



LA SPETTROMETRIA DI MASSA NEL LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA: NUOVE APPLICAZIONI PER LA RIDUZIONE DEI TEMPI DI RISPOSTA DA FLACONE DI EMOCOLTURA POSITIVO



Nicoletta Corbo¹, Silvia Bracco¹, Carola Mauri¹, Maria Chiara Sironi², Jessica Riva¹, Alessandra Bielli², Francesco Luzzaro¹

¹Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale A. Manzoni, Lecco, ²Laboratorio di Microbiologia e Virologia, Ospedale Niguarda Ca' Granda, Milano

Introduzione

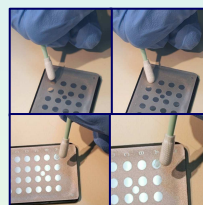
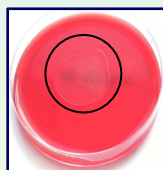
Il Laboratorio di Microbiologia gioca un ruolo critico in relazione all'identificazione dell'agente patogeno causa di infezione ed alla sua sensibilità agli antibiotici. La riduzione dei tempi di risposta dell'emocoltura, in particolare, costituisce un importante contributo alla gestione clinica dei malati con sepsi, endocardite, infezioni correlate a catetere endovascolare, febbre di origine ignota, infezioni localizzate quali polmonite ed artrite settica. La terapia empirica adottata sulla base del sospetto diagnostico, infatti, può essere adeguatamente modificata sulla base di una rapida risposta microbiologica al fine di ottimizzare la terapia antimicrobica. Da questo punto di vista, la spettrometria di massa mediante MALDI-TOF, recentemente implementata nei laboratori di microbiologia clinica per l'identificazione microbica a partire da colonie isolate (Anderson NW et al., 2012; Buchan BW et al., 2012; Seng P et al., 2009) ha permesso una significativa riduzione dei tempi di analisi e dei costi (Justesen US et al., 2011). Scopo dello studio, condotto presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale "A. Manzoni" di Lecco, è stato quello di mettere a punto una metodica rapida per ridurre i tempi di risposta da flacone di emocoltura positivo.

Materiali e metodi

Sono stati analizzati un totale di 200 flaconi di emocoltura positivi. Per ogni flacone, una aliquota standard di sangue (circa 2.5 ml) è stata sottoposta a centrifugazione a 3500 rpm per 7 minuti. La parte corpuscolata (circa 50 µl) è stata quindi seminata su terreni di coltura solidi permissivi (agar sangue e agar cioccolato) e incubata a 35°C sia in aerobiosi che in microaerofilia per un periodo di 3 ore, in modo da consentire la crescita della maggior parte delle specie microbiche eventualmente presenti.

Dopo il periodo di incubazione standard, la patina di crescita formata nella zona di inoculo è stata prelevata con un tampone e trasferita sulla piastrina dedicata per l'identificazione microbica mediante spettrometria di massa (Vitek MS, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Contemporaneamente alla metodica descritta, è stata seguita la metodica

comunemente in uso in laboratorio per l'esame colturale da flacone positivo di emocoltura. L'identificazione definitiva dei microrganismi a livello di specie è stata ottenuta mediante Vitek MS a partenza dalle colonie cresciute su terreno agarizzato.



Risultati

Nel 72% dei casi (n=144), i microrganismi identificati a partire dai flaconi positivi sono stati correttamente identificati a livello di specie, dimostrando una migliore performance nel caso dei batteri Gram-negativi. In 3 casi (1.5%) la metodica in studio non ha identificato alcun microrganismo, in accordo con il risultato definitivo ottenuto dall'esame colturale standard. Complessivamente, quindi, la performance è risultata pienamente adeguata nel 73,5% dei casi.

Nel restante 26,5% dei casi (n=53), gli agenti eziologici di batteriemia non sono stati identificati correttamente a livello di specie. In particolare, in 39 occasioni (19,5%) il sistema ha indicato l'assenza di un numero sufficiente di picchi (senza quindi indicare alcun microrganismo) mentre in altri 13 (6,5%) il sistema indicava uno o più microrganismi possibili senza però raggiungere una percentuale sufficiente per validare come corretta l'identificazione ottenuta. In tutti questi casi l'esame colturale ha poi dimostrato la presenza di una popolazione microbica mista. In un caso, infine, il sistema ha identificato erroneamente un microrganismo a livello di specie pur identificandolo a livello di genere (*Staphylococcus capitis* invece che *Staphylococcus aureus*).

Conclusioni

La nuova metodica rapida ha ottenuto una buona performance sia in termini quantitativi che qualitativi, con risultati comparabili a quelli riportati in letteratura con metodi più indaginosi (lisi, filtrazione, etc.), dimostrando che la tecnologia MALDI-TOF MS consente una rapida e semplice identificazione da emocolture positive, con un'alta percentuale di corretta identificazione.

Da un punto di vista tecnico, la metodica studiata presenta il vantaggio di integrarsi perfettamente nella routine microbiologica senza appesantire la normale attività del laboratorio, riducendo mediamente di circa 24 ore il tempo di comunicazione al clinico dei risultati preliminari di identificazione e consentendo in molti casi di modificare adeguatamente in tempi rapidi la terapia antibiotica somministrata empiricamente.

Bibliografia

Anderson NW, Buchan BW, Riebe KM, Parsons LN, Gnacinski S, Ledebor NA. Effects of solid-medium type on routine identification of bacterial isolates by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50:1008-1013.

Buchan BW, Riebe KM, Ledebor NA. Comparison of the MALDI Biotyper System using sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2012; 50:346-352.

Justesen US, Holm A, Knudsen E, Andersen LB, Jensen TG, Kemp M, Skov MN, Gahrn-Hansen B, Møller JK. Species identification of clinical isolates of anaerobic bacteria: a comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J Clin Microbiol* 2011; 49:4314-4318.

Seng P, Drancourt M, Gouriet F et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009; 49:543-551.