. bernardiae* subirono un nuovo cambiamento di nome in *Trueperella pyogenes* e *Trueperella bernardiae* (Yassin AF, H Hupfer, C Siering, P Schumann (2011) Comparative chemotaxonomic and phylogenetic studies on the genus *Arcanobacterium* Collins et al. 1982 emend. Lehtinen et al. 2006: proposal for *Trueperella* gen. nov. and emended description of the genus *Arcanobacterium*. Int J Sys Evol Microbiol 61: 1265–1274).

L'identificazione riusciva bene con MALDI-TOF; ApiCoryne dava *T. pyogenes* al 99.9% con un valore T di 0.58. La fermentazione dello xilosio permetteva di distinguerlo da *T. bernardiae* e *A. haemolyticum*. Su agar sangue ovino erano visibili colonie emolizzanti e il CAMP test era negativo. *A. haemolyticum* invece causa una reazione inversa al CAMP test, cioè induce un'emolisi ridotta da parte di *S. aureus*, e *T. bernardiae* fermenta il maltosio meglio del glucosio.

Identificazione	Quantità
<i>Trueperella pyogenes</i>	54
Nessun risultato	1

Campione E: Materiale da port (catetere) / infezione correlata a port

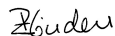
Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie)

Gli streptococchi coagulasi negativi costituiscono la gran parte della flora cutanea umana. Uno studio del 2020 calcola che anche *Staphylococcus saccharolyticus* è più comune di quanto supposto come colonizzatore cutaneo <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32718033/>. Una pubblicazione del 1978 con il nome precedente *Peptococcus saccharolyticus* attesta la stessa osservazione (Evans CA et al. (1978), J Clin Microbiol 7: 261-4). La presenza sulla cute può portare ad infezioni correlate a corpi estranei. L'identificazione è riuscita a quasi tutti i partecipanti.

S. saccharolyticus è un cocco gram positivo anaerobio che cresce in gruppi o tetradi. In condizioni ottimali, alcune sottocolture possono crescere debolmente anche in condizioni aerobie. La resistenza a metronidazolo in cocchi gram positivi anaerobi è convenzionalmente la chiave identificatrice.

Identificazione	Quantità
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	53
<i>Staphylococcus species</i>	1
Nessun risultato	1

Distinti saluti

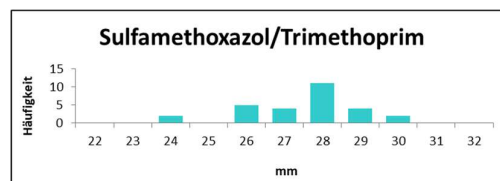
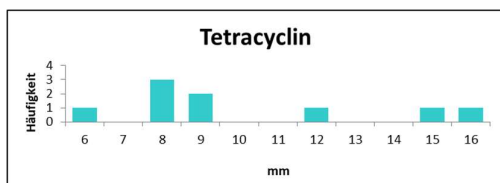
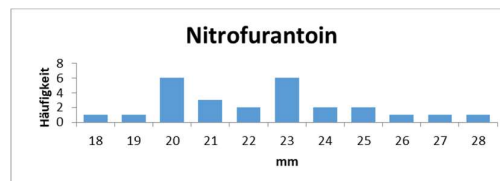
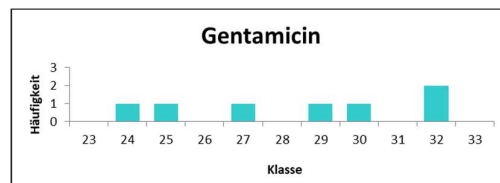
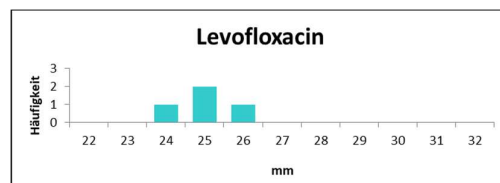
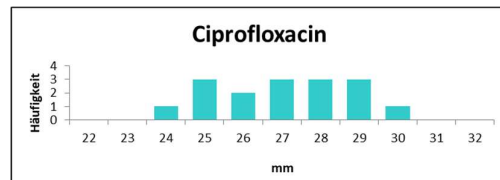
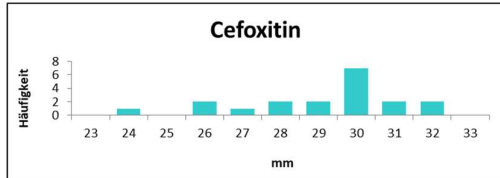
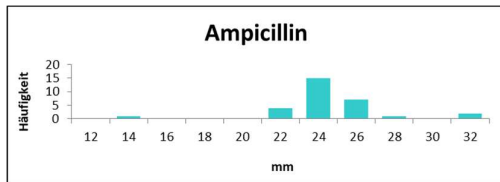


Prof. Dr. R. Zbinden



F.S. Hufschmid-Lim

Esame delle resistenze campione A



Esame delle resistenze campione B

