

BATTERIOLOGIA

Confronto dei risultati dell'esame microscopico diretto e dell'identificazione definitiva nei casi di batteriemia

Antonio Goglio, Francesca Vailati, Annalisa Grigis, Bianca Ricciardella, Fausto Moiola

USC Microbiologia e Virologia, AO Ospedali Riuniti, Bergamo

Parole chiave: Emocoltura, esame microscopico, Gram, batteriemia, sepsi

Key words: Blood culture, Gram stain, bacteremia, bloodstream infections

Comparison of direct Gram stain and identification of microorganisms from blood cultures

SUMMARY

Introduction. All the microbiology texts underline the importance of performing a gram stain on blood culture broth, if positive, with a double purpose: address the microbiologist in the choice of subculture media and provide the clinician with preliminary indication for the choice of the treatment. However, there are few data and literature on the concordance between gram stain and definitive result. The study aims at evaluating, in the reality of our hospital, the reliability of the gram stain performed starting from the blood culture broth.

Materials and methods. The results of the gram stain on broth and of the final detection of all positive blood cultures performed from January 1st 2003 to December 31st 2004 by the Microbiology Lab based at Ospedali Riuniti Bergamo have been analysed.

Results. In two years 52909 bottles have been processed; 6328 (11.96%) resulted positive, of which 5921 (11.19%) for monomicrobial flora and 407 (0.77%) for polymicrobial flora.

Concerning the 6643 definitive identifications, the gram stain resulted fully correct in 6140 cases (92.43%); errors have been interpreted as "minor" in 285 cases (4.29%) for a partial or absent definition of the morphologic-dyeing features, "major" in 14 cases (0.21%) for notification of micro-organisms non grown later, "serious" in 204 (3.07%) for wrong reading of Gram (36 cases, equal to 0.54%) or no interpretation, in case of mixed cultures, of micro-organisms grown later (168 cases equal to 2.53%).

Conclusions. Our study confirms the reliability of Gram stain and its role in providing in advance the definitive results of blood culture; however, it highlights the risk that Gram stain cannot detect polymicrobial aetiologies.

INTRODUZIONE

Le infezioni del torrente circolatorio, batteriemie e fungemie, costituiscono una importante causa di morbilità e sono associate ad alta mortalità nei casi di sepsi severa o shock settico. Anche se la mortalità per sepsi sembra essersi ridotta negli ultimi anni, le sepsi costituiscono ancor oggi la principale causa di morte degli adulti ricoverati nelle terapie intensive non coronariche (2, 9, 15, 18).

Diversi lavori hanno evidenziato come una corretta e precoce terapia antimicrobica possa ridurre la mortalità di queste forme (5, 10, 13, 19, 20). Appare quindi evidente l'importanza delle indagini microbiologiche, che possono identificare, attraverso l'emocoltura, il patogeno in causa e definirne lo spettro di sensibilità agli antibiotici, consentendo una terapia mirata (3, 5, 12, 21). L'emocoltura fornisce però risultati definitivi solo dopo 72-96 ore, tempi non compatibili con la rapida evoluzione di queste forme morbose.

Il microbiologo può però fornire risultati intermedi, quali l'esame microscopico, disponibile non appena si rilevino segni di crescita nel brodo dell'emocoltura, o i test diretti, effettuati direttamente su brodo senza attendere la crescita delle colonie, anticipando così di 24-48 ore la risposta definitiva (4, 8, 11).

L'esame microscopico consente, in caso di positività dell'emocoltura, di definire le caratteristiche morfologiche, di distribuzione spaziale e tintoriale del/dei microrganismi in causa.

Pur essendo sottolineata da tutti l'importanza dell'esame microscopico sul brodo dell'emocoltura – tutti i trattati di microbiologia concordano sull'importanza di questa procedura (8, 11, 19) –, esistono pochi dati di letteratura sull'affidabilità dei risultati, legati a numerosi aspetti tecnici (esecuzione dello striscio e della colorazione di Gram, ma anche competenza di chi ne effettua la lettura). Con questo lavoro, abbiamo voluto valutare l'af-

fidabilità dell'esame microscopico, nella realtà degli Ospedali Riuniti di Bergamo, verificandone la concordanza con i risultati dell'identificazione definitiva.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati i dati relativi a tutte le emocolture effettuate presso il Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera Ospedali Riuniti di Bergamo nel periodo gennaio 2003-dicembre 2004, mettendo a confronto i risultati dell'esame microscopico con quello dell'identificazione definitiva.

Procedure microbiologiche

L'iter della diagnosi microbiologica prevede, nel caso di sospetta batteriemia, l'esecuzione di due set di emocolture, immettendo per ciascun set 5-10 ml di sangue in flaconi BacT/ALERT contenenti carbone (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), rispettivamente per aerobi (FAN aerobic bottles) ed anaerobi (FAN anaerobic bottles), e l'immediato invio al Laboratorio di Microbiologia e Virologia. In Microbiologia i campioni sono posti ad incubare nello strumento BacTAlert 3D a 35°C per un periodo di 7 giorni (o più nel sospetto di endocardite, AIDS, fungemia, brucellosi); lo strumento rileva in automatico la crescita, in base al viraggio di colore dell'indicatore presente sul fondo dei flaconi che si verifica quando si abbia liberazione di CO₂ da parte dei microrganismi.

Dai flaconi positivi, sotto cappa a flusso laminare, vengono prelevati 5 ml di brodo che vengono sottoposti ad una doppia centrifugazione: una prima "lenta" a 1500 rpm per 5' consente la separazione dei globuli rossi, una seconda "veloce" sul surnatante a 3500 rpm per 10' per consentire la precipitazione dei microrganismi.

Eliminato quindi il surnatante, il sedimento viene risospeso, strisciato su vetrino e colorato con la colorazione di Gram (11). Il tecnico procede alla lettura del vetrino al microscopio per ricercare i microrganismi, descrivendone la morfologia, la disposizione e la colorabilità; i risultati della lettura sono quindi convalidati o meno da una seconda lettura effettuata dal medico.

Successivamente si procede all'esecuzione dei test diretti per l'antibiogramma (e in alcuni casi a test diretti anche per l'identificazione) ed alle sottocolture; il giorno successivo si procede all'identificazione ed antibiogramma definitivo dalle colonie.

I batteri osservati all'esame microscopico sono assegnati ad uno dei seguenti raggruppamenti: bacilli Gram-negativi, coccobacilli Gram-negativi, cocchi Gram-negativi (diplococchi), cocchi Gram-positivi a catenella (*Streptococcus*-like), cocchi Gram-positivi a grappolo (*Staphylococcus*-like), cocchi Gram-positivi (senza poterne descri-

vere con sicurezza la disposizione, a catenella o a grappolo), bacilli Gram-positivi, miceti.

Quando la lettura non permetta di attribuire con sicurezza l'assegnazione ad una delle categorie sopra menzionate dei microrganismi osservati si registra, e si comunica al clinico, la presenza dei microrganismi senza indicarne le caratteristiche morfologico tintoriali ("risultati non interpretabili"). Si registrano come "negativi" i casi in cui non sia possibile evidenziare all'esame microscopico la presenza di batteri o miceti.

La presenza di microrganismi viene registrata sul sistema informatico di gestione del laboratorio (Metafora srl, Milano) e comunicata al medico curante via fax, specificandone le caratteristiche morfologico tintoriali come sopra descritto. Quando non si osservino microrganismi (esame microscopico negativo) non viene data nessuna informazione al clinico in attesa dei risultati della coltura su piastra.

Il controllo di qualità della colorazione di Gram viene eseguito a cadenza giornaliera come previsto dalle normative della Regione Lombardia (14), inserendo due vetrini strisciati rispettivamente con *S. pneumoniae* ed *Haemophilus influenzae*.

Analisi ed elaborazione dei risultati

Le informazioni relative all'esame microscopico ed all'identificazione definitiva delle colonie isolate sono state estratte dal sistema informatico di gestione del Laboratorio di Microbiologia (data base Oracle) e trasferiti su foglio Excel per la successiva elaborazione.

I risultati del confronto sono stati valutati anche in riferimento alla valenza clinica ed alle conseguenze della comunicazione del risultato, corretto o no, dell'esame microscopico al clinico, distinguendo le risposte in:

- corrette: concordanza piena tra l'esame microscopico e il colturale
- errori minori ("minor error"), includendo:
 - mancata definizione delle caratteristiche morfologico-tintoriali; si segnala al curante la positività dell'emocoltura, senza specificare le caratteristiche morfologico tintoriali del microrganismo (viene segnalata al curante la positività dell'emocoltura, senza anticipare informazioni sulle caratteristiche morfologico-tintoriali)
 - parziale definizione delle caratteristiche morfologico-tintoriali; si segnala al curante la positività dell'emocoltura specificando correttamente, ma solo in parte, le caratteristiche morfologico tintoriali del microrganismo (cocchi Gram positivi, senza precisare se *Staphylococcus*-like o *Streptococcus*-like; coccobacilli Gram negativi con successiva

- identificazione di bacilli o cocchi Gram-negativi; cocchi *Staphylococcus*-like o *Streptococcus*-like con successivo isolamento di cocchi Gram positivi anaerobi);
- esame microscopico negativo, con successivo isolamento di singole specie batteriche o fungine dalle sottocolture del brodo (ritardo di 24 ore nella segnalazione di positività dell'emocoltura).
- errori maggiori ("major error"): rilevazione di microrganismi all'esame microscopico non riscontrati dal successivo esame colturale (risultati falsamente positivi).
- errori gravi ("very major error"):
 - errata interpretazione delle caratteristiche morfologico-tintoriali dei microrganismi nella lettura del Gram;
 - mancato riconoscimento di microrganismi poi cresciuti in colture polimicrobiche.

Una precisazione. Il mancato riconoscimento di microrganismi all'esame microscopico è stato attribuito a categorie diverse in base ai risultati definitivi dell'esame colturale, distinguendo tra le forme monomicrobiche e polimicrobiche.

Nel primo caso la conseguenza del mancato riconoscimento di batteri o funghi all'esame microscopico comporta solo un ritardo di comunicazione al clinico della positività e dell'agente in causa; nel secondo caso viene invece fornita una risposta sulla base dell'esame microscopico che risulterà incompleta alla luce del risultato finale (il clinico potrebbe modificare la terapia sulla scorta di una informazione non corretta).

RISULTATI

Nell'arco di due anni (1 gennaio 2003 – 31 dicembre 2004) sono stati inviati al Laboratorio di Microbiologia 52909 flaconi di emocoltura. Sono risultati positivi 6328 flaconi (11.96%), con crescita di un solo microrganismo in 5921 flaconi (93.57%), di più microrganismi in 407 (6.43%), con sviluppo di due microrganismi in 373 flaconi e tre microrganismi in 34 flaconi.

Gli agenti eziologici complessivamente isolati sono risultati 6764; la loro distribuzione e frequenza di isolamento sono riportate nella tabella 1. I microrganismi osservati con l'esame microscopico sono stati raggruppati secondo quanto indicato nei "materiali e metodi". I microrganismi identificati dopo le indagini colturali sono stati raggruppati come riportato in tabella 1.

Il confronto dei risultati dell'esame microscopico con quelli dell'esame colturale (identificazione definitiva) è riportato sinteticamente nella tabella 2. Il totale dei microrganismi della tabella 2 è inferiore al totale dei microrganismi complessiva-

mente identificati (6643, rispetto 6764); questo perché in 121 casi sono stati isolati in uno stesso flacone di emocoltura più microrganismi con identico aspetto morfologico-tintoriale, ad esempio *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* coagulanti negativo, che sono stati contati una sola volta rispettivamente tra i bacilli Gram negativi e tra i cocchi Gram-positivi *Staphylococcus*-like.

I dati riportati nella tabella 2 evidenziano come il risultato comunicato al clinico sia risultato pienamente corretto in 6140 casi su 6643 (92.43%). Gli errori minori (*minor error*) sono stati 285 (4.29%): 144 (2.17%) conseguenti ad una mancata definizione delle caratteristiche morfologico-tintoriali (sono i casi in cui si segnala al curante la positività dell'emocoltura senza specificare le caratteristiche morfologico tintoriali del microrganismo), 63 (0.95%) con definizione parziale delle caratteristiche morfologico-tintoriali (la segnalazione al curante è corretta, ma incompleta), 78 (1.17%) in cui non è stata rilevata la presenza all'esame microscopico di microrganismi poi cresciuti.

Gli errori maggiori (*major error*) sono stati 14 (0.21%) attribuibili alla segnalazione di microrganismi successivamente non cresciuti. Gli errori gravi (*very major error*) sono stati 204 (3.07%) per errata lettura del Gram (36 casi, pari allo 0.54%) o mancato riconoscimento, in occasione di colture miste, di microrganismi poi cresciuti (168 casi, pari al 2.53%).

In una successiva analisi dei dati, abbiamo confrontato i risultati dell'esame microscopico rispetto al risultato dell'esame colturale (quanto è affidabile l'identificazione microscopica in caso di riscontro di un microrganismo?).

L'analisi dei dati evidenzia che:

- i "bacilli Gram negativi" sono stati confermati in 2055 casi su 2074 (99.1%). Gli errori di lettura si riferiscono a 19 casi: in 8 casi *Streptococcus pneumoniae*, in tre casi bacilli Gram positivi anaerobi (due *Clostridium* spp. ed un *Lactobacillus* spp.), in tre casi bacilli Gram positivi aerobi, in 5 casi le successive indagini colturali sono risultate negative;
- i "coccobacilli Gram-negativi" sono stati confermati in 5 casi (sempre con crescita di *Brucella* spp.), in 11 casi sono cresciuti Enterobatteri, in 3 *Neisseria* spp;
- i "diplococchi Gram-negativi" sono stati confermati in 9 casi su 9 (in tutti i casi si è isolata *Neisseria meningitidis*);
- il risultato di "*Staphylococcus*-like" è risultato

Tabella 1. Distribuzione di batteri e miceti isolati da emocolture

Bacilli Gram-negativi (2307)		
<i>Enterobacteriaceae</i> (1940)	<i>Escherichia coli</i>	1264
	<i>Klebsiella</i> spp.	203
	<i>Enterobacter</i> spp.	200
	<i>Serratia</i> spp.	101
	<i>Proteus</i> spp.	68
	<i>Salmonella</i> spp.	52
	Altri	52
	<hr/>	
Altri bacilli Gram-negativi aerobi o anaerobi facoltativi (279)	<i>Pseudomonas</i> spp.	179
	<i>Stenotrophomonas</i> spp.	41
	<i>Acinetobacter</i> spp.	16
	<i>Aeromonas</i> spp.	8
	<i>Campylobacter</i> spp.	8
	<i>Pasteurella</i> spp.	4
	<i>Haemophilus</i> spp.	2
	Altri, o non ulteriormente identificati	21
<hr/>		
Bacilli Gram-negativi anaerobi (88)	<i>Bacteroides</i> spp.	56
	<i>Prevotella</i> spp.	7
	Altri	25
<hr/>		
Coccobacilli Gram-negativi (6)	<i>Bruella</i> spp.	6
Diplococchi Gram-negativi (22)	<i>Neisseria</i> spp.	22
<hr/>		
Cocchi Gram-positivi (3978)		
Cocchi Gram-positivi, aerobi o anaerobi facoltativi, disposti a catenella o in paia (<i>Streptococcus</i> -like) (1064)	Viridans Group Streptococci	280
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	146
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	83
	<i>Streptococcus bovis</i>	34
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	16
	Altri Streptococchi	55
	<i>Enterococcus</i> spp.	448
	<i>Lactococcus</i> spp.	2
<hr/>		
Cocchi Gram-positivi, aerobi o anaerobi facoltativi, disposti a grappolo o gruppi irregolari (<i>Staphylococcus</i> like) (2909)	<i>Staphylococcus aureus</i>	1044
	Stafilococchi coagulasi-negativi	1858
	Altri	7
<hr/>		
Cocchi Gram-positivi anaerobi (5)	<i>Peptostreptococcus</i> spp.	5
<hr/>		
Bacilli Gram-positivi (238)		
Bacilli Gram-positivi aerobi o anaerobi facoltativi (176)	<i>Listeria</i> spp.	19
	<i>Bacillus</i> spp.	23
	<i>Corynebacterium</i> spp.	8
	<i>Nocardia</i> spp.	1
	Altri, o non ulteriormente identificati	125
	<hr/>	
Bacilli Gram-positivi anaerobi (62)	<i>Propionibacterium</i> spp.	32
	<i>Lactobacillus</i> spp.	11
	<i>Clostridium</i> spp.	9
	Altri	10
<hr/>		
Miceti (213)	<i>Candida</i> spp.	175
	<i>Cryptococcus</i> spp.	15
	Altri lieviti	1
	Miceti filamentosi	22
<hr/>		
TOTALE		6764

Tabella 2. Confronto tra i risultati dell'esame microscopico e quelli dell'identificazione definitiva

Esame microscopico su brodo (Gram)	Identificazione definitiva							Miceti	Non crescita	Totale
	Bacilli Gram-negativi	Coccobacilli i Gram-negativi	Diplococchi Gram-negativi	Stafilococchi	Streptococchi / Enterococchi	Cocchi Gram-positivi anaerobi	Bacilli Gram-positivi			
Bacilli Gram-negativi	2055				8		6		5	2074
Coccobacilli Gram-negativi	11	5	3							19
Diplococchi Gram-negativi			9							9
Staphylococcus-like	1			2758	4	2			3	2768
Streptococcus-like	4			2	926	3	4		3	942
Cocchi Gram-positivi	1			26	18		1			46
Bacilli Gram-positivi	4						184		1	189
Miceti					1			203	1	205
Batteri visti, ma non identificati	61	1		9	49		24		1	145
Batteri non visti (coltura pura)	19		7	26	17		3	6		78
Batteri non visti (coltura mista)	43		3	72	28		18	4		168
Totale	2199	6	22	2893	1051	5	240	213	14	6643

Legenda: I risultati sono stati valutati anche in riferimento alla valenza clinica ed alle conseguenze del risultato, corretto o no, dell'esame microscopico, distinguendo le risposte in: corrette (numeri nei riquadri); minor error, mancata o parziale definizione delle caratteristiche morfologico-tintoriali o mancato riconoscimento di microrganismi poi cresciuti in coltura pura (carattere normale); major error, segnalazione di microrganismi non riscontrati nel successivo esame colturale (carattere corsivo); very major error, errata interpretazione del Gram o segnalazione solo di una parte dei microrganismi presenti nel caso di colture polimicrobiche (carattere grassetto).

Il totale non corrisponde ai batteri isolati, essendo stati contati una sola volta i morfotipi identici (es. quando sono stati isolati da uno stesso flacone di emocoltura *S. aureus* e Stafilococchi coagulasi negativi o *E. coli* e *K. pneumoniae*)

corretto in 2758 casi su 2768 (99.6%); i 10 errori di lettura sono riferiti: uno a *Pseudomonas aeruginosa*, tre ad *Enterococcus* spp., uno a *Streptococcus* alfa-emolitico, due a *Peptostreptococcus* spp., in tre casi non si è avuta crescita dalle indagini colturali;

- il risultato di "streptococcus-like" è stato confermato in 926 su 942 casi (98.3%) con sviluppo all'esame colturale di 501 Streptococchi, 423 Enterococchi, 2 *Lactococcus* spp.; nei 16 casi scorretti si è avuto isolamento di bacilli gram-negativi (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Prevotella* spp.), di cocchi Gram-positivi (*Staphylococcus coagulase-negative*, *Micrococcus* spp. e tre *Peptostreptococcus* spp.), di bacilli Gram positivi in quattro casi e di mancata crescita nell'esame colturale in tre casi;
- il risultato di "cocchi Gram-positivi" – senza che fosse possibile l'attribuzione al gruppo "Staphylococcus-like" "Streptococcus-like" - è stato confermato in 44 casi su 46: 9 *Staphylococcus aureus*, 16 Stafilococchi coagulasi negativi, un *Gemella* spp., 6 Enterococchi, 9 Streptococchi alfa-emolitici, 3 *Streptococcus agalactiae*; i due errori sono riferiti a un bacillo Gram-negativo non fermentante e ad un bacillo Gram-positivo aerobio;
- il risultato di "bacilli Gram-positivi" è stato confermato in 184 su 189 casi (97.4%); in 4 casi si è avuta crescita di bacilli Gram-negativi (due *Pseudomonas aeruginosa* e due *Stenotrophomonas maltophilia*), in un caso non si è avuta crescita all'esame colturale;
- il risultato di "miceti" è stato confermato in 203

casi su 205 (99%) con crescita di lieviti in 197 casi e di funghi filamentosi in 6; in un caso si è avuta crescita di Streptococchi e in un caso nessuna crescita all'esame colturale;

- non è stata possibile una identificazione delle caratteristiche morfologico-tintoriali in 145 casi (2.2%); si trattava in 61 casi di bacilli Gram negativi (29 Enterobatteri, 20 bacilli Gram-negativi non fermentanti il glucosio, 11 bacilli Gram-negativi anaerobi, uno *Stenotrophomonas maltophilia*); in un caso di *Brucella* spp., in 58 casi di cocchi Gram-positivi (2 *S. aureus*, 4 Stafilococchi coagulasi negativi, 1 *Micrococcus* spp, 2 *Aerococcus* spp., 3 *Enterococcus* spp. 1 Streptococco alfa-emolitico e 8 *Streptococcus mutans*, 27 *S. pneumoniae*); in 24 casi di bacilli gram-positivi (6 *Listeria monocytogenes*, 7 *Bacillus* spp., 11 altri bacilli Gram-pos aerobi), in un caso non si è avuta crescita dall'esame colturale;
- il risultato falsamente negativo si è avuto in 78 sui 6328 flaconi positivi (1.2%) per mancato riconoscimento dei microrganismi presenti: bacilli Gram negativi (11 enterobatteri, un anaerobio e 7 altri batteri), diplococchi gram negativi (7 *Neisseria meningitidis*, stafilococchi 7 *S. aureus*, e 19 CoNS), streptococchi (10 Pneumococchi, 5 Streptococchi alfa-emolitici, due Streptococchi non emolitici), bacilli Gram positivi (due aerobi e un anerobio), funghi (5 *Candida albicans* e un *Penicillium* spp);
- la distribuzione dei batteri non visti in caso di batteriemicie polimicrobiche è riportata in tabella 2.

DISCUSSIONE

La letteratura ha ben documentato l'importanza della precoce somministrazione di una corretta

terapia antibiotica nelle sepsi nel ridurre la mortalità. Il microbiologo può supportare le scelte cliniche sia confermando la diagnosi (emocolture positive), sia identificando il microrganismo in causa e studiandone la sensibilità agli antibiotici. I tempi degli esami microbiologici sono però troppo lunghi rispetto alla possibile rapida evoluzione della sepsi (una risposta definitiva è disponibile non prima di 48-72 ore).

Il microbiologo può anticipare alcuni risultati (identificazione ed antibiogramma diretto) o fornire indicazioni sulla possibile eziologia (esame microscopico). Nella nostra esperienza è possibile fornire una prima indicazione sulla base dei risultati dell'esame microscopico dopo 24 ore nel 61.7% dei casi e dopo 48 ore nel 89.8%, anticipando di 24 - 48 ore la risposta definitiva (6).

Stranamente, benché tutti i testi di microbiologia raccomandino l'esecuzione dell'esame microscopico sulle emocolture al momento in cui viene rilevata la loro positività, esistono pochissimi studi per quantificarne l'affidabilità nel predire i risultati di identificazione definitiva (1, 17).

Eppure l'errata interpretazione del Gram sembra essere uno degli errori analitici osservati con maggior frequenza in microbiologia (23).

L'analisi retrospettiva dei nostri dati conferma la sostanziale affidabilità dell'esame microscopico nell'anticipare, anche se limitatamente alle caratteristiche morfologico tintoriali, i risultati finali. La lettura è risultata sostanzialmente corretta nel 96.72% dei casi (pienamente corretta nel 92.43%; incompleta, ma non scorretta nel 4.29%).

In pochissimi casi (0.21%) l'esame microscopico ha rilevato la presenza di microrganismi non cresciuti nelle successive sottocolture su piastra; in almeno un caso era in causa *S. pneumoniae*, confermato dai test immunologici per la ricerca di antigeni pneumococcici, probabilmente per un fenomeno di autolisi ben noto per questo batterio. In passato, era stata segnalata la possibilità di esami microscopici falsamente positivi per presenza di batteri non vitali nei brodi di emocoltura (16); non abbiamo effettuato studi in questo senso. La mancata crescita potrebbe anche essere spiegata dalla presenza di antibiotici nel brodo di coltura.

Qualche considerazione sugli errori che abbiamo considerato *very major error* per errata interpretazione delle caratteristiche morfologico-tintoriali del Gram (0.54%) o per la mancata rilevazione di batteri successivamente sviluppatasi dalle sottocolture su piastra (2.53% dell'intera casistica).

Il primo aspetto richiede al microbiologo una verifica di tutti i possibili momenti critici: gli aspetti tecnici della colorazione (verificata con l'effettuazione di controlli di qualità quotidiani, come pre-

visto in Regione Lombardia da specifiche normative (14), ma non da altre Regioni italiane), la verifica delle competenze di chi effettua la lettura e il suo periodico addestramento e verifica, la lettura da parte di due operatori, sistematica e in cieco, per ridurre i possibili errori di lettura.

Il secondo errore è invece probabilmente dovuto ad una lettura non approfondita del vetrino (una volta identificato un microrganismo si corre il rischio di "lasciarsi sfuggire" gli altri), ma potrebbe anche essere legato ad una bassa carica del microrganismo non visto (di qui la necessità di raccomandare l'osservazione di più campi microscopici per rilevare anche i microrganismi presenti in bassa carica). Nella nostra casistica il 6.43% delle batteriemie sono risultate a eziologia polimicrobica; in altre casistiche sono però state osservate percentuali anche superiori al 10% (22). Nella refertazione dei risultati dell'esame microscopico deve essere segnalato al clinico che il dato microscopico costituisce solo una informazione preliminare con buona, ma non assoluta, sensibilità e specificità. Il clinico deve quindi utilizzarlo ed interpretarlo, per modificare o integrare la terapia empirica, sempre solo alla luce di un ragionamento clinico. Alla luce dei nostri dati il medico curante deve sempre aver presente (sulla base del quadro clinico ed anamnestico) la possibilità di una eziologia polimicrobica che potrebbe non essere stata rilevata dalla lettura microscopica e soprattutto non basarsi sui risultati dell'esame microscopico per attuare una "deescalation therapy". Al contrario modificare la terapia se quella in atto non "copre" i microrganismi rilevati con l'esame microscopico.

CONCLUSIONI

Se correttamente utilizzato, alla luce dei dati clinici ed avendo presente i limiti sopradescritti, il referto preliminare dell'esame microscopico può aiutare il medico curante nel confermare l'eziologia infettiva e per "mirare" la terapia antibiotica. Dal punto di vista microbiologico particolare attenzione deve essere posta nell'effettuazione e colorazione dello striscio per l'esame microscopico, nell'addestramento degli operatori addetti alla lettura dell'esame microscopico, nella conferma nei casi dubbi da parte di un secondo operatore, nel riconoscere l'eventuale eziologia polimicrobica (attraverso la lettura di ulteriori campi, anche dopo l'identificazione di un primo patogeno). In letteratura sono disponibili pochi dati sull'affidabilità dell'esame microscopico sui brodi di emocoltura; i dati presentati possono quindi costituire un primo riferimento per un confronto dei risultati tra laboratori.

BIBLIOGRAFIA

1. Agger WA, Maki DG. Efficacy of direct Gram stain in differentiating *Staphylococci* from *Streptococci* in Blood Cultures Positive for Gram-Positive Cocci. *J Clin Microbiol* 1978; 7:111-3.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-10.
3. Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001;29 (7 Suppl): S109-16.
4. Chorny JA, Wilson ML. Rapid detection and identification of microorganisms from blood cultures. *Clin Lab Med* 1994; 14:181-95.
5. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. for the Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: 858-73. http://www.sccm.org/professional_resources/guidelines/table_of_contents/Documents/FINAL.pdf
6. Goglio A, Arosio M, Facheris MA, et al. Blood cultures: time required for recovery of bacteria and yeasts with BacT/Alert system. *Clin Microbiol Infect* 2002, 8 (S1): 59 (h).
7. Goglio A, Nicoletti P. Indagine nazionale sulle metodiche per emocoltura in Italia. *Microbiol Medica* 2004; 19(1): 1-13.
8. Health Protection Agency. Standard operative procedure. Investigation of blood cultures (for organisms other than *Mycobacterium* species). BSOP 37, Issued by Standards Units, Evaluations and Standards Laboratory, <http://www.phls.co.uk/dir/hq/sops/bsoppdf/bsop37i3.1.pdf>. Issue date: 02.06.03
9. Hoyert DL, Anderson RN. Age-adjusted death rates: trend data based on the year 2000 standard population. *Natl Vital Stat Rep* 2001 21; 49: 1-6.
10. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118(1): 146-55.
11. Isemberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 1992. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA
12. Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram negative bacteremia. IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am J Med* 1980; 68: 344-55.
13. Leibovici L, Shraga I, Drucker M, et al. The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 1998; 244: 379-86.
14. Linee guida su "Controllo di Qualità Interno nel Servizio di Medicina di Laboratorio", Decreto N. 32856 del 19/12/2000.
15. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-54.
16. Mirrett S, Lauer BA, Miller GA, Reller LB. Comparison of Acridina Orange, Methylene blue, and Gram stains for blood cultures. *J Clin Microb* 1982; 15: 562-66.
17. Mummery B, Hardy G, Bennett, Yaschuk Y. Quality control of direct microscopic examination. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2005; 16: 104.
18. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 444-65. <http://cmr.asm.org/cgi/reprint/10/3/444?view=reprint&mid=9227861>
19. Thomson RB Jr, Miller JM. Specimen collection, transport, and processing: bacteriology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA e Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology*, 8th Edition. American Society for Microbiology, Washington D.C., USA; 286-330.
20. Valles J, Rello J, Ochagavia A, Garnacho J, Alcalá MA. Community-acquired bloodstream infection in critically ill adult patients: impact of shock and inappropriate antibiotic therapy on survival. *Chest* 2003; 123(5): 1615-24.
21. Weinstein MP, Reller LP, Murphy JR, et al. The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations. *Rev Infect Dis* 1983; 5:35-53.
22. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 309-17.
23. Yuan S, Astion ML, Schapiro J, Limaye A. Clinical impact associated with correct results in clinical microbiology testing. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2188-93.

Antonio Goglio

USC Microbiologia e Virologia,

AO Ospedali Riuniti

L.go Barozzi, 1- 24128 Bergamo

Tel. 035 269012; Fax 035 266666

E-mail: agoglio@ospedaliriuniti.bergamo.it