Valutazione comparativa di Enterosistem 18 R e di API 20 E in confronto con il sistema automatico VITEK per l'identificazione dei membri della Famiglia delle *Enterobacteriaceae*

A. Di Girolamo, G. Catamo, D. Paludi, A. Faraone, S. Brocco, M. Nicoletti, R. Piccolomini***

*Istituto di Medicina Sperimentale - * Cattedra di Microbiologia, Facoltà di Medicina e Chirurgia Università degli Studi di Chieti*

*** Liofilchem s.r.l., Roseto degli Abruzzi (Teramo)*

Riassunto. 126 stipi batterici appartenenti ai Membri della Famiglia delle *Enterobacteriaceae* (15 specie) sono stati utilizzati per saggiare un nuovo sistema di identificazione di questi germi, l'Enterosistem 18 R (ENT 18 R), in confronto al sistema API 20 E comparativamente al sistema VITEK 30 jr. preso come termine di riferimento.
Entrambi i sistemi (ENT 18 R ed API 20 E) hanno correttamente identificato tutti gli stipiti appartenenti al genere Citrobacter, Hafnia, Morganella, Salmonella e Shigella. Discordanza a livello di specie si è evidenziata per i generi Enterobacter, Klebsiella e Serratia. Il maggior numero di concordanze a livello di specie mostrato da ENT 18 R si è avuto per: *Citrobacter freundii, Hafnia alvei, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Salmonella* spp. e *Shigella sonnei, E.coli, Proteus penneri* e *Serratia liquefaciens.*
Con il sistema API 20 E le percentuali di concordanza, relativamente al genere sono state pari al 89,7% (90,5% per ENT 18 R) e, relativamente alla specie, pari al 79,3% (85,7% per l'ENT 18 R). Pur con le limitazioni insite nella sperimentazione, l'Enterosistem 18 R ha mostrato di possedere, al pari di API 20 E, caratteristiche di accuratezza, di sensibilità e di riproducibilità che lo pongono come valido supporto identificativo di *Enterobacteriaceae* nel laboratorio clinico di batteriologia.

Abstract. To evaluate the accuracy and utility of the ENTEROSISTEM 18 R (ENT 18 R), we conducted a clinical preliminary comparison, with 126 *Enterobacteriaceae* isolates, of the ENT 18 R system with the API 20 E and an automated system, the VITEK 30 Jr., as reference identification.
The ENT 18 R and the API 20 E yielded correct identification of 85,7% and 79,3%, respectively, at the species level. For ENT 18 R and API 20 E, 11 (8.7%) and 12 (9.6%) misidentifications, respectively, were observed.
Although a further study is required, we think that the accuracy and the sensitivity of its identifications of both common and less-common isolates of *Enterobacteriaceae*, makes this new system fairly efficient in clinical bacteriology laboratories.

Introduzione

Nel laboratorio di batteriologia clinica, in concomitanza con l'aumentato numero di esami da eseguire, si riscontra sempre più la necessità di avere a disposizione dei sistemi atti a svelare e semplificare alcune fasi del lavoro manuale, allo scopo di ottenere un'identificazione rapida, accurata ed affidabile di microrganismi a livello sia di "genere" sia di "specie".

Tra i microrganismi importanti clinicamente, la Famiglia delle *Enterobacteriaceae* riveste indubbiamente un'importanza assai rilevante ed ogni nuovo sistema che sia in grado di identificarne al suo interno i vari stipiti, purché affidabile, accurato ed economico (1) quanto i sistemi già in uso, deve essere accolto con interesse dai microbiologi clinici.
Lo scopo della presente nota è quello di illustrare i risultati sperimentali preliminari ottenuti confrontan-

do un nuovo sistema di identificazione di isolati clinici appartenenti ai Membri della Famiglia delle *Enterobacteriaceae*, l'Enterosistem 18 R (Liofilchem s.r.l. - Roseto degli Abruzzi, Teramo) con il sistema API 20 E (Bio-Merieux Italia S.p.A. - Roma) ormai utilizzato in molti laboratori di batteriologia.
Quale termine di riferimento è stato utilizzato il sistema automatico VITEK 30 jr. (Bio-Merieux Italia S.p.A. - Roma) che utilizza delle specifiche cards (GNI) per l'identificazione, attraverso 32 caratteri biochimici, delle *Enterobacteriaceae*.

Materiali e metodi

Mediante i tre sistemi, nel laboratorio di Batteriologia Clinica della Cattedra di Microbiologia dell'Università "G. D'Annunzio" di Chieti, sono stati esaminati 126 stipiti batterici di isolamento clinico appartenenti a 15 specie nell'ambito dei membri della Famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Tabella 1).

Tabella 1. Stipiti batterici sottoposti al saggio comparativo

Genere	Specie	No. ceppi
Citrobacter	freundii	8
Enterobacter	aerogenes	4
Enterobacter	cloacae	15
Enterobacter	sakazaki	2
Escherichia	coli	35
Hafnia	alvei	3
Klebsiella	oxytoca	6
Klebsiella	pneumoniae	13
Morganella	morganii	4
Proteus	mirabilis	24
Proteus	penneri	2
Salmonella	spp.	4
Serratia	liquefaciens	2
Serratia	marcescens	3
Shigella	sonnei	1
	TOTALE	126

Prima dell'effettuazione del saggio di comparazione, tutti i ceppi batterici sono stati fatti sviluppare in Brain Heart Broth (Liofilchem) e successivamente sottocoltivati in piastre di MacConkey Agar (Liofilchem) al fine di assicurare la purezza e la vitalità delle singole colonie.

Enterosistem 18 R
Il sistema è stato concepito per l'identificazione dei Membri della Famiglia delle *Enterobacteriaceae* ossidasi-negativi (4). Esso consiste in una piastra rettangolare di plastica trasparente munita di coperchio nella quale sono posizionati 18 pozzetti contenenti ciascuno, nell'ordine, i substrati per le seguenti reazioni biochimiche di seguito riportate. ONPG test, Lisina-, Ornitina-, Arginina-decarbossilasi, Fenilalanina-deaminasi, utilizzazione del Citrato come unica fonte di Carbonio, Ureasi test, produzione di H_2S, utilizzazione del Malonato come unica fonte di Carbonio, reazione di Voges-Proskauer, Indolo test, fermentazione dei seguenti zuccheri: Glucosio, Mannitolo, Inositolo, Sorbitolo, Saccarosio, Arabinosio, Raffinosio.
Una singola colonia del ceppo in esame è stata emulsionata in 5 ml di soluzione fisiologica sterile e corretta fino a raggiungere una torbidità pari a 1,0 MacFarland.
Quattro gocce (0,2 ml) della singola sospensione batterica sono state poi aggiunte in ogni pozzetto del sistema. Dove specificato, si sono aggiunte due gocce di olio di vaselina sterile per creare le condizioni di anaerobiosi nei pozzetti indicati.
Il sistema è stato poi posto in incubatore regolato a 37°C per un tempo variabile da 8 ore ad un massimo di 24 ore.
L'identificazione del germe in esame è stata effettuata evidenziando le reazioni positive relative ai vari tests ed annotandole su di un apposito modulo di raccolta dati. Tramite il codice numerico ottenuto, si è risaliti al tipo di germe servendosi del Tabulato dei Codici Batterici, che riporta 9.300 codici (edizione 1990).

API 20 E
Il sistema è stato inoculato ed incubato seguendo le indicazioni del fabbricante. Dopo 24 ore di incubazione, i germi sono stati identificati attraverso il codice numerico riscontrabile sul Profil Index del sistema e ottenuto a seguito delle reazioni biochimiche evidenziate dal germe.

VITEK 30 jr.
Il sistema automatico computerizzato, che prevede l'uso di specifiche cards per l'identificazione dei germi Gram-negativi (GNI) contenenti 32 specifiche reazioni biochimiche, è stato utilizzato seguendo le indicazioni del fabbricante.
L'identificazione dei germi in studio è avvenuta in modo automatico sfruttando il software di sistema.

Metodi Convenzionali
Ove necessario, si è proceduto all'identificazione di singole specie batteriche, attraverso l'ausilio di tests biochimici convenzionali secondo le metodiche di Edwards ed Ewing (2,3).

Controllo di Qualità
Ceppi di referenza per il controllo di qualità sono stati inseriti nei tests di identificazione sia quando si sono impiegati i due sistemi a confronto sia per il sistema preso come riferimento. I ceppi sono stati i seguenti: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella penumoniae* ATCC 13882 e *Proteus vulgaris* ATCC 13315. Questi ceppi sono stati saggiati in tre separate occasioni al fine di accertare la riproducibilità dei risultati ottenuti dall'Enterosistem 18 R.

Risultati

Dei 126 stipiti batterici sottoposti al saggio comparativo tra i due sistemi non automatici confrontati

con il sistema automatico VITEK, 114 sono stati correttamente identificati, a livello di genere, da parte dell'Enterosistem 18 R; mentre 113 lo sono stati da parte di API 20 E (Tabella 2).

Tabella 2. Identificazioni concordanti a livello di "genere" del sistema ENTEROSISTEM 18 R (ENT 18 R) ed API 20 E confrontati col sistema VITEK

Genere	No.	No. concordanze ENT 18 R	API 20 E
Citrobacter	8	8	8
Enterobacter	21	16	14
Escherichia	35	35	33
Hafnia	3	3	3
Klebsiella	19	15	17
Morganella	4	4	4
Proteus	26	26	26
Salmonella	4	4	4
Serratia	5	2	3
Shigella	1	1	1
TOTALE	126	114 (90,5%)*	113 (89,7%)*

* = % di concordanza (ACCURATEZZA) con VITEK a livello di genere

Entrambi i sistemi hanno identificato, in modo corretto, tutti gli stipiti appartenenti al genere Citrobacter, Hafnia, Morganella, Salmonella e Shigella.
Completa è stata anche la concordanza, sempre a livello di "genere", dell'Enterosistem 18 R per il genere Escherichia.
L'Enterosistem 18 R per i 21 *Enterobacter* spp. ha fornito 5 interpretazioni discordanti (Tabella 3) delle quali in 3 casi gli stipiti sono stati riconosciuti come *E.coli* e in 2 casi, rispettivamente, come *Klebsiella pneumoniae e Klebsiella ozaenae*; dei 4 stipiti di *Klebsiella* spp. due sono stati identificati, rispettivamente, uno come *E.coli* e l'altro come *Hafnia alvei*, mentre per due volte il sistema non ha fornito un codice numerico compreso nel Tabulato dei Codici Batterici, pur essendo i risultati delle prove biochimiche previste nel sistema risultati concordanti con quelli ottenuti dall'API 20 E e dal sistema VITEK; infine, per le 5 *Serratia* spp., l'Enterosistem 18 R ha fornito due identificazioni discordanti (*Enterobacter cloacae e Klebsiella ozaenae*, rispettivamente).
Sempre in Tabella 3 sono, inoltre, riportate le identificazioni discordanti, a livello di genere, mostrate dall'API 20 E.

Tabella 3. Identificazioni discordanti nel "genere" mostrate dall'ENTEROSISTEM 18 R (ENT 18 R) e dall'API 20 E in confronto col sistema automatico VITEK.

Genere	No.	IDENTIFICAZIONE ENT 18 R	No.	API 20 E	No.
Enterobacter	21	E.coli	3	E.coli	2
		K.pneumoniae	1	K.pneumoniae	3
		K.ozaenae	1	K.ozaenae	1
				K.oxytoca	1
Escherichia	35			Ent. cloacae	1
				K.oxytoca	1
Klebsiella	19	E.coli	1	E.coli	2
		Hafnia alvei	1		
		Non Identif.	2		
Serratia	5	Ent.cloacae	1		
		K.ozaenae	1(*)	K.ozaenae	1(*)

(*)= Sia l'ENTEROSISTEM 18 R che l'API 20 E hanno identificato lo stesso stipite come K.ozaenae, a differenza del VITEK che ha riconosciuto il medesimo stipite come Serratia marcescens

Tabella 4. Identificazioni discordanti nella "specie" mostrate dall'ENTEROSISTEM 18 R (ENT 18 R) e dell'API 20 E in confronto col sistema automatico VITEK.

Microrganismi Identificati con VITEK	No.	IDENTIFICAZIONE ENT 18 R	No.	API 20 E	No.
Enterobacter aerogenes	4	Enterobacter cloacae	1	Enterobacter cloacae	2
Enterobacter sakazaki	2			Enterobacter cloacae	2
Klebsiella oxytoca	6	Klebsiella pneumoniae	1	Klebsiella pneumoniae	2
		Klebsiella ozaenae	1		
Klebsiella pneumoniae	13	Klebsiella oxytoca	1		
		Klebsiella ozaenae	2	Klebsiella ozaenae	4
Proteus penneri	2			Proteus vulgaris	2
Serratia liquefaciens	2			Serratia marcescens	1
Serratia marcescens	3	Serratia liquefaciens	1	Serratia liquefaciens	1

Tabella 5. Concordanza e discordanza di identificazione, a livello di "genere" e di "specie" mostrate dai sistemi ENTEROSISTEM 18 R (ENT 18 R) ed API 20 E confrontati col sistema VITEK.

Microrganismi Identificati con VITEK	No.	ENT 18 R Concordanza	ENT 18 R Discordanza a livello di: "genere"	ENT 18 R Discordanza a livello di: "specie"	API 20 E Concordanza	API 20 E Discordanza a livello di: "genere"	API 20 E Discordanza a livello di: "specie"
Citrobacter freundii	8	8	–	–	8	–	–
Enterobacter aerogenes	4	3	–	1	2	–	2
Enterobacter cloacae	15	10	5	–	8	7	–
Enterobacter sakazaki	2	2	–	–	0	–	2
Escherichia coli	35	35	–	–	33	2	–
Hafnia alvei	3	3	–	–	3	–	–
Klebsiella oxytoca	6	3	1	2	3	1	2
Klebsiella pneumoniae	13	7	3	3	8	1	4
Morganella morganii	4	4	–	–	4	–	–
Proteus mirabilis	24	24	–	–	24	–	–
Proteus penneri	2	2	–	–	0	–	2
Salmonella spp.	4	4	–	–	4	–	–
Serratia liquefaciens	2	2	–	–	1	–	1
Serratia marcescens	3	0	2	1	1	1	1
Shigella sonnei	1	1	–	–	1	–	–
TOTALE	126	108	11	7	100	12	14
% di concordanza		85,70%			79,30%		

In Tabella 4 sono riportate le identificazioni discordanti, a livello di specie, mostrate dai due sistemi a confronto.

L'Enterosistem 18 R, in particolare, ha identificato come *Enterobacter cloacae* 1 ceppo dei 4 *E. aerogenes*. Di 6 *Klebsiella oxytoca*, due ceppi sono stati erroneamente identificati come *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella ozaenae*. Nei confronti delle 13 *Klebsiella pneumoniae*, una è stata identificata come *Klebsiella oxytoca* e due come *Klebsiella ozaenae*. Riguardo ai tre stipiti di *Serratia marcescens*, il sistema ha identificato 1 ceppo come *Serratia liquefaciens*.

Discussione e Conclusione

Indicando con il termine ACCURATEZZA la percentuale di concordanza del metodo in esame con quello di confronto (VITEK), si può affermare, dalle prove eseguite, che l'Enterosistem 18 R si è mostrato accurato con una concordanza di identificazione degli stipiti in esame pari al 90,5% relativamente al genere, e dell'85,7% relativamente alla specie (Tabella 5).

Con il sistema API 20 E le percentuali di concordanza, relativamente al genere, sono state pari all'89,7% e, relativamente alla specie, pari al 79,3% (Tabella 5).

Il maggior numero di concordanze a livello di specie si è avuto per *Citrobacter freundii, Hafnia alvei, Morganella morganii, Proteus mirabilis, Salmonella* spp. e *Shigella sonnei* (100% per entrambi i sistemi); *E.coli, Proteus penneri e Serratia liquefaciens* (100% con il sistema Enterosistem 18 R).

In entrambi i casi, ottima è stata la riproducibilità (100%) che permette di affermare, pertanto, che il sistema Enterosistem 18 R è preciso quanto l'API 20 E.

La sensibilità e la specificità dell'Enterosistem 18 R, inoltre, sono sembrate leggermente superiori a quelle dimostrate dall'API 20 E in questa sperimentazione.

In conclusione, e con le limitazioni insite nel presente studio, dalla valutazione comparativa dei due sistemi si può evincere come l'Enterosistem 18 R pos-

segga caratteristiche che lo rendano facilmente inseribile al pari dell'API 20 E nella routine di un laboratorio di batteriologia clinica per una corretta identificazione dei Membri appartenenti alla Famiglia delle *Enterobacteriaceae*.

Da suggerire, inoltre, che in virtù della ottima lettura e riproducibilità dei risultati evidenziati nei pozzetti, della razionalità con cui sono state disposte le prove biochimiche nel supporto, il sistema Enterosistem 18 R potrebbe essere considerato ai fini di un'automazione del sistema, pur con le dovute considerazioni al riguardo.

Ringraziamenti

Si desidera ringraziare la LIOFILCHEM s.r.l. - Roseto degli Abruzi (TE) - per il supporto tecnico prestato.

Bibliografia

1. Bartlett RC. Establishing clinical relevance. p. 9-43. Medical Microbiology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1974.
2. Edwards PR, Ewing WH (ed.). Identification of *Enterobacteriaceae* 3rd ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis 1972.
3. Ewing WH. Differentiation of *Enterobacteriaceae* by biochemical reactions, revised. U.S. Department of Health. Education, and Welfare publication no. (CDC) 74-8270. Center for Disease Control, Atlanta 1973.
4. Piccolomini R, Di Girolamo A, Catamo G, Cellini L, Allocati N, Ravagnan G. Enterosistem 18-R: description and comparative evaluation with conventional methods for identification of members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol., 29, (10), 2300-2304, 1991.