



Verein für **medizinische Qualitätskontrolle**
Association **pour le contrôle de Qualité medical**
Associazione **per il controllo di qualità medico**

Commento al controllo circolare B9 microbiologia 2023-4

Campione A: Espettorato / polmonite

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

L'identificazione di pneumococchi nel campione di espettorato è riuscita a tutti i partecipanti. I bacilli erano dissolubili in acido biliare e sensibili ad optochina. Su agar sangue ovino crescevano dopo 18-24 ore in colonie verdastre e viscidose. Il ceppo era sensibile a penicillina e ad altri antibiotici beta-lattamici.

Secondo EUCAST, lo screening di resistenza a beta-lattami va condotto con dischetti di oxacillina da 1 µg o con la determinazione della MIC di penicillina; lo screening è negativo se oxacillina causa un alone ≥ 20 mm o se la MIC di penicillina è ≤ 0.06 mg/L. In questo modo si evidenzia in modo affidabile la presenza di eventuali proteine modificate leganti la penicillina, che abbassano la sensibilità. Tuttavia, i risultati con oxacillina non vanno riportati al cliente, perché si tratta di un test di resistenza indiretto. Nella tabella dei breakpoint di EUCAST (EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 13.1, valid from 2023-06-29), a pagina 57 si trova un diagramma esplicativo per l'interpretazione dello screening della resistenza a beta-lattami in *Streptococcus pneumoniae*.

La sensibilità a fluorochinoloni può essere derivata da quella a norfloxacina, che però viene usata solo come antibiotico di screening e non va prescritta come terapia nelle infezioni da pneumococco. Secondo EUCAST per ciprofloxacina va riportata resistenza negli pneumococchi. Per levofloxacina va riportata solo la sensibilità ad alte dosi «I» (increased exposure). Se il ceppo risulta resistente a norfloxacina, la sensibilità a levofloxacina o moxifloxacina va testata separatamente. I partecipanti che hanno riportato sensibilità «S» a levofloxacina hanno ottenuto solo metà punteggio.

Il test con gentamicina non è stato valutato: per gli aminoglicosidi, compresa gentamicina high level, negli pneumococchi non esistono breakpoint EUCAST e vanno riportati quindi come resistenti, o non riportati affatto.

Identificazione	Quantità
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	55

Campione B: Emocoltura/sepsi

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

Il campione da emocoltura conteneva *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierotipo Chester (ovvero *Salmonella* Chester), una salmonella enterica del sierogruppo B. Con MALDI-TOF, test biochimici e VITEK2 si otteneva solo un'identificazione a livello del genere.

Nei test di agglutinazione, i seguenti antisieri reagivano positivamente: Anti-Poli A-E, Anti-Poli H e anti-O:4 (gruppo B). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierotipo Chester si isola in tutto il mondo da campioni di varie specie animali e di alimenti, ma non si identifica spesso nei monitoraggi di focolai umani: meno dello 0.1% di tutti i casi di salmonellosi annuali in Europa, secondo ECDC. Abbiamo accettato tutti i risultati che indicavano *Salmonella* sp., ma ricordiamo che andrebbe almeno escluso che si tratti di salmonelle tifoidee. Le diagnosi *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis hanno ottenuto solo un punto ciascuna, perché il sierotipo non è corretto.

Il ceppo era sensibile a tutti gli antibiotici testati. Gli aminoglicosidi non sono stati valutati. Il ciclo delle salmonelle prevede anche uno stadio intracellulare, e poiché i glicosidi non sono in grado di passare la membrana cellulare, sono considerati inefficaci. Le Expert Rules di EUCAST, v. 3.2, consigliano di riportare resistenza agli aminoglicosidi anche se all'esame dovesse risultare sensibile. Per le forme di salmonella extra-intestinali, come nel caso del campione, esistono valori limiti particolari per i fluorochinoloni, specialmente per ciprofloxacina, dovuti al fatto che la terapia con chinoloni può fallire se il ceppo ha acquisito una o più mutazioni nel gene *gyrA*. Lo screening di una resistenza low-level a ciprofloxacina in ceppi extra intestinali di salmonella si effettua con dischetti di pefloxacina da 5 µg, oppure con la determinazione della MIC di ciprofloxacina (valore limite ≤ 0.06 mg/L). Il ceppo del campione non aveva una resistenza low level a chinoloni (wildtyp).

Identificazione	Quantità
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Chester	1
<i>Salmonella</i> Chester	1
<i>Salmonella enterica</i>	10
<i>Salmonella enterica</i> gruppo B	3
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i>	9
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> gruppo B	1
<i>Salmonella</i> Enteritidis	1
<i>Salmonella</i> gruppo	2
<i>Salmonella</i> gruppo B	8
<i>Salmonella</i> species	18
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1

Campione C: Tessuto di valvole cardiache/endocardite

Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie)

Il campione conteneva *Erysipelothrix rhusiopathiae*, l'agente dell'erisipeloide, un'infezione zoonotica. Questo bacillo Gram positivo si trova soprattutto in animali come suini, ovini, pesci e volatili. Nel preparato Gram, *E. rhusiopathiae* ha forma diritta, spesso filamentosa, a volte organizzato in corte catenelle e non produce spore; le colonie hanno un diametro di <0.5 mm, sono grigio-bianche, α-emolitiche e catalasi negative. La morfologia del bacillo e delle colonie può indurre a confusione con lattobacilli.

E. rhusiopathiae è noto come agente dell'erisipeloide suina, un'infezione dei suini a volte acuta setticemica, spesso letale. Persone esposte (veterinari, macellai, contadini, pescatori, pescivendoli, cuochi) possono contaminarsi a livello di piccole ferite cutanee e sviluppare il quadro clinico di una cosiddetta erisipeloide: colorazione blu-rossastra della pelle con formazione di vesciche, dolorosa, ma non purulenta. A differenza dell'erisipela classica causata da *Streptococcus pyogenes*, l'erisipeloide è circoscritta e raramente insorgono sintomi generici come febbre o coinvolgimento del sistema linfatico. Le lesioni guariscono spontaneamente dopo 1-3 settimane.

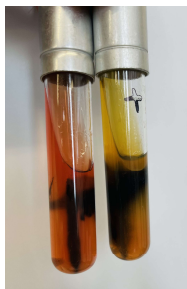


Erisipeloide sulla mano di un'assistente di laboratorio veterinario di 58 anni, che durante il sezionamento di un'oca si era ferita attraverso il guanto con una scheggia di costola dell'oca (fonte: NRGK, Vetsuisse, UZH).

Se questo agente viene isolato da un'emocoltura, va subito sospettata un'endocardite. I fattori di rischio per un'infezione sistemica sono: debolezza immunitaria, diabete mellito e malattie renali croniche. L'endocardite da *E. rhusiopathiae* ha un'alta mortalità, pertanto un trattamento medico o chirurgico immediato è di enorme importanza.

Il patogeno è facile da identificare in MALDI-TOF MS, API Coryne e VITEK 2, la maggior parte dei partecipanti ha posto la diagnosi corretta. Caratteristica di *E. rhusiopathiae* è la formazione di H₂S su TSI, mentre da carboidrati non c'è formazione di gas.

Formazione di H₂S in provette TSI



Sinistra:

Caratteristica formazione di H₂S in provette TSI senza aggiunta di siero di coniglio.

Destra:

Caratteristica formazione di H₂S in provette TSI con aggiunta di siero di coniglio, che facilita il riconoscimento di ceppi batterici fermentanti o non fermentanti perché contribuisce a sostenerne la crescita.

E. rhusiopathiae è intrinsecamente resistente alla vancomicina, ma è sensibile a penicillina.

Identificazione	Quantità
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	53
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2

Campione D: Striscio profondo da lesione/infezione post-traumatica

Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie)

Bacillus mycoides è un bacillo Gram positivo del gruppo *Bacillus cereus*. *B. mycoides* e le sue spore sono ubiquitarie nell'ambiente.

Infezioni dovute a patogeni del gruppo *B. cereus* si riscontrano quindi spesso nelle lesioni. *B. cereus* è particolarmente virulento e causa spesso infezioni di tessuti molli e di ossa in seguito a trauma perforante o danneggiamento delle mucose (ferite da sparo, fratture aperte, morsi di animali, ustioni). Un'altra malattia tipica da *B. cereus* è l'endoftalmite, che può distruggere rapidamente un occhio infettato, specialmente in caso di trauma perforante dovuto ad un corpo estraneo.

Sebbene *B. mycoides*, contrariamente a *B. cereus*, non possieda fattori di virulenza, la sua rilevazione è importante dal punto di vista clinico.

Su agar sangue ovino *B. mycoides* cresce in colonie di colore grigio opaco con forte β-emolisi e positive a catalasi, ossidasi e lecitinasi. *Bacillus mycoides* e *Bacillus anthracis* si distinguono da *Bacillus cereus* e *Bacillus thuringiensis* per la motilità assente con il metodo della goccia pendente. La crescita rizoide delle colonie (detto «a testa di Medusa») su terreni nutritivi può invece occorrere in tutte e quattro le specie menzionate. L'emolisi e la resistenza a penicillina sono altre caratteristiche che escludono con alta probabilità la presenza di *B. anthracis*.



La testa di Medusa, contesto batterico e contesto storico

Identificazione	Quantità
<i>Bacillus mycoides</i>	17
<i>Bacillus cereus</i> gruppo	25
<i>Bacillus cereus</i> complesso	3
<i>Bacillus cereus</i>	3
<i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> gruppo	1
<i>Bacillus mycoides/thuringiensis</i>	1
<i>Bacillus</i> species	2
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1
<i>Sphingomonas</i> species	1

Campione E: Urina getto intermedio/infezione delle vie urinarie, ricerca di VRE
Requisiti: Batteri potenzialmente patogeni (genere e specie)

Enterococcus faecium fa parte della flora fisiologica intestinale nell'Uomo e negli animali, e può venire spesso isolato da campioni di urina in infezioni delle vie urinarie. In questo caso era richiesta anche la ricerca di VRE. *E. faecium* è stato identificato senza problemi da tutti i partecipanti.

Il ceppo del campione apparteneva agli enterococchi vancomicina-resistenti (VRE). In PCR questa volta si identificava il gene *vanA*, il 92% dei partecipanti ha posto la diagnosi corretta di VRE. La difficoltà consisteva nel riconoscimento della zona inibitoria sfuocata con i dischi di vancomicina. Il ceppo in questione possedeva una resistenza debole e la gran parte della popolazione mostrava una MIC di 3 o 4 mg/L (sensibile). Questi valori sono insoliti per un ceppo con gene *vanA*, che in genere induce una MIC a vancomicina più alta (>64 mg/L) del gene *vanB*. Tipica per il gene *vanA* era invece la resistenza a teicoplanina, rilevata in questo isolato.

Come già accennato nel controllo circolare 2023-3, in presenza di alone di inibizione sfuocato con vancomicina va esclusa una VRE con metodi microbiologici oppure va riportata resistenza a vancomicina. Consigli per l'interpretazione si trovano nelle linee guida EUCAST (EUCAST Clinical Breakpoint Tables v. 13.0, valid from 2023-01-01).

I cosiddetti enterococchi vancomicina variabili (VVE) sono un esempio di difficoltà diagnostica da aspettarsi prossimamente. In Danimarca, per esempio, sono stati riportati negli ultimi anni focolai del VVE *vanA E. faecium* clone ST1421-CT1134 (Hammerum et al, Euro Surveill. 2019 Aug 22; 24(34)). Si tratta di ceppi di enterococchi portatori di una «silent copy» del gene della resistenza a vancomicina, che sono fenotipicamente sensibili a vancomicina ma in grado di tramutarsi in un fenotipo resistente (VVE→VRE) durante la terapia antibiotica, diminuendone così considerevolmente l'efficacia. La difficoltà sta nella rilevazione della VVE, che è possibile solo con la biologia molecolare e non con colture su terreni selettivi alla vancomicina.

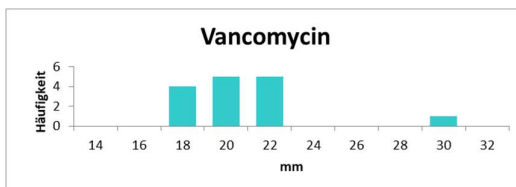
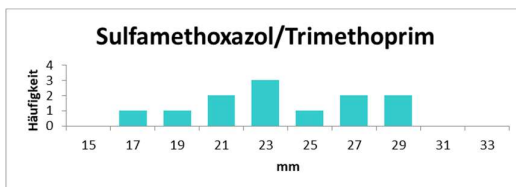
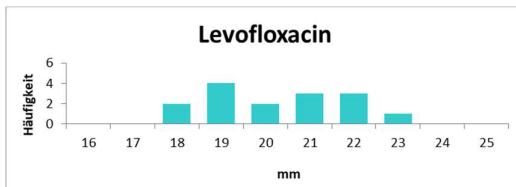
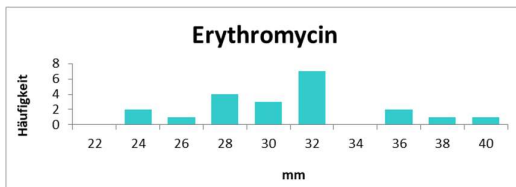
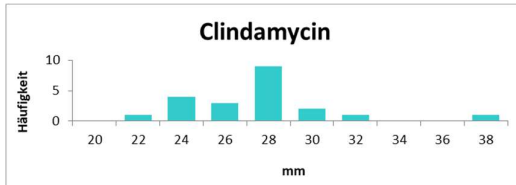
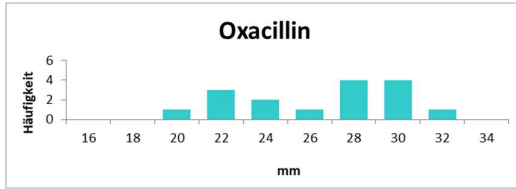
Identificazione	Quantità
<i>Enterococcus faecium</i>	55

Distinti saluti

Dr. med. vet. PhD V. Hinić

F.S. Hufschmid-Lim

Esame delle resistenze del campione A



Esame delle resistenze del campione B

