

Impiego del sistema Uro-Quick per l'identificazione di resistenze ben caratterizzate agli antibiotici veicolate da diverse specie batteriche

Simona Roveta, Anna Marchese, Eugenio A. Debbia

Università degli studi di Genova, Sezione di Microbiologia – DISCAT

The Uro-Quick system for the identification of well-characterized antibiotic-resistance strains.

Key Words: Uro-Quick, Detection of antibiotic resistance, Well-characterized strains

SUMMARY

The Uro-Quick system, previously used to carry out antibiotic susceptibility tests directly on urine samples, has been employed for the detection of antibiotic resistance traits that might be not easily detected in well-characterized bacterial species. The period of time requested by the instrument to identify the drug resistance were: penicillin-resistant (PEN-R), constitutive and inducible oxacillin-resistant (OXA-R) *Staphylococcus aureus*, OXA-R *S. epidermidis* 480 min. Teicoplanin-resistant (TEI-R) *S. haemolyticus*, Vancomycin- (*VanA, VanB, VanC*), aminoglycoside-resistant (HLAR) *Enterococcus spp*, 24h. *S. pyogenes* exhibiting the three erythromycin-resistance phenotypes (Ery-R, C, I e M) 480 min. Ampicillin- (AMP-R), ciprofloxacin (CIP-R) and clavulanic acid-resistant (IRT) *Escherichia coli* 180 min. Imipenem-resistant (IMI-R) *Pseudomonas aeruginosa* 24h. For each strain was evaluated the optimal experimental conditions including inoculum size, time of incubation and antibiotic concentration. The results obtained indicated that Uro-Quick might be employed for the correct detection of the above antibiotic resistant markers.

INTRODUZIONE

Lo strumento Uro-Quick rappresenta un sistema analitico automatico e dinamico che consente di superare i limiti dei classici sistemi turbidimetrici grazie all'utilizzo di misurazioni cinetiche della crescita batterica e della nefelometria a raggio laser (light scattering) che assicurano una sensibilità elevata. L'apparecchio provvede alla termostatazione (37°C) e all'agitazione dei campioni, quest'ultima evita sedimentazioni, flottazioni ed anomalie di crescita, tipiche di alcuni microrganismi difficili. La tecnica nefelometrica light scattering utilizza un raggio di luce polarizzata che incide sui flaconcini contenenti un terreno di coltura liquido inoculato con i campioni da analizzare: i segnali in uscita che scaturiscono dalla cella di misura su cui incide il raggio luminoso vengono prelevati ed analizzati da due detector posti ad angoli di 30°C e 90°C rispetto alla luce incidente (2, 18). Il sistema Uro-Quick integra 5000 letture per ogni campione in un intervallo di tempo di 1-5 secondi al fine di "filtrare" i segnali ed ottenere un valore stabile. Lo strumento esegue le letture con cadenza di 5 minuti e registra i valori dei segnali in funzione del tempo. Il segnale ottico viene utilizzato in modo dinamico, registrando l'andamento nel tempo del segnale stesso ed interpretando tali variazioni per ottenere una valu-

tazione del numero di microrganismi presenti. Al fine del calcolo tutta la curva segnale-tempo viene analizzata e rappresentata in forma matematica come funzione di 2 parametri, il numero iniziale di batteri e il loro tempo di duplicazione: lo strumento traccia quindi un grafico delle curve di crescita determinando la carica batterica iniziale.

Uro-Quick è utilizzato da tempo per la valutazione del numero di batteri presenti in un campione di urina, il sistema è così rapido che entro le 3 ore è possibile stimare la positività del campione (8, 19). In studi preliminari è stato accertato che il saggio di alcuni antibiotici può essere effettuato utilizzando questa metodica direttamente sui patogeni contenuti nel campione (14-15). In questo modo in un breve arco di tempo (6-8 ore) si possono ottenere informazioni sulla positività dell'urina e dell'eventuale sensibilità dei germi agli antibiotici più usati per il trattamento delle più comuni infezioni a carico di questo distretto anatomico.

In questo studio il sistema Uro-Quick è stato impiegato per la determinazione rapida della sensibilità agli antibiotici di ceppi Gram-negativi e Gram-positivi veicolanti resistenze agli antibiotici ben caratterizzate. Per ciascun microrganismo da sottoporre al saggio è stata determinata la concentrazione di antibiotico, la carica batterica e il

tempo di incubazione da utilizzare in modo da ottenere la massima riproducibilità dei saggi.

MATERIALI E METODI

Microrganismi

I ceppi utilizzati in questo studio includevano stiptipi di *Staphylococcus aureus*, distinti in: produttore di penicillinasi (PEN-R) (12) resistente all'oxacillina (OXA-R) a causa della espressione costitutiva del gene *mecA* e con fenotipo (OXA-R, I) di tipo inducibile (5), *S. epidermidis*, OXA-R (11), *S. haemolyticus*, teicoplanino-resistente (TEI-R) (11). *Enterococcus faecalis*, refrattario alla vancomicina e alla teicoplanina (*VanA*) (1), resistente alla vancomicina e sensibile alla teicoplanina (*VanB*) (1), insensibile ad alto livello agli aminoglicosidi (HLAR) (16), *E. faecium* ampicillino-resistente (AMP-R) (11) ed *E. gallinarum* caratterizzato da basso livello di refrattarietà alla vancomicina e sensibile alla teicoplanina (*VanC*) (1). Sono stati inoltre valutati *S. pyogenes* appartenenti al fenotipo Ery-R, C (resistenza costitutiva ad alto livello nei confronti di tutti i macrolidi e di clindamicina, codificato dal gene *ermB*), a quello Ery-R, I (resistenza inducibile determinata da *ermTR*) e infine a Ery-R, M (resistenza a basso livello nei confronti di macrolidi a 14 e 15 atomi e sensibilità a quelli a 16 atomi nonché a clindamicina, conferita dal gene *mefA*) (3-4,17,20). *Escherichia coli*, resistente all'ampicillina (AMP-R) dovuta a produzione di penicillinasi (questo studio), AMP-R ma resistente agli inibitori delle β -lattamasi TEM (IRT) (9), produttore di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL) (10) e resistente alla ciprofloxacina (CIP-R) (9). *Pseudomonas aeruginosa* resistente all'imipenem (IMI-R) (questo studio). Come ceppi di controllo sono stati impiegati *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 35218, per i saggi includenti un β -lattamico e un inibitore di β -lattamasi, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212.

Antibiotici

Le polveri di penicillina, oxacillina, amoxicillina-clavulanato, ceftazidime, imipenem, teicoplanina, vancomicina, gentamicina, streptomina, eritromicina, clindamicina e ciprofloxacina, sono state ottenute da fonti commerciali. Le soluzioni madre sono state allestite secondo le istruzioni del fornitore e diluite nel terreno prescelto.

Saggi di sensibilità agli antibiotici

Le minime concentrazioni inibenti (MIC) sono state determinate con il metodo della microdiluzione in brodo Mueller Hinton (MH) contenente

Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺ o mediante sistema E test. Il metodo Kirby-Bauer della diffusione da dischetto è stato utilizzato in alcuni saggi in parallelo alla valutazione della MIC per confermare ulteriormente il fenotipo di resistenza. I saggi sono stati condotti e interpretati seguendo le linee guida suggerite dal National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002 (13).

Valutazione dei fenotipi di resistenza β -lattamasi in *S. aureus*

La β -lattamasi in *S. aureus* è stata individuata mediante saggio dell'agar diffusione utilizzando dischetti di penicillina e amoxicillina-clavulanato (AUG), il ceppo ha dimostrato resistenza al capostipite dei β -lattamici e sensibilità all'associazione con l'inibitore dell'enzima.

Oxacillino-resistenza in *S. aureus*

L'oxacillino-resistenza inducibile o costitutiva in *S. aureus* è stata messa in evidenza utilizzando il saggio dell'agar screening in duplicato su piastre di Mueller-Hinton agar con 6 mg/L di oxacillina, con e senza il 4% di NaCl e un inoculo di 5×10^5 . La lettura è stata eseguita dopo 24 ore di incubazione. I ceppi sono stati mantenuti ad una temperatura non superiore ai 35.5°C. In queste condizioni il ceppo inducibile è risultato sensibile al farmaco sul terreno privo di sale, mentre lo stiptipo costitutivo ha manifestato resistenza all'oxacillina su entrambi i terreni. *S. epidermidis* OXA-R è stato in grado di crescere alla presenza di oxacillina su terreno MH non contenente NaCl confermando il suo carattere.

Eritromicino-resistenza in *Streptococcus pyogenes*

I tre principali fenotipi Ery-R di *Streptococcus pyogenes* sono stati identificati mediante tecnica del doppio disco. Sulla superficie di una piastra di Mueller-Hinton agar al 5% di sangue di montone sono stati posizionati due dischetti (eritromicina [ERY] 15mg e clindamicina [CLI] 2 mg) ad una distanza di 1.5-2 cm. Dopo incubazione per 24 ore l'assenza di una zona di inibizione la crescita attorno ad entrambi i dischi è stata interpretata come espressione del fenotipo C, mentre un alone di inibizione intorno al dischetto di clindamicina ha indicato il fenotipo M. Infine il fenotipo inducibile è stato rivelato dalla deformazione dell'alone di inibizione intorno al dischetto di clindamicina nella zona adiacente a quello di eritromicina.

Teicoplanino-resistenza in *S. haemolyticus*

S. haemolyticus resistente alla teicoplanina è stato identificato mediante determinazione della minima concentrazione inibente adottando la tecnica

della microdiluzione in brodo (NCCLS, 2002). Il test è stato letto dopo 24 ore di incubazione a 35.5°C.

Produzione di ESBL in *E. coli*

La produzione di ESBL in *E. coli* è stata valutata mediante E test utilizzando le apposite strisce per la valutazione di questo enzima.

Alto livello di resistenza agli aminoglicosidi negli enterococchi

L'alto livello di resistenza agli aminoglicosidi negli enterococchi è stato valutato in piastre di BHIA contenenti 500 mg di gentamicina (GEN) o 2000 mg di streptomina (STR). Per il controllo di qualità di questo test è stato impiegato *E. faecalis* ATCC 29212. Sono stati utilizzati inoculi di 10⁶ CFU per spot. Dopo incubazione per 24 ore in aerobiosi le piastre sono state esaminate, la presenza di una o più colonie o un alone di crescita è stato considerato indice di resistenza. Quando il saggio con la streptomina è risultato negativo è stato incubato nuovamente per altre 24 ore.

Ampicillina-resistenza in *E. faecium*

L'insensibilità all'ampicillina in *E. faecium* è stata determinata mediante antibiogramma.

Resistenza ai glicopeptidi negli enterococchi

Per l'accertamento della refrattarietà ai glicopeptidi è stato utilizzato il metodo della microdiluzione in brodo.

Fenotipi di ampicillino-resistenza in *E. coli*

Il ceppo di *E. coli* AMP-R è un isolato clinico caratterizzato fenotipicamente con il metodo Kirby-Bauer sulla base della sola resistenza all'ampicillina e sensibilità all'amoxicillina-clavulanato. Il ceppo IRT dimostra resistenza sia all'ampicillina sia all'amoxicillina-clavulanato, tutti gli altri fenotipi di sensibilità o resistenza sono stati valutati mediante antibiogramma.

Resistenza all'imipenem in *P. aeruginosa*

P. aeruginosa IMI-R è un ceppo di isolamento clinico identificato fenotipicamente con il metodo Kirby-Bauer sulla base della resistenza all'imipenem.

Sistema Uro-Quick

Lo strumento è dotato di boccettine o cuvette di vetro ottico specifico per la lettura ai raggi laser che contengono un terreno ricco, formulato dal produttore dello strumento e denominato "eugonico" che risulta idoneo per lo sviluppo di tutte le specie batteriche isolabili dalle urine. Alcuni esperimenti preliminari condotti nel nostro labo-

ratorio hanno dimostrato che *S. pyogenes* può crescere in modo soddisfacente in questo substrato. In alcuni saggi, la valutazione della sensibilità agli antibiotici è stata effettuata in Mueller-Hinton brodo sia privo sia con l'aggiunta di NaCl al 4% preparati specificamente dal fornitore. Le cuvette sono state quindi inoculate con il ceppo e inserite nello strumento. Quest'ultimo è collegato ad un computer. Un apposito programma, modificabile in alcuni parametri dall'operatore, gestisce la procedura. Al tempo stabilito i dati ottenuti appaiono sullo schermo sotto forma di grafico della curva di crescita, unitamente al numero di batteri iniziali, al tempo di lettura e ai dati di identificazione del campione. Il programma provvede automaticamente alla stampa dei risultati. Ciascun antibiotico da saggiare è stato aggiunto ai 2 ml di terreno Mueller-Hinton contenuto nella cuvetta Uro-Quick. La concentrazione di antibiotico con la quale cimentare lo stipite in esame è stata calcolata sulla base dei breakpoints suggeriti dall'NCCLS (2002) in modo che il valore fosse tra quelli inclusi nell'intervallo di sensibilità intermedia. Queste concentrazioni sono quelle che hanno dimostrato la migliore riproducibilità dei dati tra quelle valutate in alcuni saggi preliminari. Una boccettina di brodo priva di antibiotico è stata seminata come controllo. L'inoculo del ceppo in esame presente in 0.5 ml di terreno è stato aggiunto al contenitore dello strumento in modo da risultare come carica definitiva compresa tra 5x10⁵ e 1x10⁶ CFU/mL, il volume finale di terreno nella cuvetta risultava 2.5 ml. La lettura è stata effettuata dopo un intervallo di tempo variabile in funzione delle caratteristiche del ceppo considerato. L'assenza di sviluppo della popolazione microbica (sensibilità) è stata registrata da parte dello strumento con una linea piatta, mentre una curva di crescita è stata assunta come indice della capacità del germe di proliferare nonostante la presenza del farmaco (resistenza).

RISULTATI

Nella tabella 1 sono riportati gli antibiotici utilizzati in questo studio, i relativi breakpoints suggeriti da NCCLS e la concentrazione finale di composto alla quale i microrganismi sono stati esposti nella cuvetta Uro-Quick. Nella tabella 2, invece, sono specificate le condizioni di studio utilizzate con lo strumento in particolare sono riportati il terreno utilizzato per la crescita dei microrganismi, i periodi di tempo ottimali per l'incubazione di ciascuna specie batterica e l'inoculo iniziale. Questi parametri sono stati adottati sulla base di esperimenti preliminari che hanno fornito la

migliore riproducibilità dei risultati.

In *S. aureus* produttore di penicillinasi lo strumento Uro-Quick rivela la resistenza alla penicillina già dopo un'incubazione di 300 minuti, tuttavia la lettura dei risultati dopo 480 minuti evidenzia una curva di crescita del tutto paragonabile a quella dei controlli. Quando il germe è stato esposto all'associazione amoxicillina-clavulanato il sistema ha registrato la totale assenza di crescita. Per l'accertamento dell'oxacillino-resistenza nello *S. aureus* sono state allestite apposite cuvette Uro-Quick contenenti MH brodo addizionato di NaCl 4% e altrettante prive di sale. Uroquick ha identificato l'oxacillino-resistenza in *S. aureus mecA* costitutivo e *S. aureus mecA* inducibile in modo inequivocabile dopo 480 minuti di incubazione nel terreno contenente NaCl mentre l'assenza di sale nel terreno di coltura ha reso lo stipite *mecA* inducibile sensibile all'oxacillina. *S. epidermidis* OXA-R ha manifestato il proprio carattere di resistenza in maniera riproducibile dopo incubazione per 480 minuti in cuvette di Uro-Quick contenenti MH brodo privo di NaCl. *S. haemolyticus* resistente alla teicoplanina è stato evidenziato dallo strumento dopo 24 ore di incubazione. Letture eseguite a intervalli di tempo minori hanno fornito risultati non sempre concordanti. Anche il terreno utilizzato per la crescita dei germi ha

dimostrato una certa influenza sulla valutazione di questo carattere di resistenza. Quando i batteri sono stati coltivati in terreno eugonico la resistenza alla teicoplanina è sempre stata accertata in modo riproducibile dopo 24 ore di incubazione in Uro-Quick. Su questo particolare ceppo è stata saggiata anche la sensibilità alla vancomicina ottenendo sempre letture coerenti con il carattere veicolato dal germe. Il ceppo infatti, dopo 24 ore di incubazione, risultava sensibile a questo antibiotico.

Per quanto riguarda gli Enterococchi resistenti ai glicopeptidi, *E. faecalis VanA*, *E. faecalis VanB*, *E. gallinarum VanC*, la refrattarietà alla vancomicina e alla teicoplanina è stata identificata correttamente tramite il sistema Uro-Quick dopo incubazione delle cuvette per 24 ore. In particolare tutti i ceppi veicolanti le resistenze ai glicopeptidi sono stati seminati in doppio e contemporaneamente su terreni contenenti vancomicina e teicoplanina alla concentrazione di 10 µg/ml. Come atteso, il ceppo *E. faecalis VanA* ha dimostrato resistenza sia alla vancomicina sia alla teicoplanina, mentre *E. faecalis VanB* ha evidenziato insensibilità alla sola vancomicina. *E. gallinarum VanC* infine è risultato resistente a basso livello alla vancomicina (10 µg/ml) ma non è stato in grado di tollerare concentrazioni più alte di farmaco (20 µg/ml) lo stipite ha confermato la sua

Tabella 1. Breakpoints degli antibiotici utilizzati in questo studio e concentrazioni di farmaco alle quali i microrganismi sono stati esposti nella cuvetta Uro-Quick

ANTIBIOTICO	BREAKPOINTS µG/ML*	CONCENTRAZIONE NELLA CUVETTA URO-QUICK µG/ML
Penicillina	≤0.1	0.2
Ampicillina (Enterobacteriaceae)	8-32	10
Ampicillina (Enterococcus spp.)	8-16	10
Oxacillina (<i>S. aureus</i>)	2-4	3
Oxacillina (SCN)**	0.25-0.5	0.3
Amoxicillina/Clavulanato	8-32	15
Ceftazidime	8-32	20
Cefotaxime	8-64	20
Imipenem	4-16	7
Ciprofloxacina	1-4	2
Eritromicina	0.25-1	0.5
Clindamicina	0.25-1	0.5
Streptomycin	<1000	1000
Gentamicina	<500	500
Teicoplanina	8-32	10
Vancomicina*** (Enterococcus spp.)	4-32	10
Vancomicina (Staphylococcus spp)	≤4	5

*NCCLS, 2002

** SCN, Stafilococchi coagulasi-negativi

***In alcuni saggi è stata utilizzata la concentrazione di 20 µg/ml (vedi testo)

Tabella 2. Condizioni di studio con il sistema Uro-Quick per la valutazione del carattere di resistenza di ciascuna specie batterica

SPECIE	FENOTIPO	TERRENO UTILIZZATO*	INOCULO (CFU/ML)	TEMPO DI INCUBAZIONE	CRESCITA REGISTRATA**
<i>S. aureus</i>	PEN-R	MH + PEN 0.2 µg/ml	5X10 ⁵	480 minuti	+
<i>S. aureus</i>	PEN-R	MH + AUG 15 µg/ml	5X10 ⁵	480 minuti	-
<i>S. aureus</i>	OXA-R	MH+ 4% NaCl OXA 3 µg/ml	5X10 ⁵	480 minuti	+
<i>S. aureus</i>	OXA-R	MH + OXA 3 µg/ml	5X10 ⁵	480 minuti	+
<i>S. aureus</i>	OXA-R, I	MH + 4% NaCl + OXA 3 µg/ml	5X10 ⁵	480 minuti	+
<i>S. aureus</i>	OXA-R, I	MH + OXA 0.3 µg/ml	5X10 ⁵	480 minuti	-
<i>S. epidermidis</i>	OXA-R	MH + OXA 0.3 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>S. haemolyticus</i>	TEI-R	EUG + TEI 10 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	+
<i>S. haemolyticus</i>	TEI-R	EUG + VAN 5 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	-
<i>E. faecalis</i>	VanA	EUG + TEI 10 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	+
<i>E. faecalis</i>	VanA	EUG + VAN 10 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	+
<i>E. faecium</i>	VanB	EUG + TEI 10 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	-
<i>E. faecium</i>	VanB	EUG + VAN 10 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	+
<i>E. gallinarum</i>	VanC	EUG + TEI 10 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	-
<i>E. gallinarum</i>	VanC	EUG + VAN 10 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	+
<i>E. gallinarum</i>	VanC	EUG + VAN 20 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	-
<i>E. faecalis</i>	HLAR	EUG + STR 1000 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	+
<i>E. faecalis</i>	HLAR	EUG + GEN 500 µg/ml	1X10 ⁶	24 ore	+
<i>E. faecium</i>	AMP-R	MH + AMP 10 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>S. pyogenes</i>	Ery-S	EUG	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>S. pyogenes</i>	Ery-S	EUG + ERY 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	-
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, C	EUG + ERY 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, C	EUG + CLI 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, M	EUG + ERY 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, M	EUG + CLI 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	-
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, M	EUG + CLI 0.5 + ERY 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	-
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, I	EUG + ERY 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, I	EUG + CLI 0.5 g/ml	1X10 ⁶	480 minuti	-
<i>S. pyogenes</i>	Ery-R, I	EUG + CLI 0.5 + ERY 0.5 µg/ml	1X10 ⁶	480 minuti	+
<i>E. coli</i>	AMP-R	MH + AMP 10 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	+
<i>E. coli</i>	AMP-R	MH + AUG 15 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	-
<i>E. coli</i>	CIP-R	MH + CIP 2 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	+
<i>E. coli</i>	AMP-R, IRT	MH + AMP 10 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	+
<i>E. coli</i>	AMP-R, IRT	MH + AMP 10 + AUG 15 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	+
<i>E. coli</i>	ESBL	MH + CAZ 20 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	+
<i>E. coli</i>	ESBL	MH + CTX 20 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	+
<i>E. coli</i>	ESBL	MH + CAZ 20 + AUG 15 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	-
<i>E. coli</i>	ESBL	MH + CTX 20 + AUG 15 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	-
<i>E. coli</i>	ESBL	MH + IMI 7 µg/ml	5X10 ⁵	180 minuti	-
<i>P. aeruginosa</i>	IMI-R	MH + IMI 7 µg/ml	5X10 ⁵	24 ore	+

*MH Mueller-Hinton; EUG eugonico; ** + crescita; - assenza di crescita; Vedi testo per ulteriori dettagli e abbreviazioni

sensibilità alla teicoplanina.

E. faecalis HLAR, caratterizzato da alti livelli di resistenza agli aminoglicosidi, è stato saggiato per streptomina e gentamicina alle concentrazioni di 1000µg/mL e 500µg/mL rispettivamente. Questo ceppo ha richiesto un'incubazione di 24 ore in terreno eugonico perché la resistenza venisse correttamente rilevata dal Sistema Uro-Quick. Letture eseguite a intervalli di tempo minori (6-8 ore) hanno fornito comunque risultati concordanti in circa l'80% dei casi.

Per il saggio con il sistema Uro-Quick di *E. faecium* ampicillino-resistente la curva di crescita ottimale del ceppo in presenza di ampicillina è stata ottenuta dopo un'incubazione di 480 minuti

in terreno Mueller-Hinton.

Per i ceppi di *S. pyogenes* resistenti all'eritromicina sono stati adottati metodi di accertamento che hanno comportato il saggio contemporaneo all'eritromicina, alla clindamicina da sola o in presenza di 0.5 mg/L del capostipite dei macrolidi come induttore di resistenza. In particolare il fenotipo Ery-R, C ha dimostrato crescita in entrambi i terreni contenenti i due distinti antibiotici indipendentemente dalla presenza del composto induttore. Lo stipite di tipo Ery-R, M ha evidenziato resistenza all'eritromicina e sensibilità alla clindamicina anche quando quest'ultima è stata combinata con eritromicina come induttore. Il ceppo con resistenza inducibile all'eritromicina Ery-R, I è

risultato capace di crescere sia in presenza di eritromicina sia in presenza di clindamicina solo se quest'ultima è stata associata al macrolide induttore a 14 atomi.

Per quanto riguarda *E. coli* sia ampicillino-resistente sia refrattario alla ciprofloxacina il sistema Uro-Quick ha identificato tali caratteri in 180 minuti con i ceppi coltivati in Mueller-Hinton. *E. coli* AMP-R, IRT resistente agli inibitori delle β -lattamasi ha dimostrato crescita in terreno contenente ampicillina e l'associazione amoxicillina/clavulanato dopo 180 minuti. Infine *E. coli* produttore di ESBL è risultato resistente a ceftazidime (CAZ) e cefotaxime (CTX). Quando queste ultime cefalosporine sono state associate con amoxicillina-clavulanato o il ceppo è stato cimentato con imipenem il sistema Uro-Quick ha registrato totale assenza di crescita batterica dopo incubazione di 180 minuti in terreno Mueller-Hinton.

P. aeruginosa resistente a imipenem ha manifestato il proprio carattere di refrattarietà dopo 24 ore di incubazione nello strumento Uro-Quick.

CONCLUSIONI

Rispetto alle metodiche tradizionali, i sistemi automatizzati o semiautomatici presentano alcuni fattori critici che più di altri possono influire sul corretto accertamento della resistenza agli antibiotici, tra cui l'inoculo, la specie batterica considerata, la temperatura e il tempo di incubazione, nonché la concentrazione di farmaco alle quali esporre i vari microrganismi.

La valutazione mediante Sistema Uro-Quick delle sensibilità agli antibiotici sia sui ceppi Gram-positivi che su quelli Gram-negativi, quando condotta in condizioni ottimali, come quelle ritrovate qui per le singole combinazioni antibiotico-specie batterica, ha dimostrato totale concordanza con i dati ottenuti utilizzando i metodi tradizionali (Kirby-Bauer, E test). Sperimentando alcune variazioni sul tempo di incubazione e sulla concentrazione finale di antibiotico nella cuvetta Uro-Quick è stato infatti possibile incrementare la riproducibilità dei dati fino al 100%. Studi precedenti avevano già mostrato su saggi condotti direttamente su campioni di urina (senza essere quindi a priori a conoscenza del patogeno coinvolto) concordanze superiori al 90% (14, 15).

Alla luce dei risultati ottenuti sono possibili le seguenti considerazioni: il sistema appare duttile, rapido e programmabile sulla base del patogeno e dell'antibiotico considerato. I ceppi qui studiati non includono tutti i possibili fenotipi ritrovabili nella diagnostica, ma rappresentano un campione significativo di quelli che si incontrano in

ambiente ospedaliero. L'elenco richiede un aggiornamento ed un ampliamento proprio per includere quelle situazioni di resistenza non ancora considerate e per incrementare le informazioni preliminari qui raccolte. Il terreno eugonico qui affiancato al classico Mueller-Hinton risponde bene alle esigenze nutrizionali di molte specie e non appare incidere sulla valutazione di molti fenotipi di resistenza.

Come per altri metodi automatici o semiautomatici alcuni parametri sono risultati fondamentali per l'identificazione dei caratteri di resistenza (6-7), l'inoculo e il tempo di incubazione. Uro-Quick che stima la capacità dei microrganismi di proliferare da valori anche bassi di concentrazione batterica, non evidenziabili dai sistemi ottici tradizionali, può offrire in alcuni casi il vantaggio di una lettura che anticipa il comportamento dei microrganismi rispetto a metodi più tradizionali con un buon guadagno di tempo.

BIBLIOGRAFIA

1. Boisivon A, Thibault M, Leclercq R. Colonization by vancomycin-resistant enterococci of the intestinal tract of patients in intensive care units from French general hospitals. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3: 175-9.
2. Breda E. Principles and technology of the Uro-Quick system for bacteriuria rapid screening. *Galeo* 1996; 4: 11-21.
3. Chelossi E, Platè M, De Leo C, Schito GC. Attività di alcuni antibiotici su *Streptococcus pyogenes* eritromicina-resistenti isolati recentemente in Italia. *GIMMOC*, 1997; 3: 9-20.
4. Chelossi E, Platè M, DeLeo C, Schito GC. Analisi genotipica di *Streptococcus pyogenes* eritromicina-resistenti isolati recentemente in Italia *GIMMOC* 1998; 2: 9-20.
5. Chung M, de Lencastre H, Matthews P, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microb Drug Resist* 2000; 6: 189-98.
6. Felmingham D, Brown DFJ. Instrumentation in antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (suppl S1): 81-5.
7. Ferraro MJ, Jorgensen JH. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. Murray PR, et al.: *Manual of Clinical Microbiology*, Seventh Edition, ASM Press 1999: 1593-600.
8. Iverson D, Fayette R, Johnson C, Shigei J, Peterson E, Pezzlo M. Detection of bacteriuria by a rapid, three hours automated screening method. *Abstr C-39*, ASM. Chicago, USA, 1999.
9. Livermore D, Struelens M, Amornin J, et al. Multicentre evaluation of the VITEK 2 advanced expert system for interpretative reading of antimicrobial resistance tests. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 289-300.
10. Marchese A, Arlet G, Schito GC, Lagrange PH, Philippon A. Detection of SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Italy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:

- 245-8.
11. Marchese A, Debbia EA, Bacca D, Balistreri G, Musolino B, Schito GC. Multidrug-resistant Gram-positive pathogens: an update on current microbiological patterns. *Drugs* 1997; 54: Suppl 6, 11-20.
 12. Marchese A, Saverino D, Debbia EA, Pesce A, Schito GC. Antistaphylococcal activity of cefdinir, a new oral third generation cephalosporin, alone and in combination with other antibiotics, at supra- and sub-MIC levels. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 53-66.
 13. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twelfth informational supplement: M100-S12; Vol. 22. NCCLS, Wayne, PA. 2002.
 14. Roveta S, Debbia EA, Marchese A. Valutazione della sensibilità agli antibiotici di uropatogeni mediante sistema Uro-Quick direttamente sul campione di urine e confronto con il metodo Kirby-Bauer. *GIM-MOC*, 2003, in stampa.
 15. Roveta S, Balistreri MR, Marchese A, Debbia EA. Sistema rapido Uro-Quick per l'esecuzione di antibiogrammi: valutazione comparativa con il sistema Kirby-Bauer. *Abstr* 36; 300. Congr Naz Soc It Microbiol Catania, 2002.
 16. Schito GC, Molinari G, Debbia EA, Shaw KJ, Sabatelli F, Hare RS, Miller GH. Mechanisms of aminoglycoside resistance in a large Italian hospital. *Abstr* A-67, 90th Annual Meeting ASM, 1990.
 17. Seppälä H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother* 1993; 32: 885-91.
 18. Sonak R, Thoholte H. Determination of the number of pathogens in bacterial suspension using laser nephelometry in comparison to the photometry and plate counting method. *Zentralbl. Bakteriol Mikrobiol Hyg* 1985; 260: 329-38.
 19. Soro O, Schito GC, Raggi M. Performance of a new automated method for the detection of bacteriuria. *Abstr* 1598, 7th ECCMID, Vienna, Austria, 1995.
 20. Sutcliffe J, Tait-kamradt A, Wondrack L. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother* 1996; 40: 1817-24.

Eugenio A. Debbia

Università degli Studi di Genova
DISCAT - Sez. Microbiologia-
L.go Rosanna Benzi 10 - 16132 Genova
Tel.: 010 3537655; Fax 010 504837
e-mail: eugenio.debbia@unige.it