

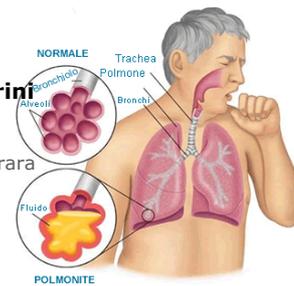
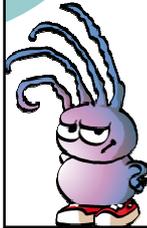
Seminari di aggiornamento sulle infezioni emergenti: *Polmoniti*

Aula 1.36.16 – Polo didattico - Ospedale di Cona
17 novembre 2015

Diagnosi Microbiologica di polmonite

Rossi Maria Rita - Maria Cinzia Ballarini

UO Semplice di Microbiologia e Sierologia
Laboratorio Unico Provinciale AOU S. Anna Ferrara

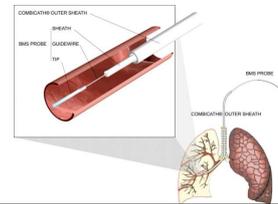


Indagini microbiologiche La fase pre-analitica

- Solo un **campione di buona qualità** pone le premesse per un risultato di buona qualità in termini biologici e clinici
- E' fondamentale ricordare che il **prelievo dei campioni deve essere effettuato a partire dalle basse vie respiratorie**, possibilmente prima dell'inizio della terapia antibiotica, che deve poi essere immediatamente iniziata nei pazienti critici
- Se il materiale viene raccolto con metodica invasiva, **l'affidabilità del risultato microbiologico è proporzionale anche all'esperienza dell'operatore-endoscopista che procede al prelievo**

Tipologia di campioni

- **Ad alto rischio di contaminazione salivare**
 - Espettorato
 - Espettorato indotto
 - Espettorato protetto
 - Aspirato endotracheale
 - Aspirato tracheostomia
 - Lavaggio bronchiale o broncoaspirato
- **A basso rischio di contaminazione salivare**
 - Aspirato transcricoideo
 - Aspirato endotracheale/bronchiale
 - Lavaggio broncoalveolare (BAL)
 - Spazzolatura endobronchiale protetta
 - BAL mirato con cateterino
 - Plugged telescoping catheter (PTC)



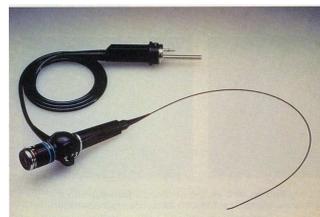
Secrezioni respiratorie Quali tecniche di raccolta/prelievo? Pazienti non ventilati

CAP A domicilio o in ospedale

Espettorato

Lavaggio bronchiale

praticato *solo per approfondire*
diagnosi incerte e poco specifiche

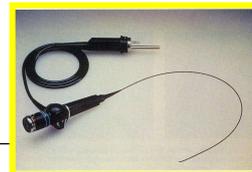


ESPETTORATO DOC 287-AZ MICRO Vers. 6

- L'indagine microbiologica delle secrezioni delle basse vie respiratorie viene richiesta soprattutto per la diagnosi di **bronchite cronica riacutizzata** o **polmonite**.
- L'inevitabile contaminazione del campione con saliva però limita molto l'utilità di questa ricerca nella pratica clinica.
- Il protocollo standard prevede l'esecuzione di un **esame microscopico** per valutare (secondo Bartlett) l'idoneità del campione per indagini microbiologiche (presenza e numerosità di cellule epiteliali del cavo orale o "cellule di sfaldamento", e/o di globuli bianchi) e la presenza di flora microbica. Sui campioni idonei si procede all'**esame culturale** e alla determinazione della carica semiquantitativa di batteri "non esigenti" e "esigenti" (tra cui *Haemophilus* species).
- Ricerche particolari che richiedono l'utilizzo di terreni supplementari e/o di tecniche particolari (Nocardia, miceti filamentosi ecc...) dovranno essere segnalate all'atto della prenotazione o contattando la Microbiologia.
- **Materiali necessari**
- Contenitore sterile a bocca larga con tappo a vite
- **Modalità di raccolta**
- Raccogliere l'espettorato al momento del risveglio perché la secrezione è più abbondante
- Raccogliere l'espettorato preferibilmente lontano dall'assunzione di cibo
- Sciacquare il cavo orale con acqua prima della raccolta del campione dopo aver grattato gentilmente, con spazzolino da denti morbido la mucosa interna delle guance, le gengive e la lingua
- Rimuovere sempre eventuali protesi dentarie
- Raccogliere almeno 3-5 ml di materiale
- Non raccogliere in modo cumulativo i campioni respiratori
- Espettorare in un contenitore sterile a bocca larga e con tappo a vite
- Evitare l'introduzione di materiale salivare o di secrezioni nasali nel contenitore. In caso contrario ripetere la procedura dall'inizio.
- Effettuare la raccolta preferibilmente in presenza di personale addestrato (infermiere o fisioterapista).
- Nel caso di scarsa espettorazione spontanea è possibile indurre l'espettorato sottoponendo il paziente a manovre di fisioterapia e ad inalazione di 20-30 ml di soluzione fisiologica, con l'ausilio di un nebulizzatore ultrasonico.
- E' possibile anche la raccolta di secrezioni respiratorie da **tracheotomia**.
- La raccolta di quest'ultimo materiale è di specifica competenza del medico specialista.
- **Conservazione e invio**
- I campioni devono essere inviati al più presto in Laboratorio o conservati in frigorifero a +4°C fino a 24 ore.

Tecniche broncoscopiche

- Lavaggio bronchiale[^]
- Lavaggio bronco-alveolare
 - Lavaggio bronco-alveolare mirato con cateterino *
 - Spazzolatura endobronchiale protetta *



[^] Materiali ad alto rischio di contaminazione con saliva

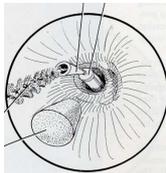
*Materiali raccolti con *metodiche protette, a bassa contaminazione con saliva*

Secrezioni respiratorie Quale tecniche di prelievo? Pazienti Ventilati

CAP

Tecnica di prelievo non broncoscopica

- ◆ Aspirato endotracheale/bronchiale (**BASP**)



HAP/ARDS

Hospital-Acquired Pneumonia/ Acute Respiratory Distress Syndrome

Tecniche di prelievo in broncoscopia per prelievi batteriologici mirati

- ◆ Lavaggio bronco-alveolare (**BAL**)
- ◆ Spazzolatura endobronchiale protetta (**PSB**)
- ◆ Lavaggio bronco-alveolare con cateterino

BRONCOASPIRATO – BRONCOLAVAGGIO DOC-287 AZ MICRO Vers.6

- Secrezioni bronchiali raccolte con "prelievo protetto" rappresentano il materiale di elezione per la diagnosi eziologica delle infezioni delle basse vie respiratorie (**polmoniti, accessi polmonari**). Tale modalità di prelievo consente la raccolta di materiale a bassa contaminazione salivare, ma richiede la messa in atto di procedure invasive; trova quindi indicazione a fronte di quadri clinici di particolare gravità, nel sospetto di forme eziologiche inusuali o che richiedano terapie mirate (infezioni fungine, infezioni ospedaliere).
- Il protocollo standard prevede l'esecuzione dell'esame microscopico (presenza e numerosità di cellule epiteliali del cavo orale o "cellule di sfaldamento", cellule bronchiali, globuli bianchi, batteri o miceti) (interpretazione secondo Bartlett) e delle ricerche colturali, indirizzate alla ricerca di un ampio spettro di batteri e miceti. Il risultato dell'esame colturale è espresso in forma quantitativa. Gli agenti eziologici di polmonite sono generalmente presenti in alte concentrazioni nelle secrezioni respiratorie ($\geq 100.000-1.000.000$ UFC/ml); quando il materiale è raccolto correttamente la popolazione microbica contaminante delle alte vie respiratorie è presente in concentrazioni < 10.000 UFC/ml.
- Su broncoaspirato e bronco lavaggio può essere effettuata la ricerca mirata di *Pneumocystis jirovecii*.
- **Materiali necessari**
- Contenitore sterile a bocca larga, con tappo a vite
- In alternativa set di raccolta per bronco aspirato o broncolavaggio
- **Modalità di prelievo**
- La raccolta di secrezioni respiratorie attraverso "prelievo protetto" costituisce manovra di competenza del Medico specialista.
- **Conservazione e invio**
- I campioni devono essere inviati al più presto in Laboratorio o conservati in frigorifero a +4°C fino a 24 ore.

Criticità nella fase preanalitica

Identificazione del paziente	Incongruenze tra prenotazione e campione
Adeguatezza del contenitore	Contaminazione e rischio biologico
Tempo intercorso dal prelievo e modalità di conservazione	Perdita vitalità del patogeno o sovracrescita dei contaminanti
Quantità	Se insufficiente: rischio falsi negativi
Idoneità	Salivare: alta contaminazione da flora orale

INDAGINI MICROBIOLOGICHE

Verifica correttezza fase preanalitica

Esame batterioscopico (Valutazione Idoneità Campione)

Referto preliminare

Referto definitivo

(non idoneo per semina)

Pretrattamento del campione

Esame colturale per comuni germi

Lettura risultati

Interpretazione

Referto definitivo

ESAME MICROSCOPICO

Escreato, BAS

- Scegliere porzioni purulente del campione
- Stendere il materiale a velo sottile su vetrino
- Asciugare sotto cappa a flusso laminare
- Il coloratore automatico fissa prima di colorare.

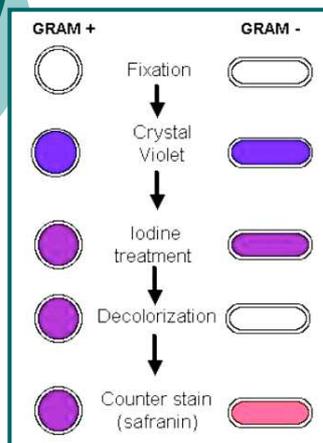
Le operazioni di agitazione e allestimento del vetrino sono da compiere sotto cappa a flusso laminare

BAL, BAL con cateterino, Spazzolato protetto

- Agitare sul vortex per 30-60"
- Allestire 2 o più vetrini citocentrifugando 150 μ l a 600-1000 rpm per 10'
- Asciugare sotto cappa a flusso laminare
- Il coloratore automatico fissa prima di colorare.

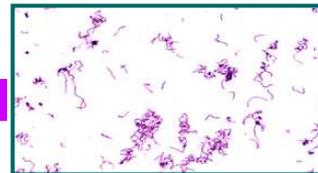
Colorazione di Gram

Fasi della colorazione

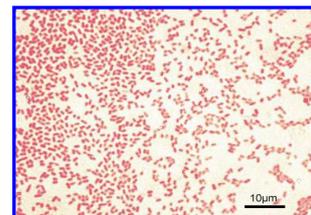


Aspetto microscopico

Gram-positivi

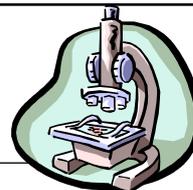


Gram-negativi



Esame microscopico

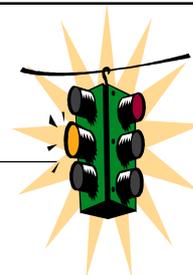
per valutazione del campione respiratorio



- ❑ **Ingrandimento 10x**, almeno 20-30 campi per valutare (Bartlett o Murray e Washington) presenza e quantità :
 - ❑ cellule epiteliali di sfaldamento (CS),
 - ❑ globuli bianchi (GB) Attenzione ai pazienti neutropenici!
 - ❑ muco
- ❑ **Ingrandimento 100x** a immersione, per valutare presenza e quantità di batteri o miceti descrivendo i morfotipi presenti



Valutazione del campione respiratorio

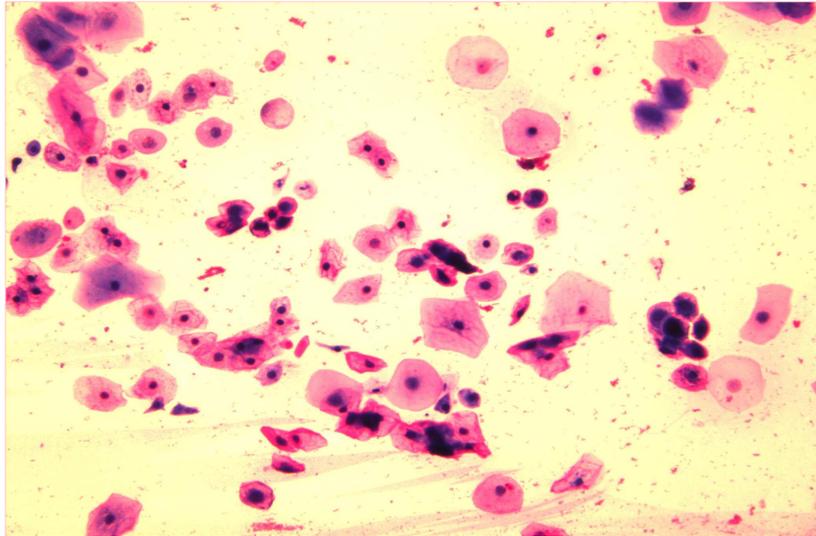


- ❑ **< 25 CS/campo/10X** → IDONEO per la coltura
- ❑ **> 25 CS/campo/10X** → campione contaminato da saliva
 - ❑ Se **escreato** o **BASP NON IDONEO** per la semina
 - ❑ Se **BAL** si procede comunque alla semina

I campioni per ricerca Legionella spp non necessitano di valutazione microscopica

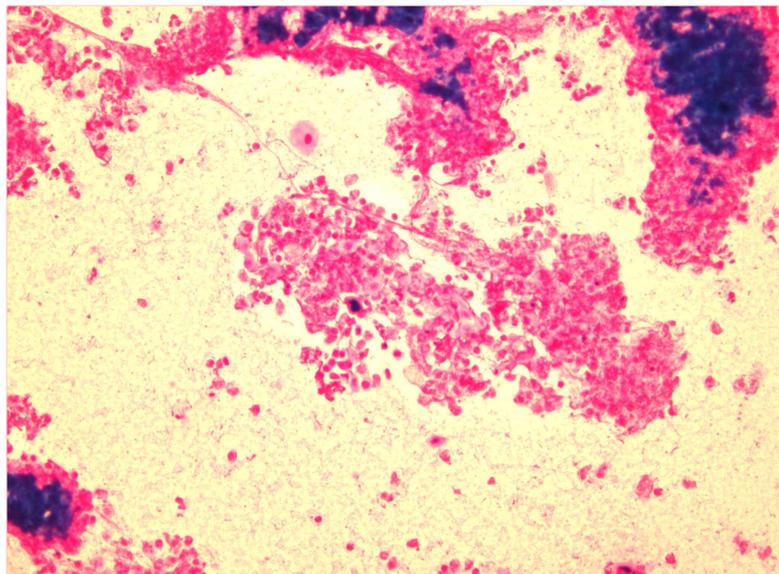
Escreato esame microscopico:

>25 cellule di sfaldamento/campo → campione non idoneo per la semina

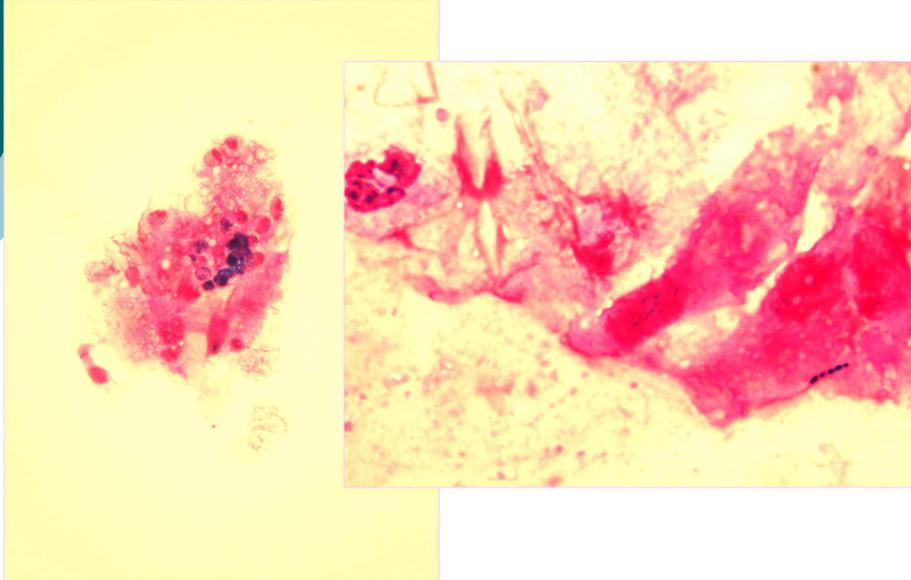


BASP esame microscopico:

>25 leucociti/campo → campione idoneo per la semina

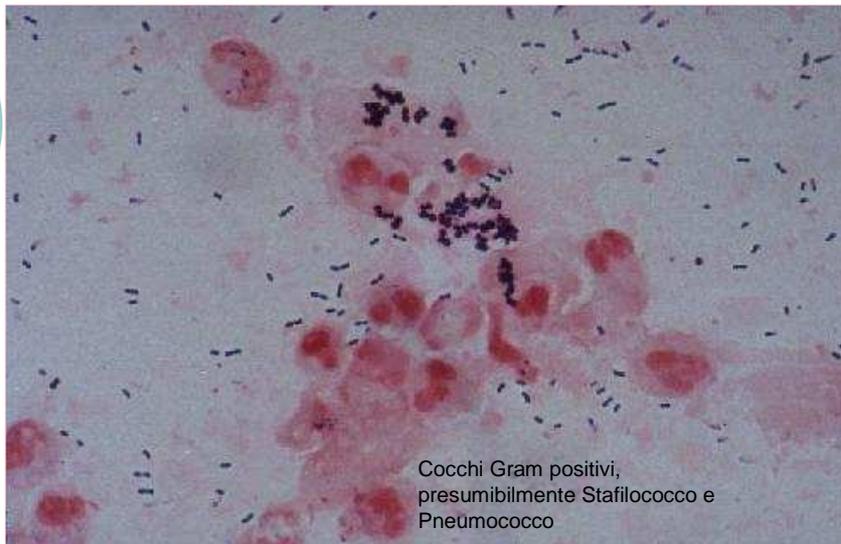


BAL- Esame microscopico



Campioni idonei per la semina

valutazione morfotipo germi presenti (100X)

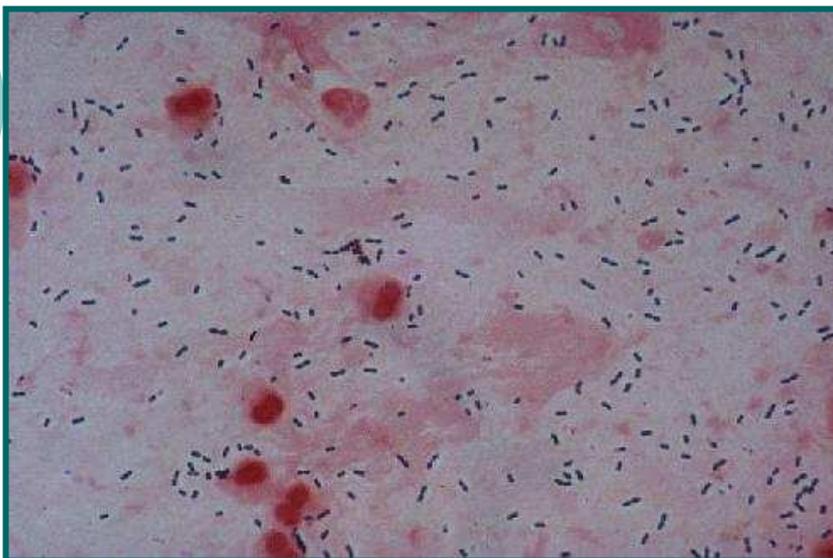


Cocchi Gram positivi,
presumibilmente Stafilococco e
Pneumococco

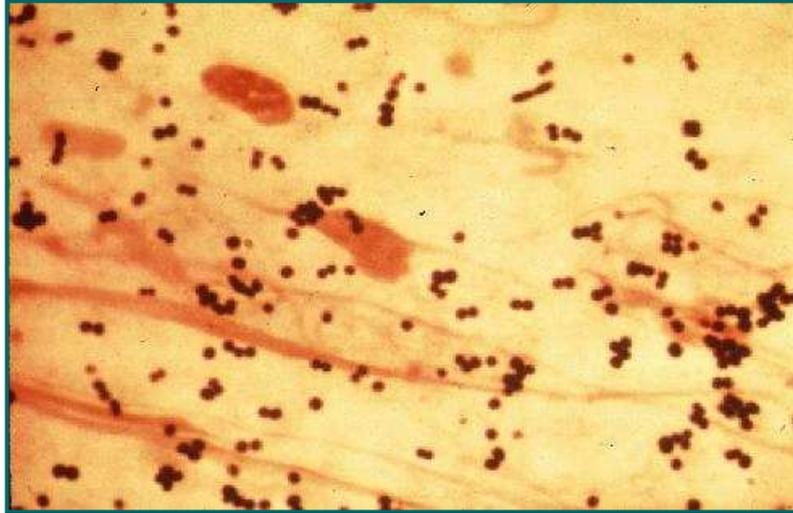
Candida spp nello sputo



Streptococcus pneumoniae nello sputo



Staphylococcus spp. nello sputo



Refertazione preliminare

- I risultati dell'esame microscopico devono essere **riferiti tempestivamente**, soprattutto se il materiale risulta non idoneo per l'indagine microbiologica

Esame colturale basse vie respiratorie

Esame microscopico (refertazione rapida)



La contaminazione con la flora del cavo orale compromette il risultato dell'esame colturale

Materiale Biologico Idoneo

Esame colturale

Isolamento batteri e miceti

Identificazione
Antibiogramma



SEMINA ROUTINE
Agar Sangue - terreni selettivi
Incubazione 24-48h 35/37°C
Agar Cioccolato CO2
Incubazione 24-48 h 35/37°C
Ricerca MICETI
terreno selettivo
Incubazione 5gg 35/37°C



Vitek2



✦ Previa fluidificazione

✦ Esame colturale: protocollo minimo

*Enterobacteriaceae, Non fermentanti, Haemophilus spp.
Moraxella catarrhalis, S.aureus, S.pneumoniae, S.pyogenes*

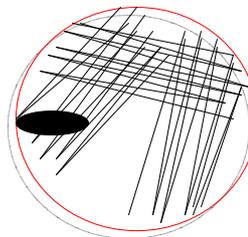


Terreni

- ♥ **Agar sangue** (5% di cavallo o montone)
 - Incubare 35-37°C 24-48 h in aerobiosi
- ♣ **McConkey**
 - Incubare 35-37°C 24-48 h in aerobiosi
- ♣ **Agar cioccolato**
 - Incubare 35-37°C 24-48 h in 5-10% di CO₂

Semina

Seminare utilizzando la tecnica delle tre zone



Depositare **10 µl**, **20 µl** se il campione è fluidificato 1:1, **100 µl** se brushing e strisciare 5 volte avanti e indietro girando la piastra 3 volte

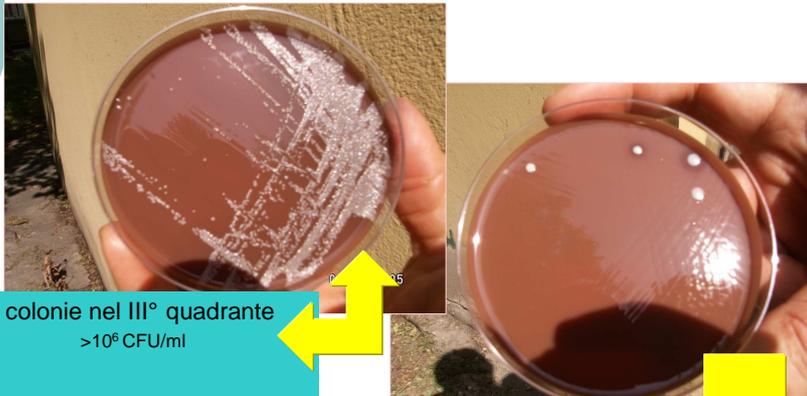
Esame colturale: quantificazione della crescita

I quadrante	II quadrante	III quadrante	CFU/ml
<10	-	-	10^3
<10	<10	-	10^4
>10	>10	<10	10^5
>10	>10	>10	10^6

N°colonie

Carica batterica approssimativa ottenuta seminando $10 \mu\text{l}$
($20 \mu\text{l}$ se il campione è fluidificato 1:1)

Esame colturale: quantificazione della crescita



>10 colonie nel III° quadrante
> 10^6 CFU/ml

<10 colonie nel I° quadrante
< 10^3 CFU/ml

Interpretazione dei risultati

- **Le colture sono spesso polimicrobiche**
- La determinazione della carica aiuta a **discriminare** i microrganismo responsabili di infezione dai contaminanti
- **La negatività** della coltura in assenza di un nuovo trattamento antibiotico nelle 72 ore precedenti **esclude una polmonite batterica (VPN 94%)** ma non possono essere escluse infezioni virali, da *Legionella* e da altri patogeni atipici inclusi *M.pneumoniae* e *C.pneumoniae*
- Il monitoraggio di routine dell'aspirato tracheale per anticipare l'eziologia di un eventuale quadro di polmonite è spesso confondente perché **l'evoluzione clinica del dato microbiologico non è prevedibile**

Esame colturale: interpretazione dei risultati

Materiale	Carica batterica significativa
Escreato *	10⁵
BASP*	
BAL	10⁴
BAL mirato con cateterino	10³
Spazzolato protetto	10³

*La carica batterica della flora orofaringea è **< 10⁴** (nel prelievo correttamente eseguito)

La carica batterica dei patogeni è di solito $\geq 10^6$

Un **cut off** di **10⁵** per la flora patogena, sembra essere appropriato per includere le infezioni in trattamento antibiotico e quadri clinici iniziali

IDENTIFICAZIONE E REFERTAZIONE

Strepto α -emolitici	Solo <i>S.pneumoniae</i>
Strepto β -emolitici	Solo <i>S.pyogenes</i> e nel neonato <i>S.agalactiae</i>
Bacilli Gram positivi	Solo se colonie sospette di <i>Nocardia</i> e <i>Rodococco</i>
<i>Haemophilus</i> spp.	Se predominante nel Gram o in coltura
<i>Neisseria</i> e <i>Moraxella</i> spp.	Se predominante nel Gram o in coltura o presente nei GB
Lieviti	Segnalare solo se in alta carica, la diagnosi di infezione è SOLO ISTOLOGICA
Enterococchi, Enterobatteri e Non-fermentanti (di 1o 2 tipi), <i>S.aureus</i>	Solo se in carica $10^5 - 10^6$

Ricerche mirate

- Nel caso di **sospetto clinico basato su dati clinici particolari** (viaggi internazionali, contatti con animali, soggetti con fibrosi cistica) è necessario ricorrere a **terreni selettivi e differenziali oltre che a modalità di incubazione protratta**
- Es: *Nocardia* spp., *R.equii*, *B.cepacia*

Diagnosi micologica di infezione delle basse vie respiratorie

- Le polmoniti da **Candida spp** sono molto rare
 - primarie (per aspirazione)
 - secondarie a una infezione invasiva (via ematogena)
- La coltura per Candida e altri lieviti trova giustificazione **solo nell'ambito di programmi di valutazione della colonizzazione** in pazienti ricoverati in Terapia intensiva come parte della valutazione di rischio di infezione invasiva all'interno di uno score.
 - VPN molto alto, VPP molto basso
- Per sospetta infezione da *Cryptococcus neoformans* è indicata la rilevazione dell'antigene su siero e l'esecuzione di emocolture
- La diagnosi di infezioni da miceti dimorfi è istopatologica
- *Pneumocystis jirovecii* si ricerca sulle secrezioni bronchiali con tecniche di immunofluorescenza



Streptococcus pneumoniae

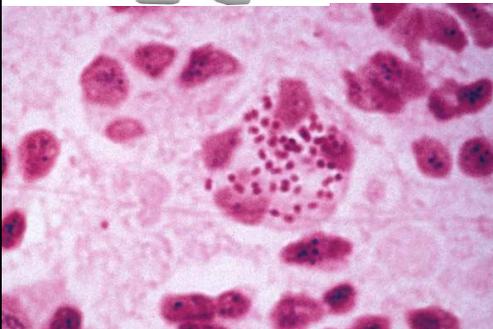


ASM MicrobeLibrary.org © Buxton

Haemophilus influenzae

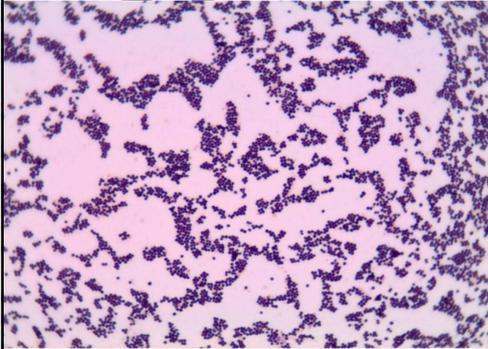


Moraxella catarrhalis





S.aureus



Immagini tratte da colture positive



S.aureus



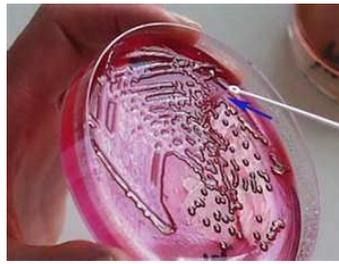
Pneumococco



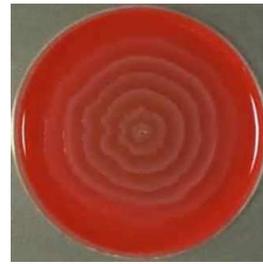
Haemophilus spp



E.coli



Klebsiella spp

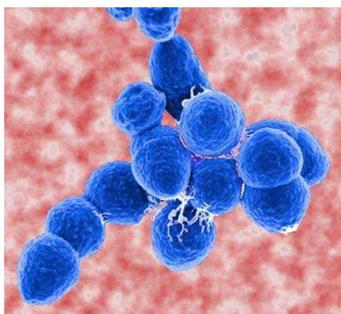


Proteus spp

Diagnosi: altri test

○ Antigeni urinari

- *Streptococcus pneumoniae*
- *Legionella pneumophila* sierogruppo 1



Copyright © 2001 Dennis Kunkel Microscopy, Inc. / Dennis Kunkel

FERRARA - 28 SETTEMBRE 2012 CONGRESSO NAZIONALE
Legionelle e Legionellosi: mito e realtà

Diagnosi di laboratorio dell'infezione umana

Metodo colturale

Vantaggi

E' ritenuto il **metodo di elezione** per la diagnosi di legionellosi

- Rileva **tutte le specie e sierogruppi**;
- Permette **studi comparativi** con i ceppi di *Legionella* isolati dall'**ambiente** al fine di individuare la **fonte dell'infezione**.

Svantaggi

- Richiede un **terreno specifico**;
- **Adeguate trattamento** del campione;
- **3-4 gg** per rilevare la crescita delle colonie;
- **Esperienza**;
- Non facile **reperibilità dei campioni**.

Sensibilità: 5-90%

Specificità : 100%



Antigene urinario *Legionella* BinaxNOW®

- Test immunocromatografico validato solo su urine (fresche o conservate a +2-8°C per 14 giorni o a -20°C per periodi prolungati)
- Rileva un antigene solubile di natura lipopolisaccaridica di *Legionella pneumophila* sierogruppo 1
- L'antigene è rilevabile dopo 3 giorni dalla comparsa dei sintomi e può persistere fino a un anno

Antigene urinario *Legionella* BinaxNOW® PERFORMANCE

- Valutato solo su pazienti ospedalizzati
- Testato su 300 pazienti (urine conservate) di cui 100 affetti da infezione da *Legionella pneumophila* come determinato da coltura, DFA, RIA o IFA
- Sensibilità = 95%
- Specificità = 95%
- Accuratezza = 95%

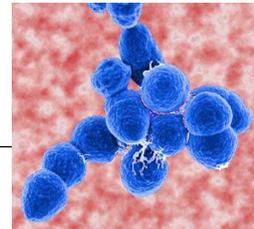


Antigene urinario

Legionella pneumophila sierogrupo 1 BinaxNOW® REFERTAZIONE

- **POSITIVO: presunta infezione** in corso/pregressa da *Legionella pneumophila* sierogrupo 1
- **NEGATIVO: presunto negativo** per infezione in corso/pregressa da *Legionella pneumophila* sierogrupo 1
 - altri sierogruppi e specie potrebbero causare la malattia
 - l'antigene potrebbe non essere presente nell'urina in fase precoce
 - il livello di antigene potrebbe essere inferiore al limite di rilevamento del test

BinaxNOW® *Streptococcus pneumoniae*



- Tipo di campione: urine, liquido cerebrospinale
- Tempi di attesa per il risultato: 15 minuti
- Dati sulle prestazioni:
 - Sensibilità/Specificità **urine**: 86% / 94%
 - Sensibilità/Specificità **liquido cerebrospinale**: 97% / 99%

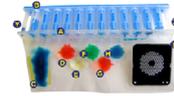


Diagnosi: altri test

□ Test per virus respiratori

Indicati nei pazienti ospedalizzati

- Pannello **Respiratori in PCR**
- Pannello Influenza **A-B e variante H1N1/RSV** in PCR



□ Sierologia

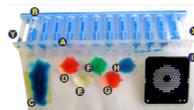
- *C. pneumoniae, Mycoplasma, Legionella spp*

Risposta tardiva, talvolta inaffidabile



FilmArray® System User Friendly Multiplex PCR

Pannello Respiratori FDA Cleared



Idaho Technology Inc.

Risultati in 1 ora

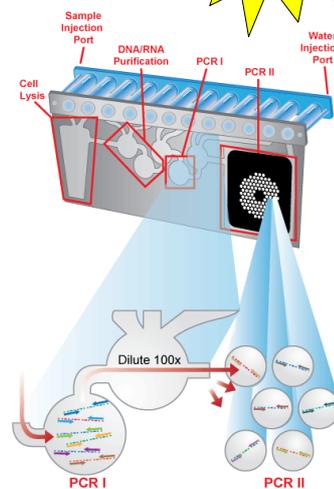
TARGET

18 VIRUS:

Adenovirus, Coronavirus, Enterovirus, Influenza Parainfluenza, Metapneumovirus RSV, Rhinovirus

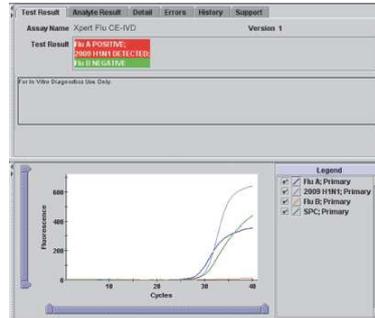
3 BATTERI:

Bordetella pertussis, Chlamydomphila pneumoniae, Mycoplasma pneumoniae



Cepheid Tecnologia GeneXpert® FLU

**Influenza A-B e
variante H1N1/RSV**
(tampone nasofaringeo)



MRSA VanA GBS H1N1



Thanks